



00377
30

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

DETECCIÓN DE LESIONES AL ADN EN
Drosophila melanogaster
POR MUESTRAS DE AGUA CONTAMINADA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA CELULAR)

PRESENTA:

ADRIANA RAMÍREZ VARGAS

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. PATRICIA RAMOS MORALES

MÉXICO, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OCTUBRE 2003

1



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.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico el contenido de mi trabajo, referencial:
NOMBRE: Adriana Ramírez Vargas
FECHA: 17-11-03
FIRMA: [Signature]

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA U.N.A.M. CON LA COLABARACIÓN DE LA DRA. PATRICIA RAMOS MORALES Y DE LA AYUDA INCONDICIONAL DEL BIOL. HUGO RIVAS M.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

OFICIO FCIE/DEP/0295/2003
ASUNTO: Asignación de sinodales

DRA. PATRICIA RAMOS MORALES
Presente

Por este conducto me permito comunicarle que ha sido ratificado(a) como Director(a) de Tesis del(a) alumno(a) BIOL. ADRIANA RAMÍREZ VARGAS, quién desarrolló el trabajo de tesis titulado "DETECCION DE LESIONES AL ADN EN Drosophila melanogaster POR MUESTRAS DE AGUA CONTAMINADA "

Así mismo, comunico que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada en su sesión del 21 de Abril del año en curso ha designado a los siguientes sinodales para dictaminar si el trabajo que ha desarrollado como tesis el(a) alumno(a) antes mencionado(a) tiene los méritos para obtener el grado de MAESTRO(A) EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)

CARGO	GRADO	NOMBRE COMPLETO
PRESIDENTE	DRA.	PATRICIA RAMOS MORALES
VOCAL	DRA.	MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
SECRETARIO	DRA.	REGINA DORINDA MONTERO MONTOYA
SUPLENTE	DR	JESUS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
SUPLENTE	DR	EDUARDO MADRIGUAL BUJAIAR

Sin más por el momento aprovecho la ocasión para enviarles un cordial saludo.

Atentamente,
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D. F., a 24 de Abril de 2003

JEFE DE LA DIVISION

DRA. DENI CLAUDIA RODRIGUEZ VARGAS

DCR\VASR\ipp:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

RESUMEN	2
I. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1 Contaminación del agua.	4
1.2 Drosophila como Biomonitor.....	9
1.3 Reparación.....	12
II. ANTECEDENTES.	21
2.1 Prueba de reparación del ADN en Drosophila melanogaster.....	21
2.2 Región Minera de Los Azufres.....	27
III. HIPÓTESIS.	30
OBJETIVOS:.....	30
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
4.1 Controles positivos:.....	31
4.1.1 Sulfato de Níquel (NiSO_4)	31
4.1.2. Etil-N-nitrosourea.....	32
4.1.3. Mitomicina C.	33
4.1.4 Cianato de Sodio (NaOCN).....	34
4.2. Toma de muestras de agua.....	35
4.3. Cruza utilizada para la prueba de reparación.....	37
4.4 Concentraciones y tratamiento	43
V. RESULTADOS.	48
Compuestos utilizados:	54
Muestras de Agua, Ligeramente Tóxicas.....	69
VI. DISCUSION	78
1) Compuestos de referencia.....	79
2) Muestras de agua.	81
VII. CONCLUSIONES.	85
VIII. REFERENCIAS	86

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DETECCION DE LESIONES AL ADN EN *Drosophila melanogaster* POR MUESTRAS DE AGUA CONTAMINADA.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Contaminación del agua.

Los ríos arrastran gran variedad de desechos orgánicos y sustancias químicas producidas en gran medida por los sectores industrial, agrícola y doméstico. La mayoría de estos residuos son arrojados al drenaje, alcanzando posteriormente a otros sistemas hidrológicos (Houk 1992). Los desechos industriales son indeseables en todos los ámbitos, millones de litros de los afluentes industriales se descargan diariamente en ríos y sistemas de desagües municipales, amenazando la salud de los pobladores y deteriorando el ambiente (Grisham *et al.* 1986, Buffler *et al.* 1985; citados por Houk 1992). Algunos de estos compuestos son tóxicos para los seres vivos, como lo confirman los índices de morbilidad de poblaciones cercanas a ríos con descargas industriales constantes. Las prácticas de eliminación de desechos industriales del pasado y las del presente no han beneficiado significativamente a la salud de los organismos de entornos inmediatos a los sitios de contaminación y, en general, al medio ambiente. La regulación de la calidad de los desechos industriales es poco eficiente, ya que aún se descargan compuestos altamente genotóxicos, como se ha probado con múltiples ensayos de mutagénesis. El uso de organismos para valorar diferentes niveles de la respuesta genotóxica permite avanzar en el conocimiento del peligro que implica para los seres vivos la exposición a diversos compuestos (Houk, 1992).

Las descargas industriales tienen un potencial peligroso, tanto para organismos del medio acuático como del terrestre, dado que en el ambiente éstas forman mezclas complejas que pueden contener sustancias potencialmente activas, ya sean solas o en combinación con otras (Houk, 1992).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

Los estudios sobre el daño genético provocado por aguas contaminadas son relevantes para el bienestar de los organismos vivos ya que una vez que el ADN es alterado, el cambio se transmite a generaciones futuras. La prueba de reparación *in vivo* del ADN se utiliza para determinar la inducción de daño al ADN por acción de algunos agentes químicos a través del uso de mutantes deficientes en el sistema de reparación del ADN (*mei-9^a mei-41^{D5}*) (Nguyen et al. 1979, Fujikawa, 1988, Negishi et al. 1993). Las ventajas de este sistema es que los efectos de daño al ADN se puede monitorear independientemente del sexo por medio de la comparación de la sobrevivencia de las moscas deficientes y las eficientes en reparación de ambos sexos (Obona 1994). Se considera esta prueba como un bioindicador de daño directo al ADN por compuestos contenidos en muestras de agua contaminada.

Con este trabajo se pretende obtener evidencias de la utilidad de la prueba de reparación *in vivo* para identificar la inducción de daño al ADN, como prueba preliminar para otras pruebas de mutagénesis en *Drosophila melanogaster*. Analizar la aplicabilidad del índice de sobrevivencia para comparar la actividad genotóxica de muestras de agua.

Se utilizaron cepas de moscas con los siguientes marcadores: ***FM7, y^{31D} sc⁸ w^a sn^{x2} v^{of} g⁴ B¹ / y¹ mei-9^a mei-41^{D5}*** (refiriéndose brevemente como ***FM7 / y¹ mei-9^a mei-41^{D5}***), presenta un balanceador cromosómico el cual suprime el entrecruzamiento del cromosoma X. Se colectaron siete muestras de agua y se aplicaron a larvas de 72 horas en viales con medio estándar Carolina, también se aplicó a la prueba a cuatro compuestos de referencia. Los tratamientos aplicados a la cruce ***FM7 / y¹ mei-9^a mei-41^{D5}*** se corrieron a la par con la línea de referencia silvestre *Canton-s*. Todos los organismos que llegaron a adultos se clasificaron, registraron y se determinaron índices de sobrevivencia e índices sexuales.

CRUZA: Hembras ***FM7 / y¹ mei-9^a mei-41^{D5}*** X Machos ***y¹ mei-9^a mei-41^{D5} / Y***

Los índices de sobrevivencia que se graficaron de la línea ***FM7 / y¹ mei-9^a mei-41^{D5}***, muestran un comportamiento similar en los fenotipos eficientes y

deficientes. Con la aplicación de esta prueba se pudo observar que es sensible a la detección de compuestos que son tóxicos a las moscas. Solo en dos de las muestras de agua colectadas hubo toxicidad en las concentraciones más altas en ambas líneas de moscas. En general la sensibilidad de los individuos de la línea FM7 / y¹ mei-9^a mei-41^{D5} es mayor a los agentes contaminantes de las agua probadas que los de la línea silvestre Canton-s.

En todas las muestras de agua tratadas se observa que disminuye el índice de sobrevivencia en la mínima concentración (0.4 %), en relación al testigo disminuye el índice entre un 30% y 50%. No se logra observar un efecto positivo de daño al ADN en las muestras de agua ya que no existe marcada diferencia entre los individuos proficientes y deficientes en reparación. La prueba de reparación *in vivo* de daño al ADN en *Drosophila melanogaster*, fue positiva en los compuestos ENU y MMC. Las moscas utilizadas en la prueba de reparación del DNA *in vivo* de *Drosophila* no mostraron daño genotóxico a la exposición de NaOCN ni de NiSO₄. La prueba de reparación discriminó a las muestras de agua en: muy tóxicas, tóxicas y no tóxicas.

DETECCION DE LESIONES *in vivo* AL ADN EN *Drosophila melanogaster* INDUCIDAS POR MUESTRAS DE AGUA CONTAMINADA.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Contaminación del agua.

Los ríos arrastran gran variedad de desechos orgánicos y sustancias químicas producidas en gran medida por los sectores industrial, agrícola y doméstico. La mayoría de estos residuos son arrojados al drenaje, alcanzando posteriormente a otros sistemas hidrológicos (Houk 1992). Los desechos industriales son indeseables en todos los ámbitos, millones de litros de los afluentes industriales se descargan diariamente en ríos y sistemas de desagües municipales, amenazando la salud de los pobladores y deteriorando el ambiente (Grisham *et al* 1986, Buffler *et al.* 1985; citados por Houk 1992). Algunos de estos compuestos son tóxicos para los seres vivos, como lo confirman los índices de morbilidad de poblaciones cercanas a ríos con descargas industriales constantes. Las prácticas de eliminación de desechos industriales del pasado y las del presente no han beneficiado significativamente a la salud de los organismos de entornos inmediatos a los sitios de contaminación y, en general, al medio ambiente. La regulación de la calidad de los desechos industriales es poco eficiente, ya que aún se descargan compuestos altamente genotóxicos, como se ha probado con múltiples ensayos de mutagénesis. El uso de organismos para valorar diferentes niveles de la respuesta genotóxica permite avanzar en el conocimiento del peligro que implica para los seres vivos la exposición a diversos compuestos (Houk, 1992).

Las descargas industriales tienen un potencial peligroso, tanto para organismos del medio acuático como del terrestre, dado que en el ambiente éstas forman mezclas complejas que pueden contener sustancias potencialmente activas, ya sean solas o en combinación con otras (Houk, 1992).

Fernández et al. (1992; Citado por Houk, 1992) encontraron en los

Fernández et al. (1992; citado por Houk, 1992) encontraron en los sedimentos de las costas de España múltiples clases de compuestos de origen antropogénico, incluyendo halogenados orgánicos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, sulfuros heterocíclicos, oxigenados orgánicos, nitroarenos y otros compuestos conteniendo nitrógeno. El origen de estos compuestos se asocia con pesticidas, combustibles fósiles, productos de combustión por foto oxidación, emisiones vehiculares y de industrias intermedias.

La Agencia de protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, Environmental Protection Agency) y la TRI (Toxic Release Inventory) reportaron que en 1994, en una población de 22,744 habitantes de los Estados Unidos se liberaron al ambiente 2.26 millones de libras de sustancias tóxicas (Claxton et al. 1998). La contribución de las descargas incluidas en el inventario realizado se distribuyeron de la siguiente manera: aire (68.8%), suelo (12.8%), subsuelo (15.4%) y agua superficial (2.9%). De los compuestos tóxicos probados en este reporte, aproximadamente un tercio de la mezcla resultaron carcinógenos para roedores. La mayoría de estos carcinógenos se descargaron como componentes de mezclas complejas en afluentes líquidos, emisiones aéreas y desechos sólidos. Adicional a esto, otros genotóxicos se liberaron al ambiente en forma de químicos específicos o a través de transformación biológica. En consecuencia, no es de sorprenderse que se haya incrementado la relación que existe entre los genotóxicos y los carcinógenos, asociados con la liberación de desechos complejos de industrias a los afluentes (Claxton et al. 1998).

Se han utilizado diversos modelos biológicos para probar la genotoxicidad de un amplio rango de afluentes industriales y de desechos. McGeorge et al. (1985; citado por Houk, 1992) usaron la prueba de *Salmonella* para evaluar 33 afluentes de 27 industrias que incluyeron refinerías petroleras, e industrias de: síntesis de compuestos orgánicos, manufactura de resinas y de pinturas. Los resultados positivos obtenidos en los bioensayos utilizados mostraron que muchas de esas industrias emiten genotóxicos al ambiente (Claxton et al. 1998). Estudios realizados en plantas y animales también proveen evidencias de los efectos genotóxicos provocados por los desechos. Klekowski y Levin (1979) estudiaron el crecimiento de helechos en ríos altamente contaminados con afluentes provenientes del molido de la pulpa y del

papel y encontraron que la frecuencia de alteraciones cromosómicas en las plantas colectadas a lo largo de los ríos era mayor que en helechos que crecieron en sitios libres de contaminantes (Houk, 1992). Estudios con peces de agua dulce y marinos han mostrado gran incidencia de neoplasias en organismos capturados en afluentes contaminadas por industrias (Brown *et al.*, 1973; Hershberger *et al.* 1984; Malis *et al.* 1984; citados por Houk, 1992). En otros estudios, peces expuestos a contaminantes en el río Rhin, han presentado daño citogenético significativo (Alink *et al.* 1980; Malis *et al.* 1984; citado por Houk).

Algunas personas que habitan en sitios aledaños a zonas de descarga industrial presentan diversos trastornos físicos y neuronales como: irritación de la piel, pulmones, náuseas y alteraciones en las funciones hepáticas (Grisham 1986, Buffler *et al.* 1985; citados por Houk, 1992). También se han documentado otros efectos en la salud como cáncer gastrointestinal, defectos al nacimiento, anormalidades reproductoras y de vejiga (Budnick *et al.* 1984; Golman *et al.* 1985; Griffith *et al.* 1989, Najem *et al.* 1985; Vianna y Polan 1984; citados por Houk, 1992).

Para entender mejor el efecto genotóxico de ambientes contaminados sobre los seres humanos y el ecosistema en general, es necesario realizar más investigaciones acerca de sitios contaminados, la composición química de las descargas industriales, el efecto genotóxico que producen y la integración de la información obtenida para sustentar la toma de decisiones. En la mayoría de los organismos, las alteraciones al material genético son deletéreas y pueden tener consecuencias severas e irreversibles en la salud, como es la asociación con el cáncer, Figura 1 (Houk, 1992).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

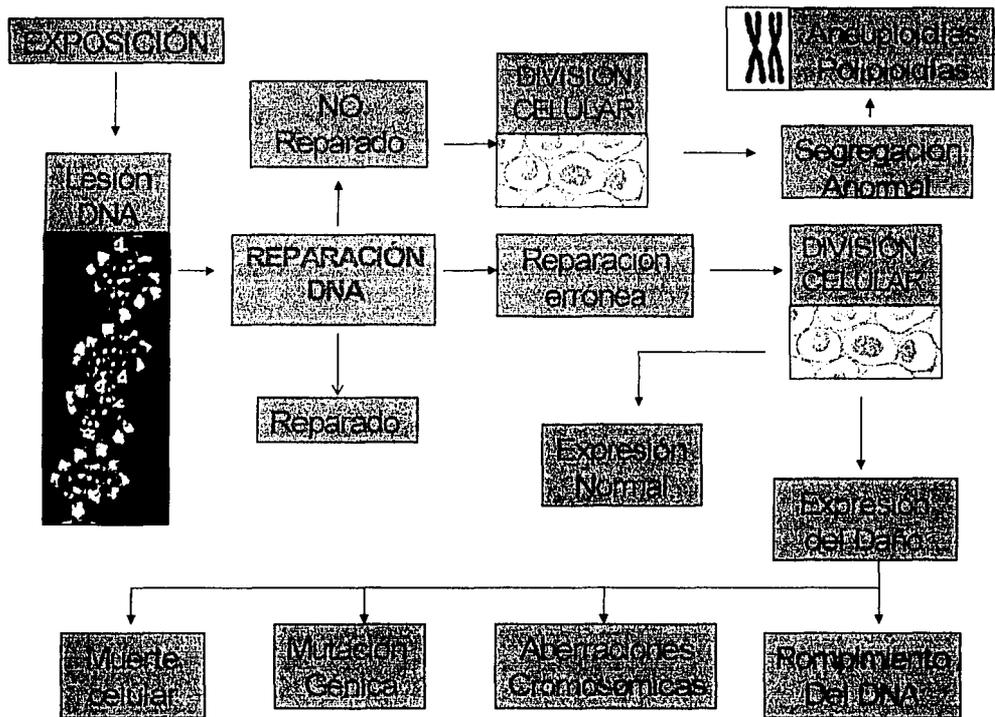


Figura 1 Efectos a nivel celular provocados por lesiones al ADN (Modificado de Popoca, 2001)

Si bien, el uso de bioensayos se ha enfocado en gran medida a determinar la toxicidad aguda de agentes peligrosos, esto representa sólo el primer nivel de impacto que pudieran tener los compuestos tóxicos en un ecosistema acuático. Actualmente está bien establecido que muchas descargas industriales contienen sustancias que no provocan efectos agudos, pero que son capaces de reducir de manera indirecta la sobrevivencia de los organismos expuestos al dañar al material genético de sus células germinales y somáticas. Los análisis químicos detallados de compuestos particulares y de su efecto en los organismos aportan sólo información parcial ya que la posibilidad de estudiarlos en la forma en que se encuentran en el ambiente, que es esencialmente formando mezclas complejas, resulta limitada. Por otro lado, una desventaja del estudio de las mezclas complejas consiste en el desconocimiento de la composición y las interacciones entre los diversos componentes, aunado a su baja especificidad en la identificación puntual del factor causante del daño genotóxico a niveles de concentración en los que no hay evidencias aparentes de toxicidad (Witthe *et al.* 1996).

La interacción de los genotóxicos con el ambiente puede alterar la composición química de las mezclas complejas, los resultados de dicha interacción son difíciles de identificar particularmente, aunque sí es posible monitorear cambios en la actividad genotóxica de las mezclas complejas a través del uso de bioensayos (Claxton *et al.* 1998). Una alternativa para probar la genotoxicidad de los desechos industriales es tratar la mezcla como una sola unidad, es decir probar el extracto crudo. Hook y De Marini (1988; citado por Houk.), De Marini *et al.* (1987), Marini *et al.* (1989) y Simons *et al.* (1988) administraron muestras de desechos crudos a diversos sistemas biológicos, para evaluar inducción de: mutagénesis en bacterias, daño directo al ADN, mutaciones letales en roedores, hepatotoxicidad y detección de aductos de ADN (Houk, 1992).

El enfoque anterior permite proponer la aplicación de metodologías, sensibles, de corta duración que, a manera de un tamiz preliminar, proporcionen información con significado biológico acerca de la peligrosidad de la muestra y, por ende, sirvan de base para evaluar la pertinencia de aplicar metodologías adicionales enfocadas a establecer el mecanismo implicado en la actividad encontrada.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.2 *Drosophila* como Biomonitor

La mosca *Drosophila* es un insecto que pertenece al orden *Diptera* que agrupa a aquellos organismos en los que sólo el primer par de alas es funcional y el segundo se ha transformado en órganos del equilibrio, llamados alterios o balancines. Las especies de *Drosophila* son cosmopolitas por lo que se les encuentra en todo tipo de clima, altitud y latitud; se localizan especialmente en las frutas suaves en proceso de fermentación y en general en alimentos con alto contenido de ácido acético (Ramos *et al.* 1993).

El desarrollo de *Drosophila melanogaster* presenta un periodo de embriogénesis dentro del huevo y una sucesión de estadios larvales que culminan con una metamorfosis completa, de la que finalmente surge el imago o adulto. La secuencia y duración de los diferentes estadios en el ciclo de vida son: huevo, larva 1º estadio, larva 2º estadio, larva 3º estadio, pupa e imago (figura 2). La duración del ciclo de vida completo es de 9.5 a 10 días en condiciones controladas de temperatura, 25° C y humedad relativa, 60% dentro del laboratorio. Los cambios en la temperatura afectan la duración del ciclo de vida.

Las larvas presentan dos linajes celulares diferentes; las células larvarias y las imagales. Las células larvarias forman el cuerpo de la larva, se caracterizan porque han perdido la capacidad de división y solo aumentan de volumen, como es el caso de las células de las glándulas salivales que presentan endo-duplicación y forman los conocidos cromosomas politénicos. Las células imagales son de menor tamaño, diploides y se dividen mitóticamente, están determinadas genéticamente pero no diferenciadas y en la larva se localizan en estructuras denominadas discos imagales. Al final del tercer estadio larvario, la larva forma el puparium a partir de la cutícula larvaria, la cual se endurece y torna oscura. En la pupa ocurre la metamorfosis y con ella, la diferenciación de los discos imagales. La hormona ecdisona es el inductor de la metamorfosis en la mosca y está involucrada en la destrucción de diferentes tejidos y órganos larvarios (histólisis) como las glándulas salivales y el intestino entre otros. La mayor parte de los órganos del adulto se forman a partir de los discos imagales (de los que surgen los apéndices como ojos, alas, patas, aparato bucal y genitales) o de conjuntos de células específicas, como los histoblastos (que forman la pared del abdomen de la mosca) (fig. 3). El estadio

los histoblastos (que forman la pared del abdomen de la mosca) (fig. 3). El estadio de pupa dura de 3 a 5 días hasta que emerge el imago o adulto, el cual inicia su actividad reproductora en cuanto despliega y seca sus alas (Ramos *et al* 1993).

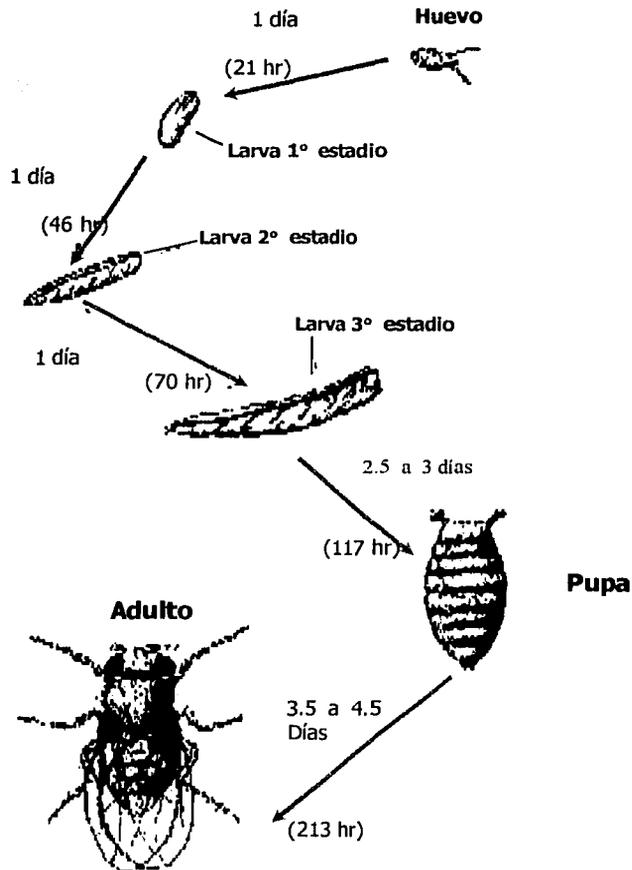


Figura 2. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (Tomado de Fly Database, 2000).

La información sobre la genética de *Drosophila melanogaster* ha hecho que este organismo sea considerado un sistema experimental único, siendo prácticamente el más usado, al menos en todos los aspectos de la genética de los organismos con un nivel de complejidad determinado. Sin duda es un organismo ideal para el monitoreo de componentes químicos con actividad mutagénica en programas de monitoreo de la actividad genotóxica de compuestos químicos y mezclas complejas *in vivo*, generando resultados principalmente en la determinación de efectos tanto en células germinales, como en somáticas (Graf y Singer, 1992).

El éxito obtenido por este sistema *in vivo* se debe principalmente a las ventajas que proporciona su uso: la duración del ciclo de vida, se requiere poco espacio para contener poblaciones numerosas y su mantenimiento es económico; además de que en cada generación se obtienen progenes numerosas que facilitan la obtención de decisiones con significancia estadística. *Drosophila* posee una actividad metabólica capaz de transformar una variedad considerable de compuestos (Graf *et al.*, 1984), por lo que es considerada una especie no-mamífero ideal para pruebas *in vivo* de químicos con actividad genotóxica (Würgler, *et al.*, 1987). Tal vez, entre las múltiples ventajas de este organismo destaca la accesibilidad a numerosos mutantes, cuyo estudio y aplicación ha contribuido de manera relevante al estudio de la transmisión de los genes, procesos metabólicos, la regulación de los genes durante el desarrollo y muchos otros, entre los que se encuentran los mutantes meióticos asociados con deficiencias en la reparación por escisión y la reparación postreplicativa.

1.3 Reparación

Con excepción de las mutaciones puntuales, la ganancia o la pérdida de bases que conducen al corrimiento del marco de lectura, o la variación en el número de cromosomas o de complementos cromosómicos, la mayoría de las alteraciones inducidas por genotóxicos afectan a la integridad del ADN, como las deleciones provocadas por rompimiento directo de las hebras, o bien, el daño a la integridad del ADN por distorsiones de la molécula como consecuencia de la alquilación, la formación de enlaces cruzados ADN-ADN o ADN-proteínas, la formación de aductos ADN-proteína, la intercalación de moléculas en la hebra del ADN (agentes intercalantes), entre otros. Así, dependiendo del tipo de lesión, el o los mecanismos de reparación que resultan implicados en el mantenimiento de la integridad del material hereditario, son también variados.

Entre los indicadores de alteraciones en el ADN se encuentran las distorsiones en la hélice y los cambios químicos en las bases que la forman. De manera general, se han identificado diferentes niveles de reparación que resultan implicados dependiendo del tipo de daño (tabla 1).

Se han encontrado más de 35 mutantes deficientes en la reparación de ADN en *Drosophila*, los que se han caracterizado de acuerdo con su habilidad para mantener la integridad de la información genética y la correspondiente agregación de los cromosomas durante la meiosis. Se han identificado tres grupos principales:

- 1) Mutantes deficientes en reparación pre-replicativa. Este grupo se puede subdividir a su vez, en tres subgrupos:
 - a) Por escisión de bases inducidas por agentes alquilantes (AA) y rayos UV.
 - b) Fotorreparación específica para reparación de daño inducido por AA, pre-replicativa.
 - c) Por escisión de nucleótidos para reparar dímeros de Timina.
- 2) Post-replicación del tipo de translesión.
- 3) Reparación post-replicativa del tipo recombinogénica.

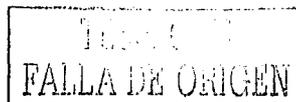


TABLA 1. TIPOS DE SISTEMAS DE REPARACIÓN (Lehninger, 1995).

TIPO DE LESION	SISTEMA	PROTEINAS/ENZIMAS
Cambios de bases mal apareadas.	APAREAMIENTO INCORRECTO	Dam Metilasa, Mut H, L, S, Helicasa II, SSB, DNAPol III, Exonucleasa I, Ligasa
Bases modificadas, alquilación, dímeros de pirimidina.	ESCISIÓN DE BASES	DNA Glucosilasa, AP Endonucleasa, DNAPol I, Ligasa.
Lesiones por cambios estructurales, dímeros de pirimidina.	ESCISIÓN DE NUCLEOTIDOS	ABC Exonucleasas (Uvr), DNAPol I, Ligasas.
Agentes metilantes y alquilantes, dímeros de pirimidina	DIRECTA	DNA Fotoliasa, Metiltransferasas
Todos los anteriores y rompimientos de doble cadena	RECOMBINACIÓN	Rec A, polimerasas, Ligasas

En 1987, Boyd y Harris mediante análisis molecular de una región del cromosoma de *Drosophila* proveniente de mutantes con deficiencia en la fotorreparación y en la reparación por escisión, determinaron que el gen *phr* participa en ambos procesos y es análogo al grupo de genes de complementación de *Xeroderma pigmentosum* (*XPB*) y también, que los genes *mei-9* tienen una función similar, con una fuerte capacidad de fotorreparación (Boyd y Harris, 1987).

En la mosca *Drosophila* los genes mejor estudiados asociados con la reparación por escisión de nucleótidos (NER) son el grupo de alelos *mei-9*. En eucariontes se ha determinado el mecanismo básico de la NER. En humanos el daño es reconocido por la acción de una proteína XPA, la cual acarrea otras proteínas, incluyendo helicasas y endonucleasas. La proteína XPF (ERCC4 en humanos; Rad 1p *S. cerevisiae*; MEI-9) y la proteína ERCC1, comprenden a las endonucleasas que realizan la escisión en sentido 5' → 3' hacia el sitio del daño. La escisión en sentido 3' → 5' lo realiza la proteína XPG (Rad2p en *S. cerevisiae*). La cadena dañada se remueve y se reemplaza por la sintetizada a partir de la cadena complementaria que funciona como molde (Sekelsky et al. 1998).

En eucariontes, el control del ciclo celular está determinado por los denominados puntos de verificación que provocan el arresto de las fases S o G₂ cuando los cromosomas no están completamente replicados o están dañados. Se han reconocido genes reguladores en levaduras como RAD17 y RAD9 que se requieren para el arresto de las células dañadas en la fase G₂. El ciclo celular mitótico se desarrolla por una serie de eventos esenciales: la replicación del ADN se completa antes de entrar a mitosis; la condensación cromosómica, antes de la segregación (Weinert et al. 1994).

Los puntos de verificación suministran a la célula las condiciones necesarias para completar la replicación y reparar el daño al ADN antes de la segregación de cromosomas. Estas funciones tienen dos consecuencias relacionadas: la primera es que los puntos de verificación aseguran que la célula mantenga la integridad de su genoma y mínimo el daño al ADN que

El modelo de reparación por escisión de nucleótidos involucra reconocimiento, incisión, degradación, polimerización y finalmente ligamiento de la nueva cadena reparada. En la etapa de reconocimiento están presentes los productos génicos de ERCC1, XPA, XPF, seguida de la interacción de los factores de transcripción TFIIH. Estos factores contienen a los productos génicos XPB y XPD y este complejo representa la unión directa con el ADN durante la reparación. El evento de incisión está acompañado por los productos génicos ERCC1 y XPG que actúan como endonucleasas. Posteriormente, entran en acción las enzimas ADN polimerasas (ϵ, γ) y las ligasas que completan el proceso de reparación (Bohr *et al.* 1993).

Los productos génicos ERCC1 interactúan fuertemente con MEI-9 y se dimerizan para formar una endonucleasa funcional. Esta proteína tiene actividad de endonucleasa en diferentes sistemas biológicos, como en los heterodímeros de XPF en humanos, que presentan homología con los genes ERCC1^{Dm}/Mei9. En levaduras, los genes de las endonucleasas de reparación por escisión son los RAD10 Figura 4 (Sekelsky *et al.* 2000 a).

ERCC1 ^{Dm}	RGNPI L K S	I LNVPLE FRD	D---IVPDYVVGRT	SCVLYLSLKYH	NLNPDY I	CCRLK LG
ERCC1	RGNPVL KF	IRNVPWEF--S	D---VIPDYVLGOST	CALFLSLRYH	NLHPDY I	HGRQLG
Rad10	KENPLL	NHLKSTNWRY	VSS---IYYDYLV - RGR	SVLFLTLYH	KLYVDY I	SRRMQLS

Figura 4. Comparación de la secuencia de aminoácidos de los genes *Ercc1^{Dm}* de *Drosophila* comparados con los genes homólogos de humanos ERCC1 y Rad 10 de *S. cerevisiae*. (Tomado de Sekelsky *et al.* 2000 a).

Los genes *mei-9* se clonaron independientemente por el registro de expresión diferencial, en el cual un clon P1 que contiene un fragmento de la región citogenética 4B3/4, se hibridizó de un extracto de RNA inmovilizado de la forma silvestre de *mei-9* a partir de un extracto de *Drosophila* (Dusenbery y Smith 1996).

La sobreexpresión de la ADN-polimerasa β en construcciones transgénicas de *Drosophila* no afecta el nivel de reparación de lesiones por acción de rayos UV, o por agentes que causan daño al ADN, como el Metil metano sulfonato (MMS) o la Mitomicina C, pero en organismos transgénicos

incrementan la recombinación espontánea, tanto mitótica como meiótica, de manera que la pol- β puede tener una función especial en la reparación de ADN. Las ADN polimerasas α , β y δ nucleares se han identificado en *Drosophila* y algunos de sus clones (Dusenbery y Smith, 1996).

La inactivación de los genes *mei-9* resulta en una hipermutabilidad en respuesta a varios agentes alquilantes. Los efectos de *mei-9* sobre la inducción de mutación se han podido determinar con más de 30 sustancias carcinogénicas (Vogel 1989, citado por Nivard *et al.* 1996). Para el caso de los agentes alquilantes cíclicos y monofuncionales existe una relación positiva entre los agentes nucleofílicos selectivos y los agentes electrofílicos, así como aumento en la frecuencia de mutación bajo condiciones de deficiencia en reparación. Los aductos de N-alkil son los principales sitios de ataque de la actividad de reparación por escisión. Así, los mutantes *mei-9* son deficientes en reparación por escisión de nucleótidos y posiblemente también tienen reducida la actividad de las enzimas AP endonucleasas, ya que los sitios AP se van acumulando (Nivard *et al.* 1996).

Vogel (1989, citado por Nivard *et al.* 1996) mostró que en la reparación por escisión de nucleótidos en *Drosophila*, los mutantes *mei-9* mostraron mayor sensibilidad ante el efecto del metil metanosulfonato (MMS) y la metil nitroso N-guanidina (MNNG) comparada con la de moscas silvestres, 5.8 y 3.6 veces mayor, respectivamente. En el mismo estudio se encontró que las lesiones inducidas al ADN por el alquilante DMN en células espermáticas en maduración no dependen de las condiciones maternas de la NER. En contraste, la inducción de mutación en espermátidas se facilitó 6 veces en ausencia de las funciones de *mei-9* (Nivard *et al.* 1996).

En la meiosis se han incorporado dos características de la mutante *mei-9* en las funciones de la proteína MEI-9: inestabilidad para generar entrecruzamiento y la presencia de segregación post-meiótica (PMS). Durante la reparación por recombinación, la formación de los heterodúplex requiere reparación por apareamiento incorrecto que depende de la abertura de una de las cadenas de ADN. Se requiere de la proteína MEI-9 para realizar las aberturas de la cadena durante la reparación por recombinación. La ausencia

de la actividad de reparación de los mutantes *mei-9* presenta una oportunidad de detectar heterodúplex sin intermediarios recombinacionales, figura 5 (Sekelsky *et al.* 1998). Las hembras homocigotas para el alelo mutante *mei-9*, presentan menor entrecruzamiento meiótico (por debajo del 10% del silvestre). Sin embargo tienen altos niveles de PMS, la cual se manifiesta en la progenie como individuos que portan un solo cromosoma materno pero son mosaicos para ambos alelos maternos. Estas hembras son capaces de generar recombinación intermedia en los heterodúplex de ADN pero son deficientes tanto en la reparación de bases no apareadas en los heterodúplex, así como en la resolución de estos intermediarios como intercambios recíprocos. Se ha encontrado que la proteína MEI-9 puede actuar directamente para resolver las uniones tipo Holliday (HJ) con intermediarios recombinacionales, pero los mutantes *mei-9* no reparan por recombinación en la región dañada, Figura 6 (Sekelsky *et al.* 1995).

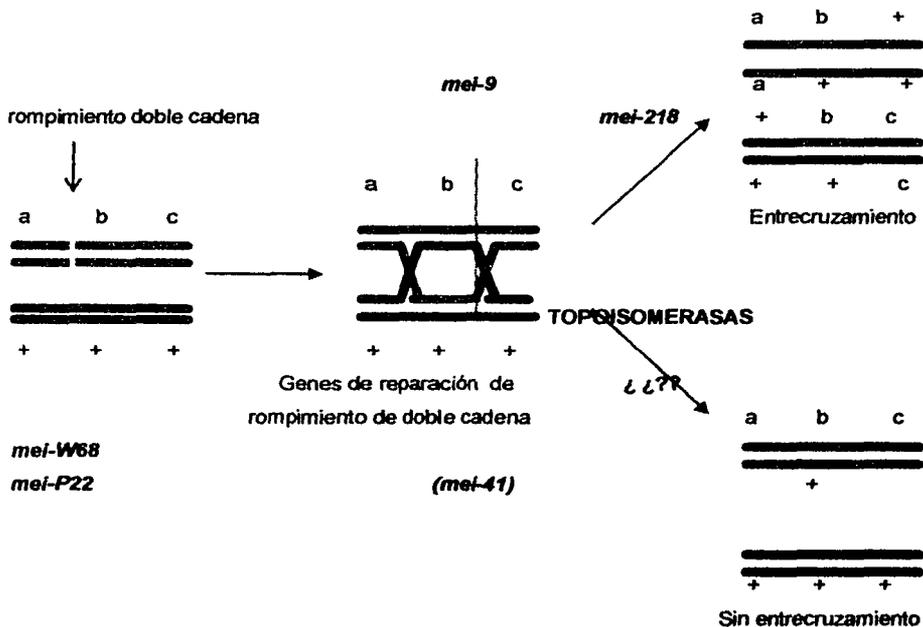


FIGURA 5. Participación de diferentes genes en la reparación durante la recombinación meiótica (Sekelsky *et al.* 1998).



FIGURA 6. Resolución HJ mediada entrecruzamiento, no hay rompimiento de cadenas por la ausencia de las proteínas MEI-9 por lo que no ocurre entrecruzamiento ni reparación por apareamiento incorrecto de la región dañada (amarillo) (Sekelsky *et al.* 1998).

La respuesta celular al daño al ADN involucra varios pasos que: identifican el daño, activan la ruta específica de reparación y traducen las señales celulares que coordinan las actividades celulares, sobre todo aquellas que regulan el desarrollo correcto del ciclo celular. Vivino (1986; citado por Dusenbery y Smith, 1996) proporcionó evidencia de la activación de genes ante la respuesta a radiaciones UV, identificando un transcrito de 1Kb después del tratamiento de células de *Drosophila* en cultivo. Howard y Flanders (1989; citado por Dusenbery y Smith, 1996) utilizaron MMS y determinaron más de 20 proteínas que se sintetizaron en respuesta al tratamiento de las células con estos compuestos. La observación de rupturas y fisuras en cromosomas metafásicos de células mutantes *mei-41* y de células sin mutación es contrastante, porque muchos organismos poseen puntos de restricción del ciclo celular que previene a la célula de tener daño al ADN presente en G₂ y aún en M. Así, el análisis fenotípico de las mutantes *mei-41* sugiere que, en ausencia de los productos génicos de *mei-41*, la célula presenta rompimientos de doble hebra y sin embargo, la célula entra a mitosis (Hari *et al.* 1995).

Empleando electroforesis, Todo y Ryo (1994; citado por Dusenbery y Smith, 1996) identificaron dos complejos proteicos en células embrionarias de cepas de *Drosophila* de tipo silvestre *Canton-S* eficientes en reparación. La secuencia de ADN y la comparación fenotípica sugieren que *mei-41* es estructuralmente homólogo a los genes de la enfermedad humana *Ataxia Telangiectasia* (AT) (Dusenbery y Smith, 1996). Existe una gran cantidad de alelos *mei-41* (70-100). Las proteínas MEI-41 pertenecen a la familia de

proteínas similares a cinasas P13 que incluyen las de humanos ATM, ADN-PKcs, las de *S. cerevisiae* Mec1p y la de *S. pombe rad3* (Hari, *et al.* 1995). Los genes MEC1/ESR1 de *Saccharomyces cerevisiae* (mutantes de la mitosis que actúan como "punto de chequeo") bloquean la entrada a mitosis cuando la replicación del ADN está incompleta o cuando se expone al organismo a un agente genotóxico, por lo que se sugiere un mecanismo regulador que ordena y completa los eventos del ciclo celular. Los genes MEC1 son esenciales para la función de monitoreo de los puntos de restricción en la transición G₁/S o G₂/M. Las mutantes MEC1 muestran una reducida recombinación meiótica. En *D. melanogaster* se requiere de una proteína de 270 KD para el mismo proceso y aparece en ambas funciones estructurales homólogas a MEC1 (Keith, *et al.* 1995).

Hari y colaboradores (1995) clonaron los genes *mei-41* y los secuenciaron, observando que pertenecen a una familia de proteínas grandes que incluyen el producto de varios genes que actúan como "punto de chequeo" en el ciclo celular. También durante la embriogénesis y en la oogénesis, la proteína MEI-41 tiene varias funciones, además de su función somática como sensor de daño al ADN (Hari *et al.* 1995).

La mayoría de los alelos mutantes *mei-41* reducen el entrecruzamiento meiótico en la célula hasta en un 50%. El complejo sinaptonémico es aparentemente normal, pero con menos nódulos de recombinación y regularmente existen deformaciones morfológicas que se forman en la región de la cromatina descondensada. Ocurre no-disyunción del cromosoma X el cual se pierde hasta en un 10%. Las hembras homocigotas para los alelos *mei-41* producen poca o ninguna progenie viable, en embriones derivados, se presentan defectos mitóticos que causan letalidad en todos los estadios embrionarios (Hari *et al.* 1995).

Al igual que en los seres humanos, en *Drosophila* el daño severo al ADN puede inducir apoptosis y el factor transcripcional que regula esta respuesta es p53; a su vez, este factor tiene reguladores que lo activan. Los candidatos para regularlo serían las proteínas cinasas mencionadas anteriormente (Sekelsky *et al.* 2000 b).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II. ANTECEDENTES.

2.1 Prueba de reparación del ADN en *Drosophila melanogaster*

La prueba de reparación *in vivo* del ADN en *Drosophila* se utiliza para determinar la inducción de daño al ADN por acción de agentes químicos a través del uso de mutantes deficientes en el sistema de reparación de ADN, *mei-9^a mei-41^{D5}* (Nguyen *et al.* 1979). Es una prueba de corta duración y específica, que permite aplicar tratamientos agudos o crónicos, se utilizan genes recesivos ligados al cromosoma X, que afecta la reparación por escisión (*mei-9^a*) y la reparación posreplicativa (*mei-41^{D5}*) (Negishi, 1991).

En 1979, Nguyen *et al.*, proponen utilizar a los mutantes *mei-9^a* y *mei-41^{D5}* de *Drosophila* en el diseño de un sistema de cruza para determinar la capacidad de un posible genotóxico para inducir lesiones al ADN que requieran ser reparadas mediante los mecanismos de reparación por escisión y de reparación postreplicativa. Esta metodología ofrecía la ventaja de ser un sistema *in vivo* que informaría de la importancia de estos mutantes en la respuesta genotóxica y, probablemente, también del tipo de lesiones asociadas a la exposición a determinados genotóxicos. Esta cruce sería además altamente sensible debido a que la presencia simultánea de ambos marcadores confiere hipersensibilidad al daño inducido por mutágenos / carcinógenos.

En 1988, Fujikawa propone la prueba de reparación del ADN para *Drosophila melanogaster* utilizando las mutaciones recesivas *mei-9^a* y *mei-41^{D5}*, sin embargo dado que ambas mutaciones están ligadas al cromosoma X y en homocigocis producen esterilidad, se incluyó el arreglo de cromosomas compuestos, reversos, acrocéntricos, *C(1)DX* para balancear el sistema de cruce, lo que da como resultado que en la progenie los machos sean deficientes en reparación o letales, mientras que las hembras son eficientes en reparación (Negishi 1991).

Negishi y colaboradores (1991) pudieron detectar fácilmente el efecto del daño al ADN en células somáticas, utilizando la técnica de reparación propuesta

por Fujikawa (1988) de ADN *in vivo* de *Drosophila*. Todas las nitrosaminas probadas indujeron daño al ADN.

Fujikawa (1993) propuso emplear un cromosoma X invertido *C(1)DX* para balancear la cruce, obteniendo como resultado machos deficientes y hembras eficientes en reparación por escisión y post-replicativa. La cruce que se utilizó fue: machos deficientes *sc z¹ w⁺ mei-9^a mei-41^{D5}* con hembras eficientes *C(1)Dx y f* (Obana *et al.* 1994).

Obana *et al.* (1994) reportaron la prueba de reparación en un experimento que se utilizó con el fin de detectar directamente la producción del daño al ADN por las micotoxinas en un cultivo de hongos sin un proceso de extracción, utilizando la cruce de reparación *sc z¹ w^{+(TE)} mei-9^a mei-41^{D5} / C(1)DX, y f*. También se demostró que la prueba de reparación puede detectar genotoxicidad de compuestos en una mezcla (Obana *et al.* 1994).

Inoue *et al.* (1995) utilizaron la prueba de reparación para demostrar el efecto de la Griseofulvina alternando con otro sistema de prueba con la recombinación somática en *Drosophila melanogaster*. La cruce que se utilizó fue: hembras eficientes *FM7 y^{31D} sc⁸ dm B / sc z¹ w^{+(TE)} mei-9^a mei-41^{D5}* y machos deficientes *sc z¹ w^{+(TE)} mei-9^a mei-41^{D5} / Y*. Con la prueba de reparación demostraron que la Griseofulvina causa daño letal al ADN a los organismos deficientes en reparación, mientras que los eficientes sobrevivieron satisfactoriamente (Inoue *et al.* 1995).

Debido a que los genes *mei-9^a mei-41^{D5}* producen esterilidad en las hembras homocigóticas y a la ausencia de una expresión morfológica asociada con la expresión funcional (deficiencia en reparación), Inoue *et al.*, (1995) propuso estabilizar la cruce con un cromosoma balanceador (*FM7*), con la finalidad de: 1) evitar la homocigosis de los genes *mei-9^a mei-41^{D5}* y en consecuencia, garantizar la fecundidad de las hembras y 2) mantener estables a los genes *mei-9^a mei-41^{D5}*, los cuales carecen de una expresión morfológica que permita garantizar su presencia.

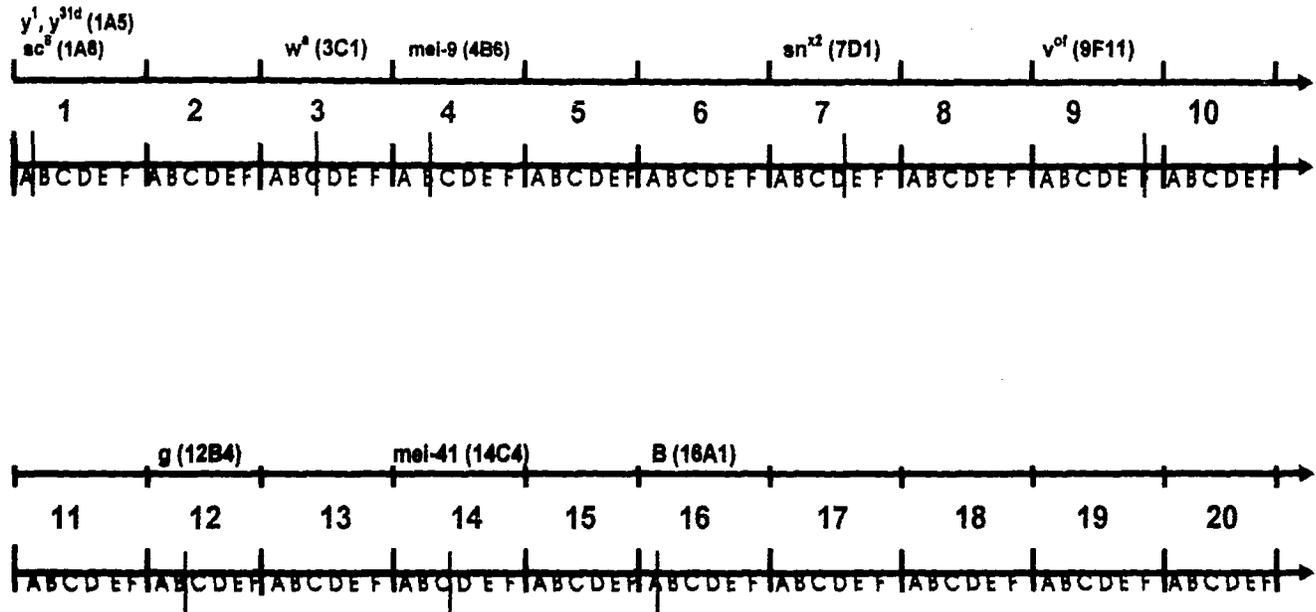
Un cromosoma balanceador es un arreglo genético que se ha utilizado históricamente en el sistema de prueba de *Drosophila* para balancear cruzas (figura 7a y 7b). Existen cromosomas balanceadores para todos los cromosomas de *Drosophila* y para construirlos se ha recurrido a la exposición de moscas a agentes mutagénicos tanto físicos como químicos. Por su actividad estos agentes provocan rompimientos, deleciones, inversiones, translocaciones y demás arreglos que implican: cambio de orden de los genes en los cromosomas, deleción y/o duplicación de parte de uno o de varios genes, inversiones de regiones de un cromosoma, etc. La exposición sucesiva de las moscas a uno o varios agentes mutagénicos provoca la pérdida gradual de homología entre el cromosoma de los organismos tratados y sus contrapartes de tipo silvestre. Entre las consecuencias de la pérdida de homología se encuentra la interferencia con la recombinación meiótica ya que en hembras heterocigotas para un cromosoma balanceador y uno silvestre, prácticamente no se recobran productos meióticos viables debido a la formación de cromosomas dicéntricos, fragmentos acéntricos, anillos, puentes, etc. La imposibilidad de recobrar productos de la recombinación viables tiene como consecuencia que también los genes del cromosoma homólogo (no balanceador) se mantienen sin cambio, en un arreglo estable. De esta manera, es posible producir organismos que en uno de los cromosomas homólogos contenga mutaciones como *mei-9^a mei-41^{D5}*, mientras que en el otro, el orden de los genes se encuentre alterado debido a inversiones múltiples (balanceador). Ya que no se recobrarán productos recombinantes, se garantiza que el arreglo se mantiene estable. Para seguir fenotípicamente a los cromosomas balanceadores, se utilizan genes con expresión morfológica evidente, la mayoría de los cuales, son letales en homocigosis, de manera que se eliminan automáticamente aquellos genotipos diferentes al arreglo de interés (Lindsley y Zimm, 1992).

Así, el uso de mutantes deficientes en reparación en un sistema de cruza balanceado con un cromosoma múltiplemente invertido podría ser útil para establecer el potencial genotóxico de compuestos particulares y de mezclas complejas, además de que brindaría información acerca de la participación de los mecanismos de reparación (por escisión y postreplicativa) en la respuesta genotóxica. Debido a la constitución heterocigota de las

hembras, se recobran dos tipos de progenie que varían en cuanto a su capacidad para reparar el ADN: hembras y machos eficientes en reparación (hembras heterocigóticas y machos hemicigóticos para el cromosoma balanceador) y deficientes en reparación (hembras homocigóticas y machos hemicigóticos para el cromosoma que porta a los alelos mutantes *mei-9^a mei-41^{D5}*. De esta manera se dispone de dos tipos de progenie (eficiente y deficiente en reparación) y de los dos sexos en cada caso, lo que permite determinar si la constitución sexual está involucrada en la respuesta. La variable de respuesta de esta metodología es el índice de sobrevivencia (IS). La diferencia entre el IS de las moscas eficientes y deficientes en reparación es indicativa de la capacidad genotóxica de una sustancia problema ya que se asume que las moscas deficientes en reparación mueren al no poder reparar las lesiones al ADN, asociadas con los mecanismos de reparación por escisión y reparación postreplicativa (Inoue *et al.* 1995).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 7 a. MAPA CITOGÉNÉTICO DE LAS BANDAS POLITENICAS DEL CROMOSOMA X EN *Drosophila melanogaster* CON LA SECUENCIA GÉNICA NORMAL



Representación esquemática del mapa cromosómico del cromosoma X de *Drosophila melanogaster* en donde el cromosoma se divide en 20 secciones o bandas con cinco subdivisiones (de la A a la F); la escala de arriba indica la posición en que se han encontrado los genes con su nombre o símbolo y la banda en donde se localizan. La línea roja vertical representa la posición más fina de los genes en el mapa.

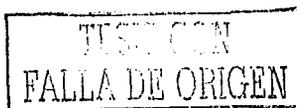
TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

2.2 Región Minera de Los Azufres.

Se encuentra ubicada al noreste del estado de Michoacán, entre Zinapécuaro y Ciudad Hidalgo, en el municipio de Ciudad Hidalgo. Consiste en un sistema acuífero compuesto de lagunas y el sistema geotérmico "Los Azufres". Se encuentran 12 unidades de tipo geotermo-eléctricas con capacidad de 98 MW (INEGI, Sector Eléctrico Mexicano 1993) y compañías como: Cía. Minerales Industriales El Zarco, S.A; Mina Los Azufres de Extracción de Caolín, Fuller; Cía. Mex-Clareol, S.A, Huajúmbaro. En esta región se localizan depósitos de minerales no metálicos. De esta fuente se obtiene el principal recurso energético de la región (INEGI, Sector Eléctrico Mexicano 1993).

Es posible establecer diferentes subzonas de trabajo de tal manera que se analice la respuesta emitida por el biomarcador de interés (en este trabajo son los genes *mei*) con relación a diferentes niveles de exposición (Garduño, 1987, Mapas cartográficos). El clima es templado, se encuentra bosque de Pino-encino, el sistema acuífero está compuesto por los cuerpos de agua: Laguna Larga, Laguna Grande, Laguna Verde, Laguna de los Ajolotes y el sistema geotérmico "Los Azufres".

El campo geotérmico de "Los Azufres" ubicado a 2800 m/snm abarca una extensión de 60 Km², pertenece a la provincia conocida como Cinturón Volcánico Mexicano, al norte del eje neovolcánico, siendo uno de los centros silíceos más importantes de esta provincia. La generación de electricidad y la explotación del campo geotérmico "Los Azufres" comenzó en 1982 y actualmente, después de "Cerro Prieto", es la segunda fuente de energía geotérmica en la República Mexicana y la primera en producir electricidad a partir de fluidos geotérmicos contenidos en roca volcánica fracturada; en total se han instalado 98 MWe de la Comisión Federal de Electricidad (Comisión Federal de Electricidad, Comisión Federal de Electricidad PEMEX). Los pozos que se han perforado presentan profundidades que varían entre 600 y 3500 metros, la mayoría en las dos zonas de descarga de vapor (al norte Maritaro y al sur Tejamaniles) (Editorial, 1991; López, 1991; Verma *et al.*, 1998; Cadenas, 1999).



Debido a la actividad geotérmica, los cuerpos de agua pueden variar en carácter desde agua dulce hasta altamente corrosiva y salina. Las especies químicas en los efluentes pueden dividirse según Barragán y Arellano (1993), de acuerdo con su concentración, como "especies mayores" (>10,00 ppm): cloruros, sulfatos, sodio, calcio, magnesio, potasio y bicarbonato; "especies secundarias" (1000 ppm): aluminio, hierro, bromuros, manganeso, estroncio, carbonato, sílice, amoníaco y boro; "especies menores" (1 ppm): arsénico, bario, cadmio, cesio, cobre, fluoruros, ác. sulfhídrico, yoduros, lantano, plomo, litio, mercurio, níquel, nitratos, fosfatos, rubidio, plata, zinc y zirconio y "especies traza" (<0.01 ppm) en aguas geotérmicas destacan; berilio, uranio, vanadio, selenio, galio, telurio, titanio, etc. De manera general, los sólidos totales disueltos en aguas de origen geotérmico exceden los rangos recomendados tanto para el consumo humano, como para la irrigación de cultivos (Barragán y Arellano, 1993, Coordinación General de Minería, 1995).

En el campo geotérmico "Los Azufres" los constituyentes geotérmicos corresponden a dióxidos de silicio, sodio, potasio, cloro, boro, calcio, bicarbonatos y arsénico, como componentes de aguas separadas; entre los gases asociados al vapor se encuentran: dióxido de carbono en un 97.5%, ácido sulfhídrico en un 2.0%, amoníaco, oxígeno y metano, así mismo, se ha registrado que por cada MWe producido se emiten a la atmósfera 340 kg/h de CO₂ y 3 kg/h de H₂S (Verma *et al.*, 1998).

Armannsson y Kristmannsdorttir (1992), mencionan que el impacto ambiental por la explotación de energía geotérmica está relacionado con el incremento de elementos y compuestos toxicológicamente relevantes como son el H₂S, As, B y Hg. El aumento en las concentraciones de estos constituyentes o su acumulación causan daño en los seres vivos del lugar. También reportaron efectos observados en líquenes pertenecientes al Campo geotérmico de "Los Azufres" debido a las emisiones atmosféricas de vapor por los pozos de extracción. Los síntomas corresponden a la detección de dióxido de azufre (35 ppm) y azufre (780-1400 ppm); con respecto al arsénico, aunque se encuentra principalmente en el agua separada, sólo una pequeña porción se presenta en

el vapor, no obstante reportaron que la concentración de este elemento es alta, debido a la acumulación, de 0.662 a 14.32 ppm en las especies de líquenes (Armannsson y Kristmannsdorttir 1992) .

Dada la evidente contaminación natural de los cuerpos de agua de la zona de "Los Azufres", se eligió esta zona como modelo para obtener información acerca de la capacidad de los mutantes mei para detectar daño genotóxico. En todas las determinaciones se asume que las muestras contienen uno o varios compuestos con actividad genotóxica como ha sido continuamente reportado en la literatura sobre esta zona de Michoacán.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

III. HIPÓTESIS.

La exposición de larvas expresando los genes *mei-9^a*, *mei-41^{D5}* de *Drosophila* a las muestras de agua de la zona de "Los Azufres" reducirá el índice de sobrevivencia de las moscas deficientes en reparación del ADN, en comparación con el IS de las larvas eficientes que pueden realizar reparación por escisión y reparación postreplicativa.

OBJETIVOS:

- 1.- Obtener evidencias de la utilidad de la prueba de reparación *in vivo* para identificar la inducción de daño al ADN, como prueba preliminar para otras pruebas de mutagénesis en *Drosophila melanogaster*.
- 2.- Analizar la aplicabilidad del índice de sobrevivencia para comparar la actividad genotóxica de muestras de agua.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Controles positivos:

4.1.1 Sulfato de Níquel (NiSO₄)

Rodríguez-Arnaiz y Ramos (1986) reportaron que el NiSO₄ induce mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en *Drosophila melanogaster* y es un débil inductor de pérdida de cromosomas sexuales (principalmente por rompimiento parcial, efecto clastogénico). Por otro lado, Jiménez (1998) mostró que la administración subcrónica de sulfato de níquel a *Drosophila melanogaster* induce mutación y recombinación somática. Algunas sales de níquel producen alteraciones estructurales en los cromosomas de la raíz de *V. Faba* (Komczyski *et al.*, 1963; citado por Singh 1984). También se ha reportado inducción de conversión génica en levaduras inducida por este compuesto (Singh *et al.* 1984). El níquel (Ni) reacciona rápidamente con el ADN y disminuye la fidelidad de su síntesis, al inducir rompimientos de ADN de una sola hebra. Los iones Ni⁺ son capaces de inducir la forma transitoria de ADN B o Z y disminuyen la fidelidad de la ADN polimerasa de *E. coli*, reduciendo la transcripción e induciendo un incremento en la incorporación errónea de la ARN polimerasa (Sirover y Loeb 1976) (Miyaki *et al.* 1977, Sunderman 1977; citados por Singh 1984).

En embriones de hámster, Rivedal y Sanner (1980) observaron sinergismo mutagénico entre el NiSO₄ y el benzo [a] pireno. El Ni es un mutágeno relativamente débil en bacterias y mamíferos, pero es altamente clastogénico y se ha comprobado también que induce intercambios de cromátidas hermanas en ratas y también en cultivos de linfocitos humanos (ICH) (Onho *et al.* 1982, Rani *et al.* 1993).

Dada la actividad clastogénica implicada en la exposición a este compuesto se seleccionó como control positivo para este trabajo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.1.2. Etil-N-nitrosourea.

La Etil-N-nitrosourea (ENU) es un agente alquilante más poderoso que la metil nitrosoguanidina (MNNG), en análisis de cambio de bases seguida por alquilaciones *in vivo* en *E.coli*, la ENU induce transiciones tanto de GC--AT como de AT--GC. Estos datos apoyan la presencia de una timina alquilada con la falta de acoplamiento. La formación del O⁴, O²-etil-T indica cómo una lesión por falta de apareamiento en un sistema *in vitro* podría contribuir a la inducción de mutagenicidad por la acción del ENU (Castellani, 1998). Los agentes alquilantes monofuncionales simples tales como la N-metil-N-nitrosoguanidina (MNNG) y la ENU actúan sobre el átomo de oxígeno y de los anillos nitrogenados de las bases del ADN y de los grupos fosfato generando aductos, como la O⁶-alquilguanina, la cual llega a ser inactivada de forma irreversible por las metiltransferasas o las ADN glicosilasas (Castellani, 1998). La ENU induce mutación directa en fibroblastos humanos y altera el estado de la célula incrementando la frecuencia de mutaciones, así como la velocidad de error de apareamiento entre las bases nitrogenadas (Moses y Summers, 1988). Este compuesto es el único agente genotóxico del cual se tienen datos moleculares para las células germinales pre-meióticas en *Drosophila*. El análisis molecular de 11 mutantes de *Drosophila* reveló que presenta transiciones AT--GC con mayor frecuencia, generadas por la falta de apareamiento de la O⁶-etilguanina y transversiones AT--TA. Las 11 mutantes aisladas de las cepas celulares son del tipo de intercambio de un solo par de bases. Las transversiones podrían ser el resultado de sitios AP o por metilación de la O²-timina. La reparación por escisión de nucleótidos se considera eficiente contra sitios abásicos (AP). Por esta razón se asume que en las líneas celulares de espermatogonias de *Drosophila*, las cuales son altamente eficientes en el sistema de reparación por escisión, la lesión premutagénica ocurre predominantemente en el sitio de timinas (T) (Vogel *et al.* 1996). Sin embargo, en contraste con el papel predominante de ENU en la O-alquilación en la inducción de mutación de genes, no se sabe si esta lesión al ADN también es responsable de la mayoría de las aberraciones cromosómicas. Vogel y

Natarajan (1979, citado por Suzuki 1997) reportaron que la N-alquilación está asociada con la inducción de las aberraciones cromosómicas en *Drosophila melanogaster*. Kaina *et al.* (1993, citado por Suzuki 1997) reportaron que en células de hámster chino se sobre expresó la enzima O⁶-metilguanina-ADN metil transferasa, estos organismos son resistentes a la alquilación que induce intercambio de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas (Suzuki *et al.* 1997). La ENU se eligió como control positivo, dada su probada actividad genotóxica.

4.1.3. Mitomicina C.

La mitomicina C es un antibiótico potente que alquila al ADN, inhibe la síntesis de ADN, ARN, proteínas e interfiere con la división celular. La mitomicina C (MMC) actúa como un agente alquilante bi y trifuncional, su principal acción sucede durante las fases de división celular G₁ y S temprana. Induce mutación génica, deleción, no-disyunción y recombinación somática en *Drosophila*. Produce entrecruzamientos que se reparan por la acción cooperativa y secuencial del sistema de reparación por escisión y por recombinación (Nakamura *et al.* 1997). Se considera que los rompimientos de doble cadena resultan en aberraciones cromosómicas, lo que se ha asociado con la pérdida de cromosomas X en anillo en *Drosophila* (Ordaz, 1991). Evita la reparación post-replicativa por recombinación meiótica afectando a los genes *mei-9* en *Drosophila*, en moscas eficientes en reparación induce recombinación mitótica elevada en células somáticas e intercambio de cromátidas hermanas (Ordaz, 1991). La MMC impide la separación de los cromosomas durante el entrecruzamiento meiótico ya que reacciona como un promotor del entrecruzamiento de la molécula de ADN, bloqueando la replicación y la transcripción (Nickoloff y Hoekstra, 1998). Por su acción inhibitoria del ciclo celular se utiliza para el tratamiento de algunos cánceres. Por su actividad claramente recombinogénica, este compuesto fue seleccionado como control positivo para este trabajo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.1.4 Cianato de Sodio (NaOCN).

El NaOCN ha mostrado tener un efecto inhibitorio en ciertas variedades de tumores en roedores, tanto en la incorporación de aminoácidos a las proteínas (Boffa y Allfrey, 1978), como en la entrada de fosfatos en hepatomas transplantados, en los que también inhibe la síntesis de proteínas (Lea *et al.* 1975). En su forma tautómera ácida actúa como una proteína carbamylada, se ha probado que inhibe selectivamente la síntesis de proteínas y de ADN en una variedad de tumores (Allfrey *et al.* 1977). El efecto selectivo del NaOCN sobre la síntesis macromolecular en tumores no se ha observado en células en cultivo. Se ha contemplado la posibilidad de que tales diferencias en la respuesta de células tumorales al NaOCN *in vivo*, podrían estar relacionadas con el pH del medio en donde las células se exponen *in vitro* (Hu *et al.* 1988). El NaOCN provoca reducción de la velocidad de proliferación celular a una concentración de 0.25 mg de NaOCN/ml. A un pH bajo en los tejidos tumorales, podría resultar en una gran sensibilidad al efecto inhibitorio del NaOCN en la síntesis de macromoléculas (Hu *et al.* 1988). Allfrey *et al.* (1977) proveen evidencias de que el NaOCN puede ser activado por un extracto del hígado reaccionando con el NADPH para producir un compuesto tóxico a células neoplásicas (Boffa *et al.* 1978). El cianato tiene poco efecto o nulo en cultivos de células (HT-29), de adenoma de colon, en las células HeLa-53, en fibroblastos de pollo transformados con el virus del sarcoma de Rouse, células tumorales de ratón y células de hepatoma de Novikoff. Se requiere del metabolismo del cianato de sodio *in vitro* para que se pueda ver su efecto sobre las células cancerosas (Allfrey *et al.* 1977). Jiménez (1998) reportó que el NaOCN administrado subcrónicamente por vía alimentación a larvas de *Drosophila*, no parece ser mutagénico y en apariencia podría disminuir la genotoxicidad del NiSO₄, cuando se administra previamente. Debido a que la actividad del cianato de sodio se ubica más bien en la capacidad de actividad metabólica, fue seleccionado para este trabajo como control negativo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.2. Toma de muestras de agua.

El trabajo de campo se realizó del 27 de febrero al 3 de marzo de 1999 por una comisión del personal del laboratorio de Genética. Se seleccionaron los sitios a partir de las observaciones en campo; estos fueron: dos salmueras de pozos de extracción de vapor y agua de la CFE: "Pozo Az 26" y "Pozo Az 56"; dos manantiales sulfurosos: "Los Azufres" con un diámetro aproximado de 4,876.02 m² y el manantial "Yacuzi"; dos lagunas de agua dulce: "Tejamaniles" y "Llano Grande"; además un cuerpo de agua que se encuentra a 28.30 m del manantial sulfuroso "Los Azufres" denominado "El pozo", con una profundidad aproximada de 4.25 m (Figura 8).

Se colectaron dos muestras de agua superficial de los diferentes sitios utilizando frascos de plástico opaco (polipropileno) con capacidad de 1/2 y 1 L, previamente desionizados. Al momento de la toma de muestra se tomaron registros de temperatura, pH, oxígeno disuelto y sólidos disueltos, utilizando el equipo de análisis modelo Check-mate 90, Corning Incorporated CE. Cada muestra se conservó en hielo y se trasladó al laboratorio, una muestra se utilizó para aplicarse en la prueba de reparación de ADN con las larvas de la cruz *FM7/mei* y *Canton-S* y la otra muestra de agua se utilizó para realizar pruebas fisicoquímicas.

Muestras de agua	Sitios de colecta.
M-1	Tejamaniles
M-2	Pozo Az 26
M-3	Pozo Az 56 (salmuera)
M-4	"El pozo"
M-5	Pozo Az 34
M-6	"Los Azufres"
M-7	"Yacuzi"

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

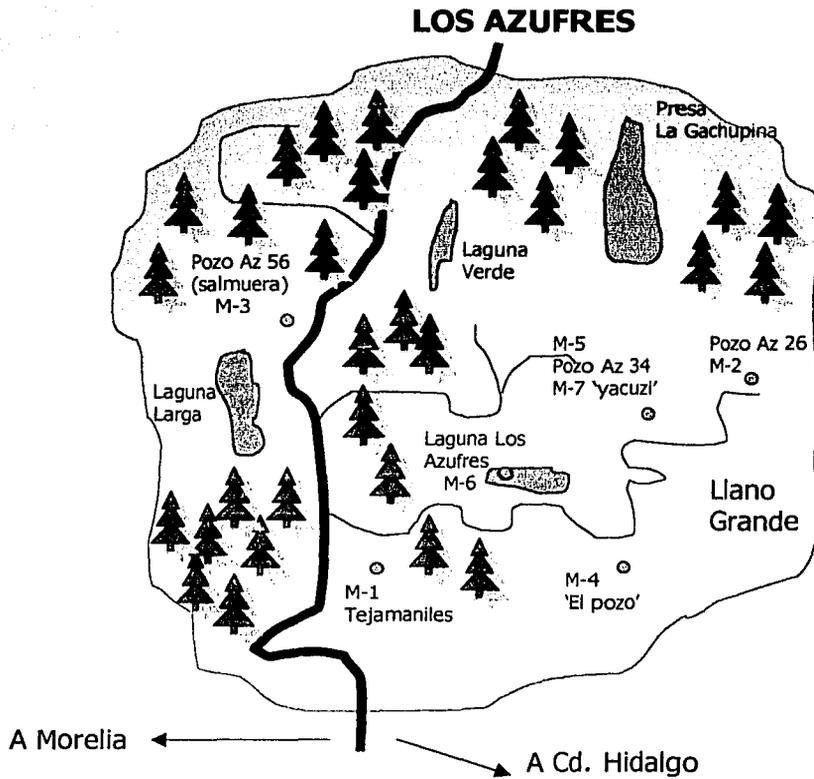


FIGURA 8. Mapa de la región de Los Azufres en el estado de Michoacán.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.3. Cruza utilizada para la prueba de reparación

Cruza: ♀ $FM7 / y^1 mei-9^a mei-41^{D5}$ X ♂ $y^1 mei-9^a mei-41^{D5} / Y$ (Fig. 11)

Los marcadores genéticos son (Lindsley y Zimm, 1992):

FM7 (First Chromosome Múltiple 7)

$FM7, y^{31d} sc^B w^a sn^{x2} v^{of} g^4 B^1 / y^1 mei-9^a mei-41^{D5}$ (refiriéndose solo como $FM7 / y^1 mei-9^a mei-41^{D5}$). Es un balanceador cromosómico que presenta múltiples inversiones en el cromosoma X, las cuales tienen el efecto de suprimir el entrecruzamiento de los cromosomas homólogos en la región implicada en el nuevo arreglo. Las hembras y los machos *FM7* son viables y fértiles. *FM7* se utiliza para balancear los genes o mantener intacto un segmento del cromosoma homólogo X. Además de los genes utilizados para balancear la cruce, *FM7* contiene otros genes marcadores fenotípicos que ayudan a distinguir a los homocigotos y heterocigotos entre sí (Lindsley y Zimm, 1992). Algunos de los genes mutantes que están presentes en *FM7* son:

y^{31d} - *yellow*, cuerpo amarillo;

sc^B - *rearreglo cromosómico por inversión*

w^a - *apricot*, ojos claros durazno;

sn^{x2} - *singed*, cerdas torcidas y acortadas;

v^{of} - *vermillon*, ojos rojos escarlata;

g^4 - *garnet*, ojos granate;

B^1 - *Bar*, ojos en barra.

La combinación de los marcadores w^a , v^{of} y g^4 da como resultado la ausencia de color de los ojos (blancos), los superíndices de los genes mutados indican el tipo de alelo para ese tipo de mutante.

Canton-S. Cepa de tipo silvestre.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

mei = meiotic- recombination-deficient (deficiente en recombinación meiótica).

mei-9: Es un alelo recesivo ligado al cromosoma X que provoca deficiencia en la reparación por escisión. Se localiza en las bandas 4B-4B6 del cromosoma X en 1-6.5 unidades de mapa (u.m.) (figura 9a y 9b). La presencia de este gene

en 1-6.5 unidades de mapa (u.m.) (figura 9a y 9b). La presencia de este gene reduce la recombinación meiótica en las células germinales de las hembras, provoca la segregación postmeiótica, recombinación mitótica en células somáticas y la no-disyunción, ya que el producto génico MEI-9 es uno de los muchos que participan en el proceso de división meiótica. La ausencia de este gen también incrementa la sensibilidad a agentes alquilantes, radiación ultravioleta, rayos X, nitrógeno mostaza y acetil-aminofluoreno. Presenta una alta frecuencia de rompimiento de cromosomas mitóticos. El alelo *mei-9^a* es una mutación meiótica altamente pleiotrópica. Inducido por metanosulfonato (MNS) (Sekelsky *et al.* 1995).

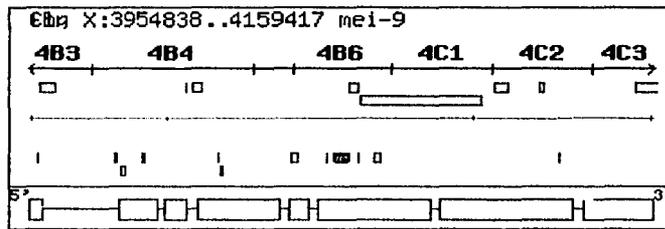


Figura 9a. Representación esquemática de la región cromosómica del alelo *mei-9* (color rojo) en un mapa de bandas politénicas en el cromosoma X de *Drosophila melanogaster* (tomado de Flybase.bio, 2003).

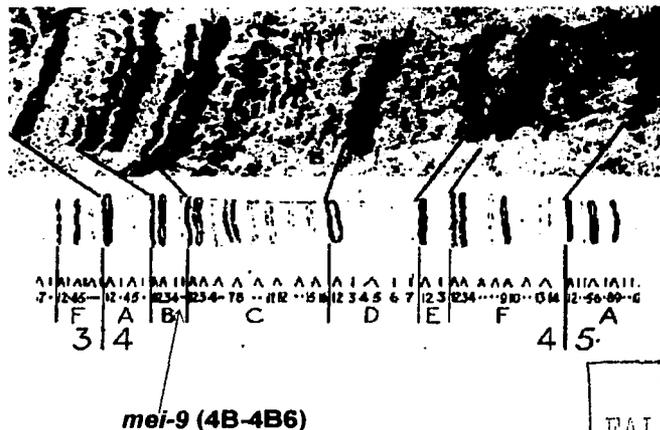


Figura 9b. Micrografía electrónica de una tinción diferencial de bandas del cromosoma politénico de X, mostrando la región que corresponde a la localización de los genes *mei-9* (4B-4B6) (tomado de Flybase.bio, 2003).

mei-41^{D5}: Alelo recesivo ligado al cromosoma X, le confiere deficiencia en la reparación postreplicativa. Se localiza en las bandas de los cromosomas politénicos de *Drosophila* en la región 14C4-14C6 del cromosoma citogenético, o a 1-54.2 unidades de mapa (u.m.) en el mapa genético (figura 10a y 10b). La deficiencia del gene *mei-41* les confiere esterilidad a las hembras, altera la recombinación meiótica ya que no se produce una de las múltiples proteínas que participan en la división meiótica también induce recombinación mitótica. La deficiencia de las proteínas MEI-41 en las moscas, incrementa la sensibilidad a agentes alquilantes, radiación ionizante y UV, rayos X, nitrógeno mostaza, acetil-aminofluoreno e hidroxiaurea. En portadoras reduce el intercambio meiótico e incrementa la no-disyunción. El alelo *D5* se asocia con la reducción de la fertilidad de las hembras (Sekelsky *et al.* 1995).

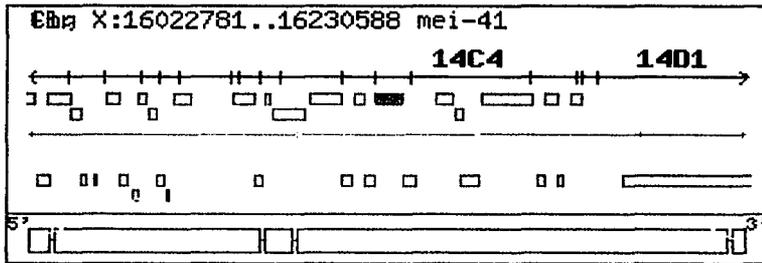


Figura 10a. Representación esquemática de la región cromosómica del alelo *mei-41* (14C4-14C6) en un mapa de bandas politénicas en el cromosoma X de *Drosophila melanogaster*, la región en rojo indica la posición del gene y la amplificación del mismo en color gris (tomado de Flybase.bio, 2003).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



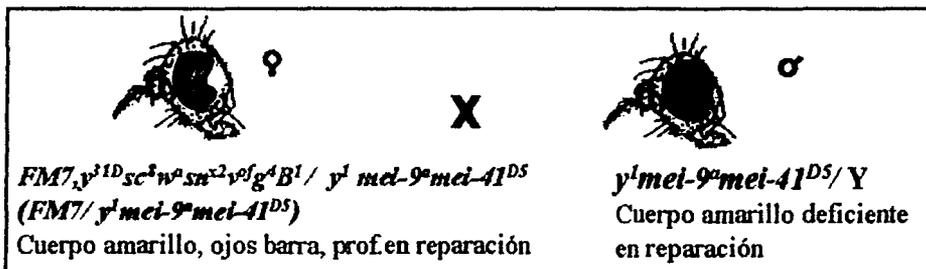
mei-41 (14C4-14C6)

Figura 10b. Descripción detallada de tres diferentes micrografías electrónicas de una tinción diferencial de bandas de cromosomas politénico X, mostrando la región que corresponde a la localización de los genes *mei-41* (14C4-14C6) (tomado de Flybase.bio, 2003).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**Cruza empleada en la prueba de reparación del ADN
en *Drosophila melanogaster*.**

P



F₁

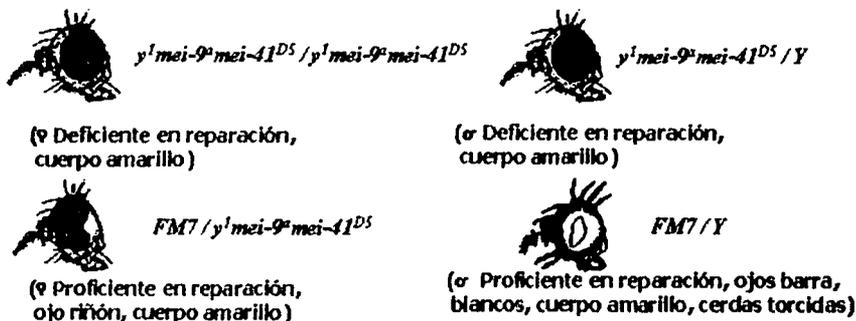


FIGURA 11. Cruza de la prueba de reparación de ADN (Modificada de Rivas, 1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Línea de moscas testigo

Debido al arreglo de la cruza utilizada en la prueba de reparación debe emplearse el cromosoma balanceador *FM7* que evita la segregación de los marcadores genéticos. El diagnóstico de la actividad genotóxica se realiza por la comparación de los IS de las moscas deficientes con respecto a sus contrapartes eficientes en reparación que se obtienen a partir de la misma cruza. Sin embargo, una limitación de esta prueba es que en nuestro grupo hemos obtenido evidencias de que la presencia del cromosoma balanceador en las moscas eficientes en reparación (portadoras de *FM7*) parece interferir con la reparación post-replicativa del ADN. Por lo anterior, se consideró conveniente utilizar en este trabajo a una línea de moscas adicional, la tipo silvestre *Canton-S*, la cual está libre de inversiones y mutaciones. La comparación entre la sobrevivencia de las moscas silvestres *Canton-S* y las proficientes en reparación (*FM7*) informa de manera indirecta sobre la posible interferencia del arreglo del cromosoma *FM7* con la reparación post-replicativa.

Todas las líneas de moscas utilizadas en esta tesis fueron proporcionadas por el Banco de Moscas de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.4 Concentraciones y tratamiento

Todas las concentraciones se obtuvieron mediante la dilución sucesiva a partir de una solución concentrada (tabla 2). Se agregaron 4 ml de cada dilución a tubos de 12.5 ml de capacidad que contenían 1g de medio instantáneo (Carolina Biological Supply). Cada concentración y dilución se probó por triplicado.

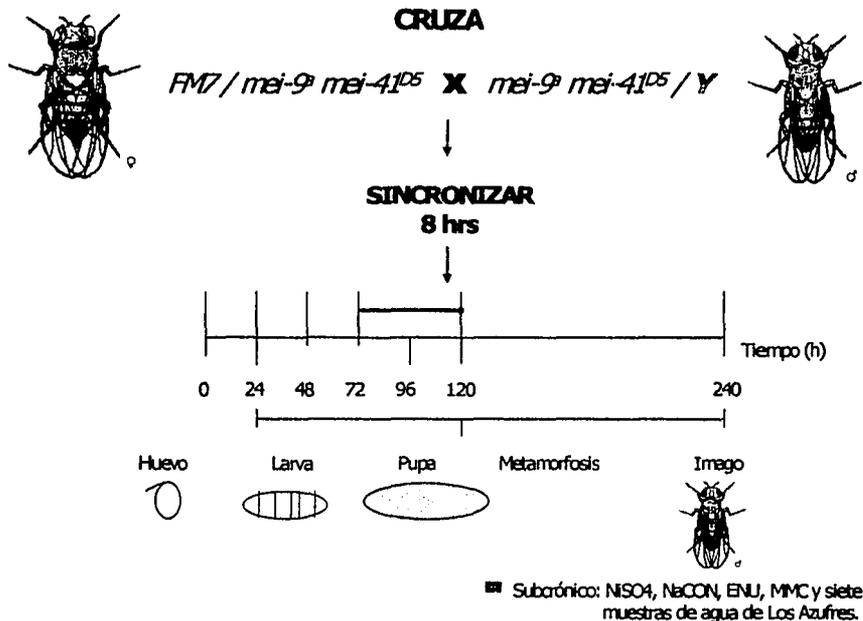
Tabla 2. Diluciones realizadas con las muestras de agua y con los compuestos utilizados en la prueba de reparación del ADN *in vivo* de *Drosophila melanogaster*.

TRATAMIENTO	COMPUESTOS	CONCENTRACIONES [mM]
Testigo 1	Etilnitrosourea	0.125, 0.063, 0.031, 0.016, 0.008, 0.004, 0.002, 0.001, 0.0005, 0.00025
Testigo 2	Mitomicina C	0.125, 0.063, 0.031, 0.016, 0.008, 0.004, 0.002, 0.001, 0.0005
Testigo 3	Sulfato de níquel (NiSO ₄)	0.65, 0.32, 0.16, 0.08, 0.04, 0.02
Testigo 4	Cianato de sodio (NaOCN)	15.37, 7.68, 1.54, 0.15
Muestras de agua	Agua colectada (Siete muestras)	100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0 [%]
Disolvente	Agua Destilada	Como disolvente y control negativo se utilizó agua destilada.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Obtención de larvas y tratamiento

Las cruces de *FM7/mei* y *Canton-S*, se colocaron en medio fresco, para permitir que ovopositaran durante 8 horas (sincronización de huevecillos). Después de 72 horas se recuperaron las larvas por diferencia de densidad en una solución de sacarosa al 20% y utilizando un embudo de separación con un diámetro de 4 mm por el que pasan las larvas, mismas que se recuperaron en un tamiz de malla muy fina. Se depositó una cantidad similar de larvas en cada tubo (Figura 12 y 13), aproximadamente 100 larvas y se mantuvieron en los tubos alimentándose del medio hasta que llegaron hasta el estadio de pupa (exposición subcrónica), durante el resto del desarrollo los tratamientos se incubaron a 25°C hasta que emergieron los adultos, los cuales se recuperaron, contaron y clasificaron por fenotipos y por sexo.



Diseño experimental en *Drosophila melanogaster*.

Figura 12. Protocolo experimental (Modificada de Muñoz A. 1998).

DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA PRUEBA DE REPARACIÓN

in vivo DEL ADN EN *Drosophila melanogaster*

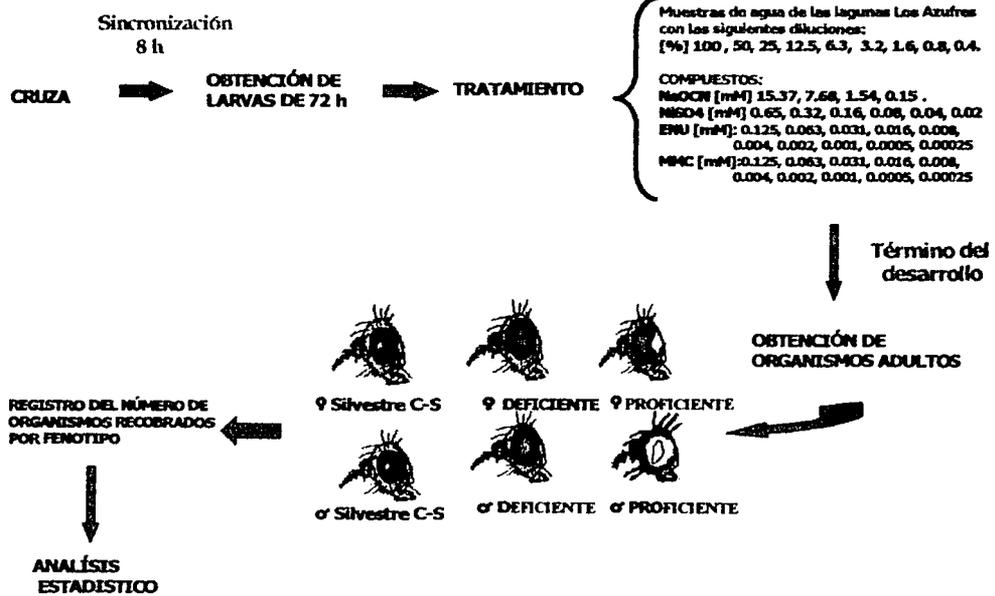


Figura 13. Diseño experimental en la prueba de reparación del DNA en *Drosophila melanogaster* (Tomadas de Rivas, 1999).

Procesamiento de datos.

Con los datos totales obtenidos para las dos líneas (FM7/mei y Canton-S) se calculó el índice de sobrevivencia por probabilidad de eventos, en donde se determina el promedio del total de organismos adultos de los lotes testigo por fenotipo y por sexo de cada experimento y estos se comparan con el 100% de organismos adultos recuperados, las frecuencias de cada concentración se determinan con base al testigo.

Cálculo del Índice de sobrevivencia (IS)

DATOS TOTALES POR EXPERIMENTO (Por triplicado) DE LA MUESTRA M-2

[%]	Hembras Efic.	Machos Efic.	Hembras Def	Machos Def	Hembras C-s	Machos C-s
0	52	11	37	31	127	108
0	52	11	41	22	84	82
0	39	11	26	16	0	0
0.4	32	1	36	18	101	75
0.4	41	0	39	28	31	44
0.4	15	6	23	14	0	0
0.8	14	0	19	1	99	96
0.8	47	0	25	23	93	101
0.8	22	1	18	15	0	0
1.6	39	0	39	24	35	58
1.6	43	0	30	25	40	41
1.6	39	5	20	23	0	0
3.2	52	0	46	26	59	101
3.2	35	0	34	25	44	70
3.2	27	9	30	29	0	0
6.3	65	0	39	42	122	82
6.3	60	0	59	33	128	128
6.3	40	9	32	21	0	0
12.5	57	1	42	39	99	71
12.5	56	0	38	36	87	60
12.5	22	9	35	24	0	0
25	50	0	37	25	56	44
25	35	0	31	24	17	35
25	23	0	31	20	0	0
50	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Testigo prom. / Testigo prom. = 1 (100%)

$52 + 52 + 39 = 143 / 3 = 48$

testigo promedio = 48

Cálculo del IS del Testigo: $48 / 48 = 1$

Cálculo del IS de la conc. 2 (0.4) de las Hembras Efic.:

$32 + 41 + 15 = 88 / 3 = 29$

IS = $29 / 48 = 0.6$

De la misma forma se calculó el índice sexual de machos el cual nos permite observar si existe alguna diferencia en la sobrevivencia entre ambos sexos por efecto del tratamiento, se calcula sumando el total de organismos adultos de ambos sexos y se divide entre los machos obtenidos en cada concentración.

Cálculo del Índice Sexual (ISx) de los datos de la tabla anterior:

Ejemplo del Testigo de los organismos Efic.

Promedio total de ambos sexos = 59

Promedio total de los Machos Efic. = 11

Se realizaron análisis de varianza para saber si existían diferencias significativas entre cada uno de los experimentos realizados dentro de cada tratamiento ya que todos los experimentos se realizaron por triplicado. También se realizaron análisis de varianza de cada fenotipo (*Cantón-S*, proficientes y deficientes de cada sexo) para comprobar la presencia de diferencias significativas entre las curvas de dosis-respuesta (índices de sobrevivencia) de los fenotipos analizados con respecto a cada uno de los tratamientos realizados. En caso de encontrar diferencias significativas se procedió a aplicar la prueba de Tukey para ubicar la razón de la diferencia o la magnitud de la diferencia entre los fenotipos, con relación a una media fenotípica entre todas las curvas de sobrevivencia observadas (tablas de medias de fenotipos de Tukey).

V. RESULTADOS.

Trabajo de Campo.

Los parámetros fisicoquímicos que se midieron fueron temperatura, pH, oxígeno (ml/L) y sodio disuelto (mS).

Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos en los diferentes sitios de muestreo de agua del campo geotérmico "Los Azufres".

SITIO	Temperatura (°C)	pH	Oxígeno disuelto (ml/ l)	sodio disuelto (mS)
Tejamaniles	13.85	7.29	*	*
Pozo Az 26	45.9	6.99	2.4	8.78
Pozo Az 56	35.4	6.56	0.7	*
"El pozo"	29	2.64	0.5	0
"Los Azufres"	28.1	2.83	*	1601
"Yacuzi"	38.6	2.5	0.3	0.1

* Sin registro

Trabajo de Laboratorio.

La tabla 4 muestra el índice de sobrevivencia (IS) y el índice sexual obtenidos en cada uno de los tratamientos. Los resultados de los tratamientos con los controles negativos, positivos y las muestras de agua probados se presentan en diferentes gráficas. Con base en los índices de sobrevivencia de las moscas de tipo silvestre, los resultados se clasificaron en varias categorías, dependiendo de la toxicidad encontrada. Los análisis de varianza de cada tratamiento se muestran en la Tabla 5.

En todos los tratamientos, de todos lo fenotipos analizados, el índice de sobrevivencia de los machos proficientes en reparación fue significativamente menor, comparado con el de los otros fenotipos (ANOVA, $P < 0.05$) (Tablas 4), por lo que en las comparaciones, éstos se tratarán por separado. Las diferencias detectadas se confirmaron a través del análisis de Tukey ($P < 0.05$) (Tablas 6 a la 16).

TABLA 4. RESULTADOS DE LOS TRATAMIENTOS REALIZADOS CON LA PRUEBA DE REPARACION *in vivo* DEL ADN EN *Drosophila melanogaster*.

TRATAMIENTO	CONCENTRACION [mM]	INDICES DE SOBREVIVENCIA						INDICE SEXUAL		
		ORGANISMOS PROCEDENTES		ORGANISMOS DERIVANTES		SILVESTRES C-5		MACHOS		
		HEMBRA	MACHO	HEMBRA	MACHO	HEMBRA	MACHO	PROFICIENTE	DEFICIENTE	CANTON-S
NaOCN	0	1,00	1,00	1,00	1	1,00	1,00	0,2	0,41	0,52
	0,154	0,46	0,36	0,65	0,49	0,88	0,83	0,23	0,45	0,5
	1,537	0,64	0,39	0,65	0,56	1,05	1,05	0,18	0,46	0,52
	7,68	0,56	0,65	0,69	0,63	1,00	0,94	0,29	0,52	0,51
	15,37	0,72	0,50	0,55	0,59	1,12	1,13	0,23	0,57	0,52
NiSO4	0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,13	0,52	0,46
	0,02	0,62	0,00	0,44	0,65	0,87	0,85	0	0,52	0,46
	0,04	0,77	0,00	0,61	0,82	1,03	1,04	0,03	0,46	0,47
	0,08	0,95	0,00	0,77	0,96	0,94	0,83	0,06	0,5	0,44
	0,16	0,50	0,00	0,39	0,58	0,87	1,14	0,01	0,51	0,54
	0,32	0,75	0,00	0,87	0,72	0,93	1,02	0,01	0,42	0,48
	0,65	0,57	0,22	0,56	0,44	0,92	1,01	0,02	0,46	0,49
ENU	0	1	1	1	1	1	1	0,06	0,49	0,49
	0,00025	0,82	0,60	0,75	0,80	0,52	0,74	0,05	0,51	0,58
	0,0005	0,85	0,27	0,82	0,84	0,60	0,73	0,02	0,50	0,54
	0,001	0,73	0,33	0,74	0,80	0,71	0,71	0,03	0,51	0,49
	0,002	0,70	0,60	0,70	0,73	0,78	0,73	0,05	0,50	0,47
	0,004	0,77	0,20	0,56	0,65	0,62	0,70	0,02	0,53	0,52
	0,008	0,67	0,13	0,44	0,48	0,70	0,75	0,01	0,51	0,51
	0,016	0,73	0	0,29	0,27	0,67	0,57	0,00	0,47	0,45
	0,031	0,76	0,20	0,04	0,06	0,56	0,53	0,02	0,57	0,48
	0,063	0,80	0,07	0,01	0,00	0,65	0,77	0,01	0,25	0,53
	0,125	0,86	0,07	0	0	0,48	0,49	0,01	0,00	0,49

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Continuación Tabla 4.

TRATAMIENTO	CONCENTRACION [mM]	INDICES DE SOBREVIVENCIA						INDICE SEXUAL		
		ORGANISMOS PROFICIENTES		ORGANISMOS DEFICIENTES		SILVESTRES C-S		MACHOS PROF	MACHOS DEF	MACHOS C-S
		HEMBRA	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS			
MMC	0	1	1	1	1	1	1	0,12	0,45	0,48
	0,0005	0,79	0,38	0,76	0,79	0,84	0,82	0,06	0,45	0,47
	0,001	0,63	0,70	0,76	0,80	0,76	0,71	0,13	0,46	0,47
	0,002	0,59	0,95	0,64	0,70	0,75	0,67	0,17	0,47	0,46
	0,004	0,48	0,24	0,15	0,14	0,67	0,72	0,06	0,43	0,50
	0,008	0,66	0,32	0	0	0,79	0,68	0,06	0,50	0,44
	0,016	0,76	0,22	0	0	0,75	0,78	0,04	0	0,49
	0,031	0,68	0,16	0	0	0,64	0,71	0,03	0	0,51
	0,063	0,07	0,03	0	0	0,30	0,29	0,05	0	0,47
	0,125	0,01	0	0	0	0,01	0,01	0	0	0,33
		[%]								
M-1 Tejamaniles	0	1,00	1,00	1,00	1,00	1	1,00	0,4	0,41	0,55
	0,4	0,92	0,44	0,60	0,88	0,72	0,69	0,23	0,49	0,54
	0,8	0,61	0,63	0,56	0,66	1,15	1,06	0,41	0,48	0,53
	1,6	1,08	0,67	1,17	1,13	1,35	1,07	0,36	0,43	0,49
	3,2	0,69	0,76	0,58	0,90	0,96	0,98	0,44	0,5	0,55
	6,3	0,58	0,49	0,73	0,72	0,80	0,80	0,34	0,46	0,55
	12,5	0,70	0,54	0,96	1,06	1,14	0,88	0,34	0,41	0,49
	25,0	0,97	0,65	0,86	1,39	0,93	0,75	0,27	0,56	0,5
	50,0	0,59	0,82	0,81	0,88	0,88	0,87	0,45	0,48	0,55
	100,0	0,94	0,79	0,86	1,20	0,63	0,57	0,38	0,5	0,52
	M-2 Pozo Az 26	0	1	1,00	1,00	1,00	1	1	0,08	0,44
0,4		0,72	0,21	0,94	0,91	0,58	0,62	0,07	0,38	0,47
0,8		0,76	0,03	0,61	0,67	0,94	1,06	0,01	0,38	0,5
1,6		1,18	0,15	0,85	1,12	0,38	0,52	0,04	0,51	0,57
3,2		1,01	0,27	1,08	1,26	0,49	0,89	0,07	0,41	0,6
6,3		1,47	0,27	1,24	1,39	1,24	1,16	0,06	0,44	0,46
12,5		1,09	0,30	1,14	1,46	0,91	0,69	0,07	0,44	0,41
25,0		0,93	0,00	0,98	1,05	0,32	0,42	0	0,44	0,52
50,0		0	0,00	0,00	0,00	0	0	0	0	0
100,0		0	0,00	0,00	0,00	0	0	0	0	0

TESTES CON FALLA DE ORIGEN

Continuación Tabla 4.

TRATAMIENTO	CONCENTRACION [%]	INDICES DE SOBREVIVENCIA						INDICE SEXUAL		
		ORGANISMOS PROFICIENTES		ORGANISMOS DEFICIENTES		SILVESTRES C-S		MACHOS PROF	MACHOS DEF	MACHOS C-S
		HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS			
M-3 Pozo Az 56	0	1,00	1,00	1,00	1,00	1	1,00	0,36	0,53	0,58
	0,4	0,95	0,37	0,79	0,64	0,94	0,54	0,3	0,54	0,45
	0,8	1,11	0,80	0,94	0,76	0,91	0,68	0,32	0,48	0,5
	1,6	1,21	0,84	1,14	1,02	0,94	0,64	0,31	0,51	0,5
	3,2	1,06	0,83	1,07	0,84	1,02	0,65	0,39	0,47	0,46
	6,3	0,85	0,51	1,03	1,03	1,41	0,96	0,29	0,54	0,47
	12,5	0,89	0,78	0,93	0,87	1,32	0,95	0,42	0,52	0,48
	25,0	0,68	0,06	0,60	0,32	0,31	0,23	0,08	0,37	0,44
	50,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0,00	0	0	0
	100,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0,00	0	0	0
M-4 "EL POZO"	0	1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,41	0,45	0,51
	0,4	0,70	0,61	0,75	0,80	0,57	0,54	0,43	0,48	0,51
	0,8	1,03	0,62	0,88	0,92	0,63	0,63	0,38	0,48	0,52
	1,6	0,90	0,41	0,67	0,90	0,82	0,75	0,25	0,51	0,52
	3,2	0,76	0,40	0,92	1,11	0,62	0,53	0,28	0,49	0,48
	6,3	0,79	0,80	0,89	1,21	0,52	0,49	0,43	0,49	0,5
	12,5	0,85	0,60	0,80	0,84	0,65	0,81	0,35	0,46	0,6
	25,0	1,04	0,66	0,87	1,20	0,99	0,77	0,38	0,51	0,49
	50,0	0,99	0,67	1,09	1,24	0,62	0,59	0,32	0,47	0,5
	100,0	0,97	0,40	0,74	1,04	0,80	0,72	0,29	0,54	0,53
M-5 Pozo Az 34	0	1	1,00	1	1	1	1	0,28	0,52	0,51
	0,4	0,57	0,38	0,77	0,45	0,33	0,62	0,25	0,42	0,67
	0,8	1,04	0,65	0,90	0,82	1,01	0,90	0,23	0,52	0,48
	1,6	0,92	0,83	0,88	0,74	1,07	1,10	0,27	0,5	0,51
	3,2	0,84	0,19	0,86	0,56	1,03	0,96	0,13	0,42	0,49
	6,3	1,01	0,43	0,83	0,68	0,90	1,04	0,19	0,51	0,54
	12,5	0,95	0,43	0,86	1,02	0,99	0,82	0,2	0,52	0,46
	25,0	0,90	0,25	0,86	0,74	0,92	0,80	0,12	0,48	0,47
	50,0	0,96	0,32	0,99	0,82	1,00	0,80	0,13	0,45	0,46
	100,0	1,01	0,39	0,94	0,81	0,87	0,90	0,14	0,5	0,51

Continuación Tabla 4.

TRATAMIENTO	CONCENTRACION (%)	INDICES DE SOBREVIVENCIA						INDICE SEXUAL		
		ORGANISMOS PROFICIENTES		ORGANISMOS DEFICIENTES		SILVESTRES C-S		MACHOS PROF	MACHOS DEF	MACHOS C-S
		HEMBRA	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS			
M-6 "LOS AZUFRES"	0	1	1,00	1,00	1	1	1	0,07	0,44	0,48
	0,4	0,49	0,00	0,48	0,43	0,99	0,83	0	0,38	0,43
	0,8	1,00	0,00	0,57	0,73	0,82	0,70	0	0,44	0,45
	1,6	0,54	0,50	0,38	0,30	0,74	0,60	0,09	0,36	0,44
	3,2	0,97	0,25	0,88	0,96	0,84	0,87	0,03	0,42	0,49
	6,3	0,66	0,25	0,49	0,50	0,80	0,83	0,02	0,42	0,49
	12,5	0,75	0,00	0,67	0,40	0,88	0,87	0	0,29	0,48
	25,0	1,04	0,00	0,93	1,25	0,69	0,59	0	0,48	0,44
	50,0	0,73	0,00	0,55	0,54	0,81	0,98	0	0,39	0,53
100,0	0,99	0,25	0,64	0,90	0,87	0,76	0	0,5	0,45	
M-7 "YACUZI"	0	1	1,00	1,00	1,00	1	1,00	0,35	0,54	0,54
	0,4	0,65	0,05	0,59	0,56	0,91	0,71	0,04	0,49	0,48
	0,8	0,72	0,40	0,83	0,67	0,95	1,02	0,22	0,45	0,56
	1,6	0,76	0,15	0,58	0,69	0,79	0,87	0,1	0,55	0,56
	3,2	0,81	0,25	0,79	0,74	1,12	0,90	0,14	0,49	0,48
	6,3	0,67	0,20	1,06	0,62	0,66	0,47	0,08	0,41	0,46
	12,5	1,03	0,45	0,88	0,94	0,44	0,32	0,16	0,52	0,45
	25,0	1,23	0,20	0,91	0,71	0,54	0,39	0,09	0,45	0,46
	50,0	1,28	0,55	1,16	0,96	0,97	0,66	0,18	0,51	0,44
100,0	0,81	0,35	0,59	0,57	1,12	0,84	0,18	0,49	0,47	

TESIS CON
 FALTA DE ORIGEN

TABLA 5. RESULTADOS DEL ANALISIS DE VARIANZA DE LAS MUESTRAS PROBADAS

ANOVA de dos vías: Supervivencia contra Concentración y Fenotipos para $p < 0.05$

MUESTRA	ORIGEN	GL	SS	MS	F	F Crítica	Probab.
NaOCN	Concentración	4	1,247	0.312	7.03	2.53	0
	FENOTIPO	5	2,329	0.466	10.51	2.37	0
	Interacción	20	0.979	0.049	1.11	1.75	0.369
	Error	60	2,659	0.0443			
	Total	89	7,215				No Significativo
NISO4	Concentración	6	2,314	0.386	7.2	2.25	0
	FENOTIPO	5	8,757	1.751	32.7	2.37	0
	Interacción	30	2,757	0.092	1.72	1.65	0.028
	Error	84	4,499	0.0536			
	Total	125	18,326				
ENU	Concentración	10	9,692	0.969	16.34	1.83	0
	FENOTIPO	5	8,348	1.669	28.14	2.21	0
	Interacción	50	6,502	0.130	2.19	1.39	0
	Error	198	11,748	0.0593			
	Total	263	36,291				
MMC	Concentración	9	10,013	1.113	35.97	2.04	0
	FENOTIPO	5	2,233	0.447	14.44	14.44	0
	Interacción	45	3,349	0.074	2.41	2.41	0.001
	Error	60	1,856	0.0309			
	Total	119	17,451				No Significativo
M-1 "Tejamanles"	Concentración	9	1,6795	0.1866	1.96	2.04	0.06
	FENOTIPO	5	1,3038	0.2608	2.74	2.37	0.027
	Interacción	45	2,4227	0.0538	0.57	1.59	0.976
	Error	60	5,7115	0.0952			
	Total	119	11,1174				No Significativo
M-2 POZO Az 26	Concentración	9	26,499	2,944	38.03	1.96	0
	FENOTIPO	5	11,467	2,296	29.63	2.29	0
	Interacción	45	9,824	0.218	2.82	1.5	0
	Error	120	9,289	0.077			
	Total	179	57,081				
M-3 POZO Az 56	Concentración	9	26,484	2,943	87.86	1.96	0
	FENOTIPO	5	1,772	0.355	10.58	2.29	0
	Interacción	45	2.84	0.063	1.88	1.5	0.003
	Error	120	4,019	0.034			
	Total	179	35,116				
M-4 "EL POZO"	Concentración	9	1,601	0.178	4.51	1.96	0
	FENOTIPO	5	3,353	0.671	16.98	2.29	0
	Interacción	45	2,285	0.051	1.29	1.5	0.14
	Error	120	4,738	0.0395			
	Total	179	11,976				No Significativo
M-5 POZO Az 34	Concentración	9	2,554	0.284	5.06	1.96	0
	FENOTIPO	5	4,305	0.861	15.34	2.29	0
	Interacción	45	2,421	0.054	0.96	1.5	0.55
	Error	120	6,734	0.056			
	Total	179	16,013				No Significativo
M-6 "LOS AZUFRES"	Concentración	9	2,629	0.292	5.78	2.04	0
	FENOTIPO	5	4,939	0.988	19.56	2.37	0
	Interacción	45	3,144	0.0699	1.38	1.59	0.12
	Error	60	3,031	0.0505			
	Total	119	13,744				No Significativo
M-7 "YACUZI"	Concentración	9	2,014	0.224	3.13	2.04	0
	FENOTIPO	5	3,808	0.762	10.66	2.37	0
	Interacción	45	3,603	0.080	1.12	1.59	0.338
	Error	60	4,289	0.0715			
	Total	119	13,714				No Significativo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Compuestos utilizados:

Las concentraciones seleccionadas de los compuestos, NaOCN y NiSO₄ (Gráficas 1 y 2) no resultaron tóxicas para las moscas de tipo silvestre, como puede apreciarse en los índices de sobrevivencia (IS) obtenidos para cada compuesto, sin embargo para las moscas proficientes y las deficientes en reparación, sólo se recuperó alrededor del 60 % de las moscas expuestas al NaOCN y al NiSO₄ ($P < 0.05$); además, en el caso del segundo compuesto, la variabilidad encontrada fue ligeramente mayor. La comparación de los IS promedio confirmó que las moscas silvestres respondieron de manera diferente a los otros fenotipos en el caso de ambos compuestos, pero en el tratamiento con sulfato de níquel se encontraron además diferencias en el IS de los machos proficientes (Tukey, $P < 0.05$) (tabla 6 y 7). En general, la respuesta obtenida para las moscas proficientes y deficientes en reparación fue similar.

La Etil-Nitrosourea (ENU) (Gráfica 3) fue detectada como un compuesto que induce lesiones directas al ADN, encontrándose un efecto tóxico conforme se incrementó la concentración. Al comparar los IS se ubicaron dos grupos: el primero formado por hembras y machos silvestres y hembras proficientes en reparación, para los que los IS fueron mayores comparados con los otros fenotipos; y el de las moscas deficientes en reparación y los machos proficientes en reparación, para los que las concentraciones seleccionadas resultaron más tóxicas, particularmente a partir de 0.002 mM. A concentraciones mayores a la indicada se recuperaron muy pocos organismos deficientes en reparación (Tabla 4). La variación en el IS con respecto a la concentración, sin importar el fenotipo de las moscas, mostró diferentes grupos dependiendo del nivel de la concentración: el IS de las moscas del lote testigo (agua destilada) el cual fue diferente del obtenido para las moscas expuestas a cualquier concentración; en otro grupo, el IS de las moscas expuestas al intervalo de concentración entre 0.00025 a 0.008 mM fue similar entre sí, pero diferente del IS del bloque formado por las concentraciones 0.016 a 0.125 mM, también se encontraron diferencias en el IS de moscas expuestas a 0.004 y 0.125 mM (Tablas 8b). Con lo que confirmamos que la concentración de este compuesto

(ENU) si afecta a los organismos conforme esta se incrementa en cualquiera de los fenotipos estudiados en este trabajo.

También la MMC fue detectada como un compuesto que induce lesiones directas al DNA, pero la toxicidad del compuesto fue general para todas las moscas en las dos concentraciones más altas, sin importar el fenotipo (Tabla 4, Gráfica 4). El IS de las moscas silvestres y de las hembras proficientes fue similar y gradualmente menor, conforme se incrementó la concentración. En el caso de los machos proficientes, el IS fue del 30 % o menor a partir de 0.004 mM y no se recobraron organismos en la concentración 0.125 mM. Las moscas deficientes en reparación tuvieron un IS cercano al 15 % a partir de 0.004 mM y no se recobraron sobrevivientes a partir de 0.008 mM.

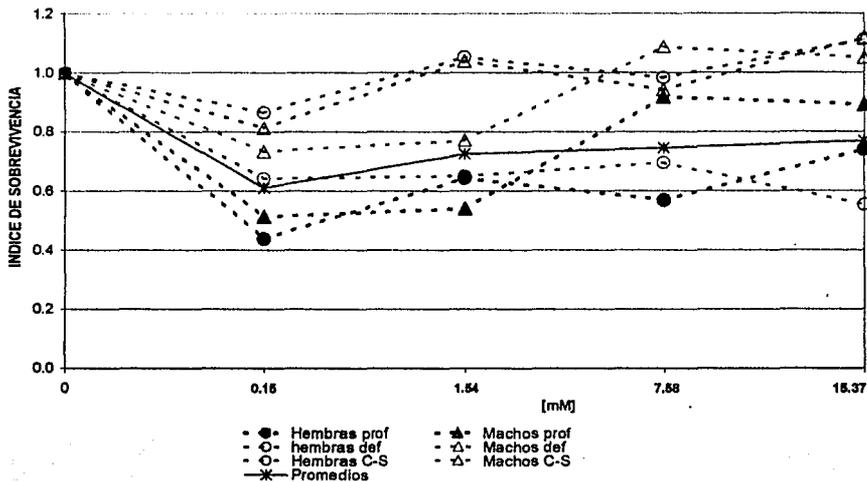
Al comparar el efecto de la concentración, sin importar el fenotipo, se encontraron tres grupos entre los que el IS fue diferente: el primer grupo incluye a los lotes expuestos de 0 a 0.002 mM; el segundo va de 0.004 a 0.031 mM y el tercero está formado por los IS a las concentraciones 0.063 y 0.125 mM. El IS fue menor conforme se incrementó la concentración de MMC (Tabla 9b).

Los resultados de las muestras de aguas se presentan por grupos, dependiendo de la toxicidad encontrada:

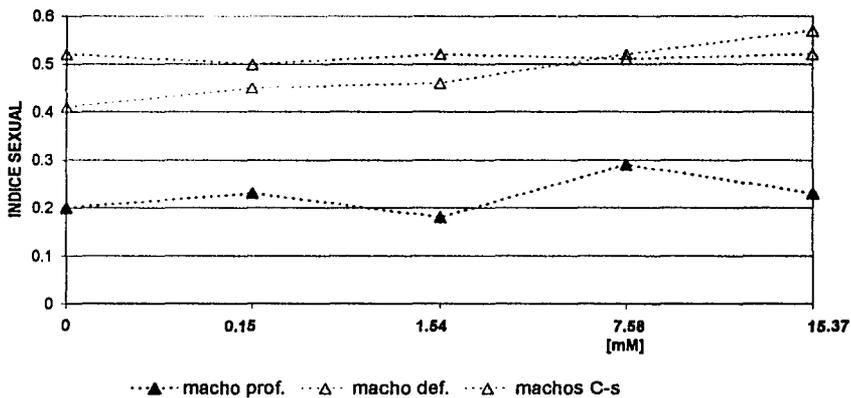
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 1. Prueba de reparación de daño a ADN en *Drosophila melanogaster* tratadas con Cianato de Sodio (NaOCN).

a) Índice de Sobrevivencia



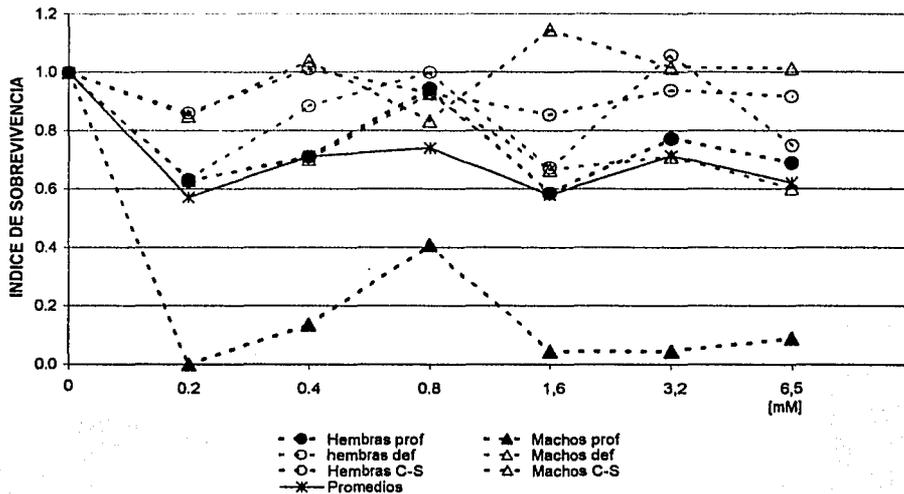
b) INDICE SEXUAL (MACHOS)



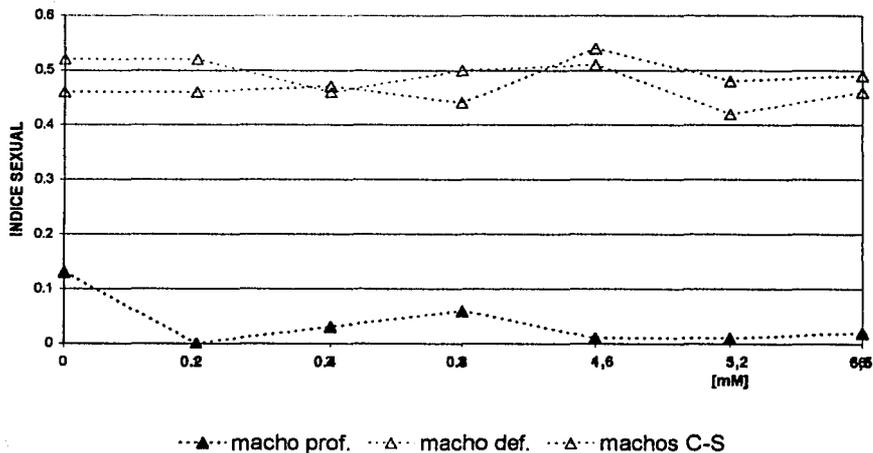
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 2. Prueba de reparación del ADN en *Drosophila melanogaster* tratadas con Sulfato de Níquel (NiSO₄).

a) Índice de Sobrevivencia



b) INDICE SEXUAL (MACHOS)



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TABLA 6a. ANALISIS DE MEDIAS DE TUKEY PARA FENOTIPOS DEL COMPUESTO NaOCN (DHT) p<0.05

FENOTIPOS	F2 Machos prof	F1 Hembras prof	F3 Hembras Def	F4 Machos Def	F6 Machos C-S	F5 Hembras C-S
IS/ Promed.	0,580	0,676	0,709	0,849	0,992	1,010
F2		NS	NS	NS	*	*
F1	NS		NS	NS	*	*
F3	NS	NS		NS	*	*
F4	NS	NS	NS		*	*
F6	*	*	*	*		NS
F5	*	*	*	*	NS	

Valor de Tukey = DHT = 0.228

* = Valores Significativos, NS = No Significativo

TABLA 6b. ANALISIS DE MEDIAS DE TUKEY PARA CONCENTRACIONES DEL COMPUESTOS NaOCN (DHT) p<0.05.

(Mm)	C2 0,154	C3 1,537	C4 7,68	C5 15,37	C1 0
IS/prom	0,61	0,73	0,75	0,77	1
C2		NS	NS	NS	*
C3	NS		NS	NS	*
C4	NS	NS		NS	*
C5	NS	NS	NS		*
C1	*	*	*	*	

* = Valores Significativos,

NS = No Significativo

Valor de Tukey = DHT = 0.198

TABLA 7a. ANALISIS DE MEDIAS DE TUKEY PARA FENOTIPOS DEL COMPUESTO NISO4 (DHT) p<0.05

FENOTIPOS	F2 Machos prof	F3 Hembras Def	F1 Hembras prof	F4 Machos Def	F5 Hembras C-S	F6 Machos C-S
IS/ Promed.	0,175	0,662	0,736	0,738	0,936	0,986
F2		*	*	*	*	*
F3	*		NS	NS	*	*
F1	*	NS		NS	NS	*
F4	*	NS	NS		NS	*
F5	*	*	NS	NS		NS
F6	*	*	*	*	NS	

DHT = 0,210

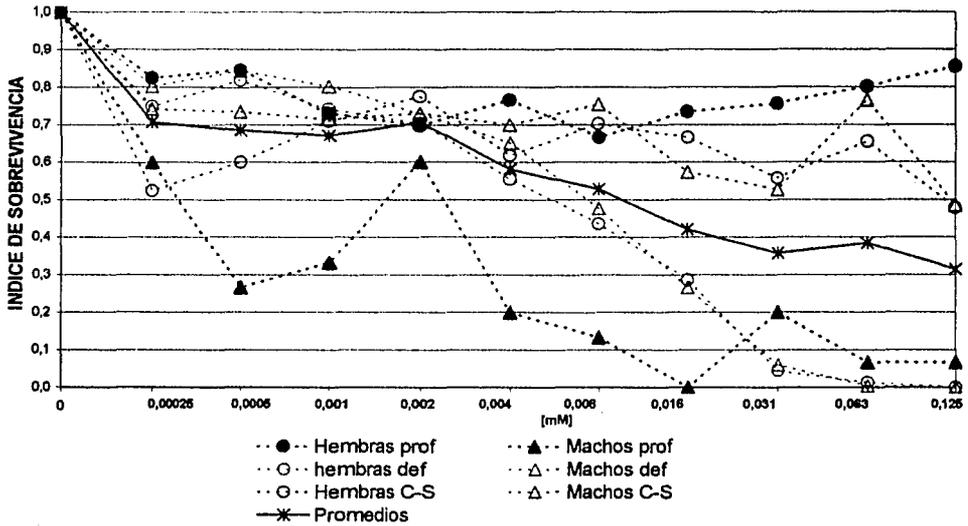
TABLA 7b. ANALISIS DE MEDIAS DE TUKEY PARA CONCENTRACIONES DEL COMPUESTOS NISO4 (DHT) p<0.05.

(Mm)	C2 0,02	C5 0,16	C7 0,65	C3 0,04	C6 0,32	C4 0,08	C1 0
IS/prom	0,57	0,58	0,62	0,71	0,71	0,74	1
C2		NS	NS	NS	NS	NS	*
C5	NS		NS	NS	NS	NS	*
C7	NS	NS		NS	NS	NS	*
C3	NS	NS	NS		NS	NS	*
C6	NS	NS	NS	NS		NS	*
C4	NS	NS	NS	NS	NS		*
C1	*	*	*	*	*	*	

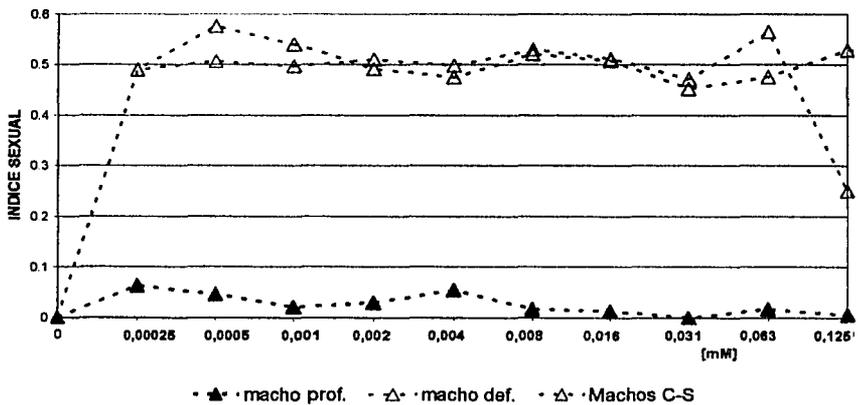
DHT = 0.234

Gráfica 3. Prueba de reparación del ADN en *Drosophila melanogaster* tratadas con ETIL-NITROSOUREA

a) Índice de Supervivencia

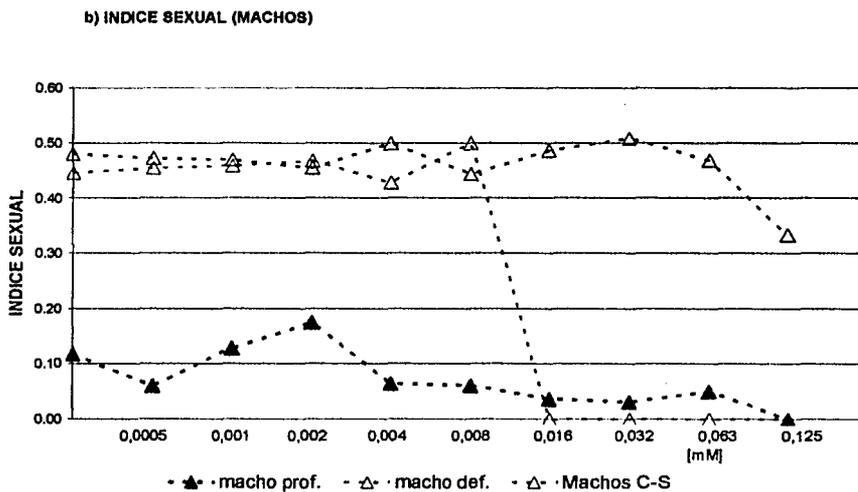
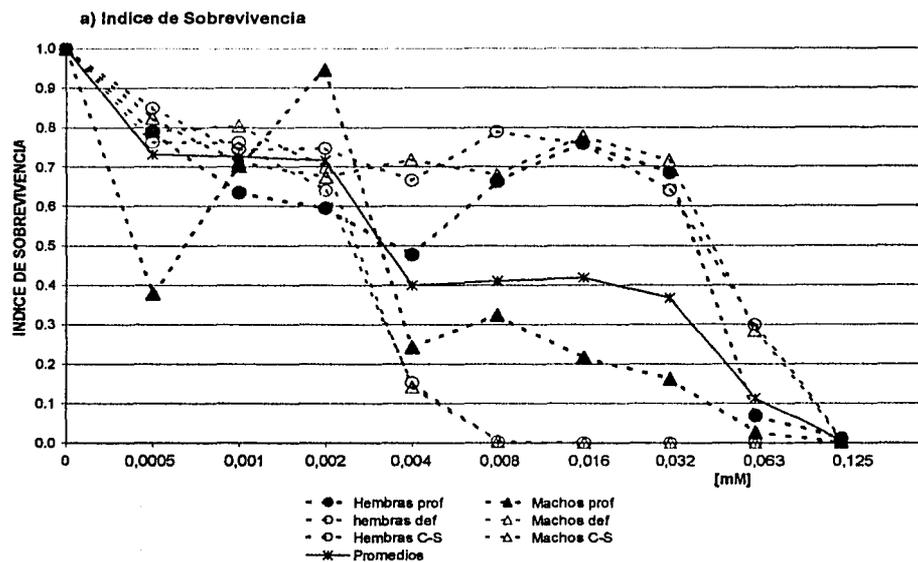


b) ÍNDICE SEXUAL (MACHOS)



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 4. Prueba de reparación del ADN en *Drosophila melanogaster* tratadas con MITIMICINA C



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 8a. ANALISIS DE MEDIAS DE TUKEY PARA FENOTIPOS DEL COMPUESTO ETIL-NITROSOUREA (DHT) $p < 0.05$

FENOTIPOS	F2 Machos prof	F3 Hembras Def	F4 Machos Def	F5 Hembras C-S	F6 Machos C-S	F1 Hembras prof
IS/ Promed.	0,315	0,486	0,513	0,662	0,702	0,789
F2
F3	.	.	NS	.	.	.
F4	.	NS
F5	NS	NS
F6	.	.	.	NS	.	NS
F1	.	.	.	NS	NS	.

DHT = 0,149

TABLA 8b. ANALISIS DE MEDIAS DE TUKEY PARA CONCENTRACIONES DEL COMPUESTO ETIL-NITROSOUREA (DHT) $p < 0.05$.

[mM]	C11 0,125	C9 0,031	C10 0,063	C8 0,016	C7 0,006	C6 0,004	C4 0,001	C3 0,0005	C5 0,002	C2 0,00025	C1 0
IS/prom	0,31	0,36	0,38	0,42	0,53	0,58	0,67	0,69	0,71	0,71	1
C11	.	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C9	NS	.	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C10	NS	NS	.	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C8	NS	NS	NS	.	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C7	.	NS	NS	NS	.	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C6	.	NS	NS	NS	NS	.	NS	NS	NS	NS	NS
C4	NS	NS	.	NS	NS	NS	NS
C3	NS	NS	NS	.	NS	NS	NS
C5	NS	NS	NS	NS	.	NS	NS
C2	NS	NS	NS	NS	NS	.	NS
C1

DHT = 0.226

TABLA 9a. ANALISIS DE MEDIAS DE TUKEY PARA FENOTIPOS DEL COMPUESTO MITOMICINA C (DHT) $p < 0.05$

FENOTIPOS	F3 Hembras Def	F4 Machos Def	F2 Machos prof	F1 Hembras prof	F6 Machos C-S	F5 Hembras C-S
IS/ Promed.	0,332	0,344	0,400	0,568	0,639	0,650
F3	.	NS	NS	.	.	.
F4	NS	.	NS	.	.	.
F2	NS	NS
F1	NS	NS
F6	.	.	.	NS	.	NS
F5	.	.	.	NS	NS	.

DHT = 0.164

TABLA 9b. ANALISIS DE MEDIAS DE TUKEY PARA CONCENTRACIONES DEL COMPUESTO MITOMICINA C (DHT) $p < 0.05$.

d) Compuesto: MITOMICINA C

[mM]	C10 0,125	C9 0,063	C8 0,031	C5 0,004	C6 0,006	C7 0,016	C4 0,002	C3 0,001	C2 0,0005	C1 0
IS/prom	0,004	0,11	0,37	0,40	0,41	0,42	0,72	0,73	0,73	1
C10	.	NS
C9	NS
C8	.	.	.	NS	NS	NS
C5	.	.	NS	.	NS	NS
C6	.	.	NS	NS	.	NS
C7	.	.	NS	NS	NS
C4	NS	NS	.
C3	NS	.	NS	.
C2	NS	NS	.	.
C1

DHT = 0.236

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Muestras de Agua, muy Tóxicas.

Las muestras de agua del pozo Az 26 (M-2) y del pozo Az 56 (M-3) resultaron ser claramente tóxicas (Gráficas 6a y 7b) a partir de la dilución al 25%, en la que se recobraron pocos organismos. En cuanto a los índices sexuales sólo el de los machos proficientes es el que resultó menor, por la baja recuperación de este fenotipo (Gráficas 7b y 8b). En general, la toxicidad de la muestra afectó de una manera diferente a las moscas, dependiendo de su fenotipo. Aunque la variación en el IS no ocurrió de acuerdo con el incremento en la concentración, la mayor sobrevivencia por fenotipo (sin importar la concentración) se obtuvo para los machos deficientes, las hembras proficientes y las hembras deficientes en reparación, después se recobraron de mayor a menor: machos silvestres, hembras silvestres y machos proficientes en reparación (Tabla 11 a y 12 a); estas diferencias se confirmaron por el análisis de medias de Tukey ($P < 0.05$). La sobrevivencia de los machos proficientes fue diferente a la de los demás fenotipos. La comparación del IS por concentración, sin importar el fenotipo mostró la existencia de tres bloques traslapados: el IS del testigo y el de la dilución 6.3 % (IS = 1.0 a 1.2) es diferente del bloque formado por las diluciones 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 y 25 % es similar (IS = 0.70 a 0.90), pero difieren del IS de las diluciones 6.3 y 12.5 % (IS = 0.9 a 1). Finalmente, no se recobraron sobrevivientes en la muestra al 50% y 100 % (Tabla 11b y 12b). Solo existen diferencias significativas entre los machos proficientes del resto de los demás fenotipos.

Para la muestra del pozo Az 56, la comparación del IS por fenotipos, sin importar la concentración mostró dos grupos, el primero formado por las hembras silvestres, proficientes y deficientes en reparación y el de los machos deficientes en reparación, silvestres y los proficientes en reparación; siendo el IS de las hembras mayor al de los machos en todas las diluciones (Tabla 12 a). Por otro lado, el análisis del IS por concentración, sin importar el fenotipo mostró cuatro bloques: con un índice de sobrevivencia de 1.0 a 1.03 para las concentraciones 0, 1.6, 3.2, 6.3, 12.5 %, otro bloque está formado por IS = 0.7 a 0.9 para las diluciones 0.4 y 0.8 %, la dilución al 25 % produjo un IS de 0.37 y

resultó diferente de todas las diluciones y, finalmente las diluciones 50 y 100 % en las que no se recobraron organismos (Tabla 12b). La diferencia solo es notoria entre los IS de las hembras proficientes y los machos *Canton-S*.

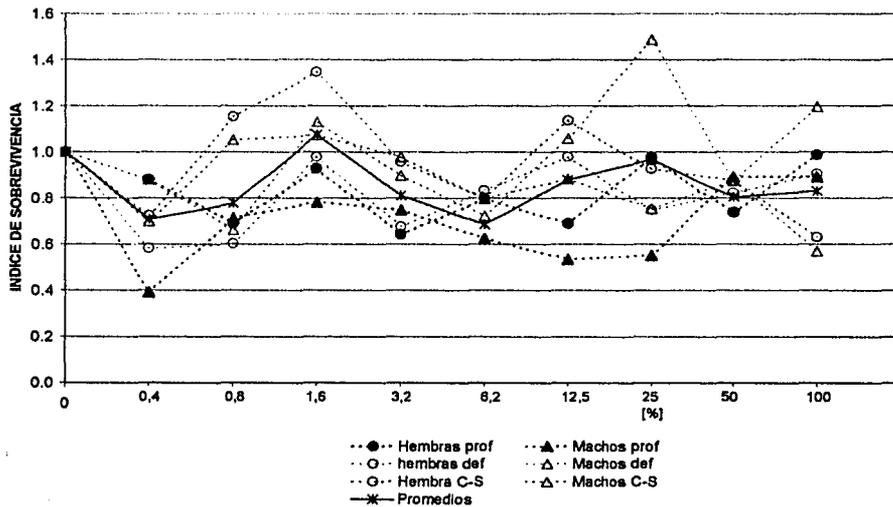
Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los obtenidos en un trabajo paralelo a éste en el laboratorio de Genética con la prueba de Recombinación y Mutación Somática (SMART) aplicada a las mismas muestras de agua, Arellano (2002), quien reporta un índice de sobrevivencia similar para moscas *flr3/mwh* y *TM3,Ser/mwh* (cruza para determinar la inducción de mutación y recombinación somáticas) expuestas a las mismas concentraciones de las muestras de agua de la zona de Los Azufres; también reportan un efecto tóxico para la muestra sin diluir de los pozos Az 26 y Az 56.

Para el caso de estas muestras, Az 26 y Az 56, aunque no es evidente la diferencia en los IS entre los organismos deficientes y los proficientes (Gráficas 6 y 7), no puede afirmarse que no haya daño al ADN, ya que en estos casos la lesión podría ocasionar la pérdida de las células afectadas y, posteriormente, la muerte del organismo, si el daño es severo (Ramos *et al.* 2000).

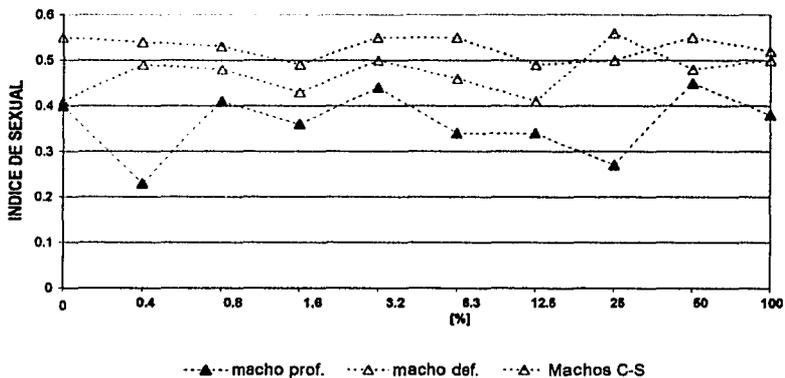
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 5. Prueba de reparación del ADN en *Drosophila melanogaster* tratadas con la muestra de agua de "Los Tejamaniles" en las lagunas de Los Azufres.

a) Índice de Supervivencia



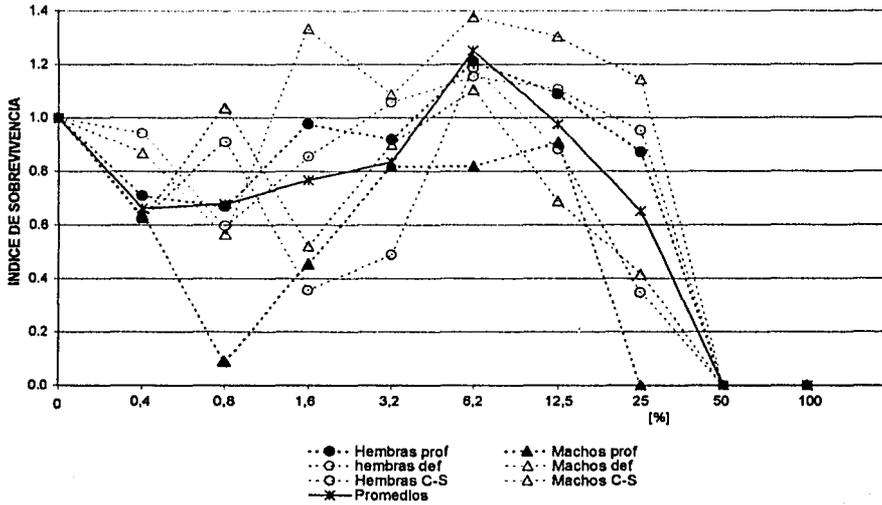
b) ÍNDICE SEXUAL (MACHOS)



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 6. Prueba de reparación del ADN en *Drosophila melanogaster* tratadas con la muestra de agua del pozo Az 26 U-11 en las lagunas de Los Azufres.

a) Índice de Supervivencia



b) ÍNDICE SEXUAL (MACHOS)

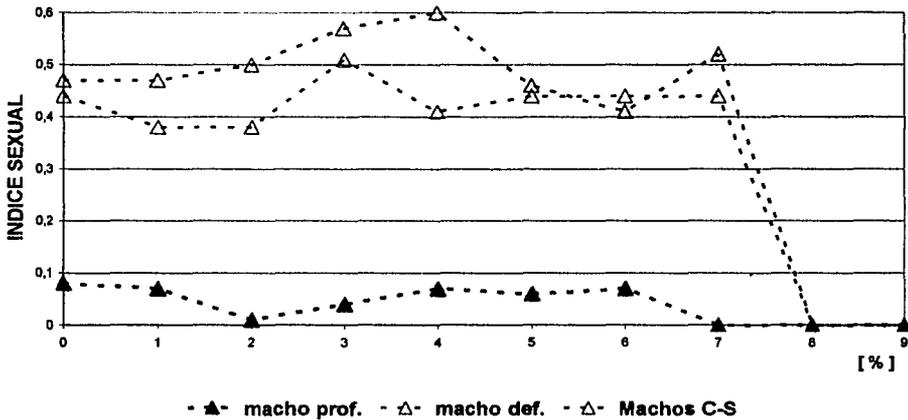


TABLA 10a. ANALISIS DE MEDIAS DE TUKEY PARA FENOTIPOS DE LA MUESTRA DE AGUA "TEJAMANILES" (DHT) p<0.05

FENOTIPOS	F2	F1	F3	F6	F5	F4
	Machos prof	Hembras prof	Hembras Def	Machos C-S	Hembras C-S	Machos Def
IS/ Promed.	0,679	0,807	0,812	0,887	0,956	0,992
F2		NS	NS	NS	NS	*
F1	NS		NS	NS	NS	NS
F3	NS	NS		NS	NS	NS
F6	NS	NS	NS		NS	NS
F5	NS	NS	NS	NS		NS
F4	*	NS	NS	NS	NS	

Valor de Tukey = DHT = 0,283

* = Valores Significativos, NS = No Significativo

TABLA 10b. ANALISIS DE MEDIAS DE TUKEY PARA CONCENTRACIONES DE LA MUESTRA DE AGUA "TEJAMANILES" (DHT) p<0.05.

	C6	C2	C3	C9	C5	C10	C7	C8	C1	C4
[%]	6,3	0,4	0,6	50	3,2	100	12,5	25	9	1,6
IS/prom	0,69	0,71	0,78	0,81	0,81	0,83	0,88	0,97	1	1,08
C6		NS	NS	NS						
C2	NS		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C3	NS	NS		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C9	NS	NS	NS		NS	NS	NS	NS	NS	NS
C5	NS	NS	NS	NS		NS	NS	NS	NS	NS
C10	NS	NS	NS	NS	NS		NS	NS	NS	NS
C7	NS	NS	NS	NS	NS	NS		NS	NS	NS
C8	NS		NS	NS						
C1	NS		NS							
C4	NS	NS								

DHT = 0.414

TABLA 11a. ANALISIS DE MEDIAS DE TUKEY PARA FENOTIPOS DE LA MUESTRA DE AGUA POZO Az 26 (DHT) p<0.05

FENOTIPOS	F2	F5	F6	F3	F1	F4
	Machos prof	Hembras C-S	Machos C-S	Hembras Def	Hembras prof	Machos Def
IS/ Promed.	0,224	0,587	0,636	0,783	0,815	0,886
F2		*	*	*	*	*
F5	*		NS	NS	*	*
F6	*	NS		NS	NS	*
F3	*	NS	NS		NS	NS
F1	*	*	NS	NS		NS
F4	*	*	*	NS	NS	

DHT = 0,208

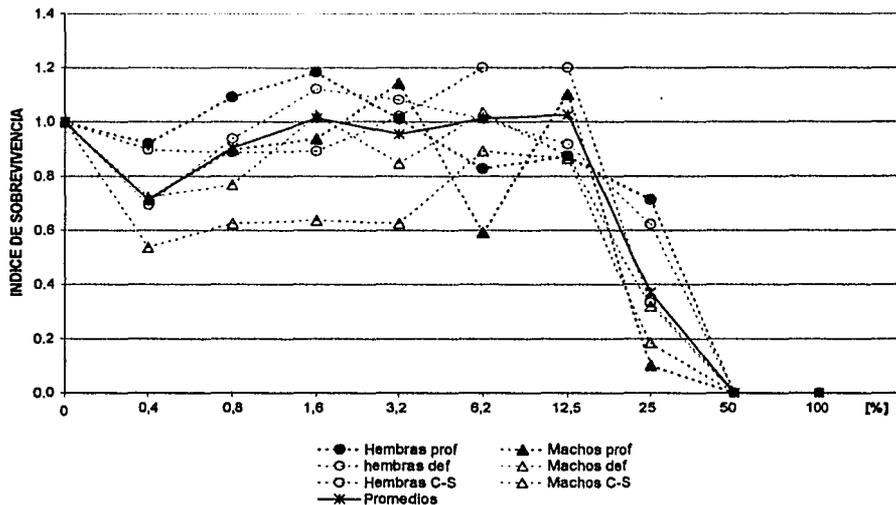
TABLA 11b. ANALISIS DE MEDIAS DE TUKEY PARA CONCENTRACIONES DE LA MUESTRA DE AGUA POZO Az 26 (DHT) p<0.05.

	C10	C9	C8	C2	C3	C4	C5	C7	C1	C6
[%]	100	50	25	0,4	0,8	1,6	3,2	12,5	0	6,3
IS/prom	0	0,65	0,66	0,68	0,77	0,84	0,98	1	1,25	
C10		NS	*	*	*	*	*	*	*	*
C9	NS		*	*	*	*	*	*	*	*
C8	*	*		NS	NS	NS	NS	*	*	*
C2	*	*	NS		NS	NS	NS	*	*	*
C3	*	*	NS	NS		NS	NS	*	*	*
C4	*	*	NS	NS	NS		NS	NS	NS	*
C5	*	*	NS	NS	NS	NS		NS	NS	*
C7	*	*	*	*	*	NS	NS		NS	NS
C1	*	*	*	*	*	NS	NS	NS		NS
C6	*	*	*	*	*	*	*	NS		

DHT = 0.299

Gráfica 7. Prueba de reparación del ADN en *Drosophila melanogaster* tratadas con la muestra de agua del pozo Az 56 en las lagunas de Los Azufres.

a) Índice de Supervivencia



b) ÍNDICE SEXUAL (MACHOS)

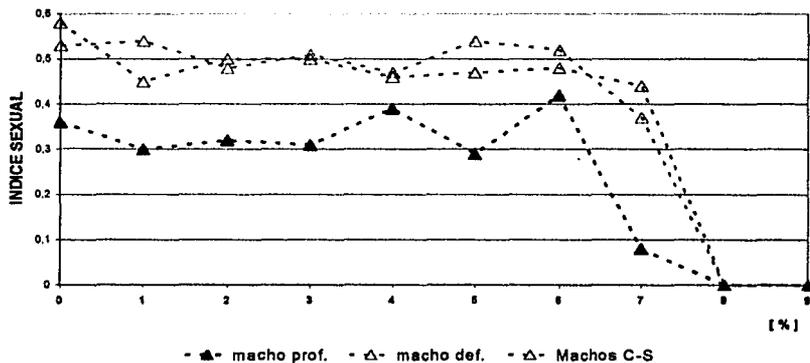


TABLA 12a. ANALISIS DE MEDIAS DE TUKEY PARA FENOTIPOS DE LA MUESTRA DE AGUA POZO Az 56 (DHT) $p < 0.05$

FENOTIPOS	F2 Machos prof	F6 Machos C-S	F4 Machos Def	F3 Hembras Def	F1 Hembras prof	F5 Hembras C-S
IS/ Promed.	0,520	0,564	0,649	0,751	0,775	0,785
F2		NS	NS	*	*	*
F6	NS		NS	*	*	*
F4	NS	NS		NS	NS	NS
F3	*	*	NS		NS	NS
F1	*	*	NS	NS		NS
F5	*	*	NS	NS	NS	

DHT = 0,137

TABLA 12b. ANALISIS DE MEDIAS DE TUKEY PARA CONCENTRACIONES DE LA MUESTRA DE AGUA POZO Az 56 (LA LUNA) (DHT) $p < 0.05$.

[%]	C9 50	C10 100	C8 25	C2 0,4	C3 0,8	C5 3,2	C1 0	C6 6,3	C4 1,6	C7 12,5
IS/prom.	0	0	0,37	0,71	0,91	0,96	1,00	1,01	1,01	1,03
C9		NS	*	*	*	*	*	*	*	*
C10	NS		*	*	*	*	*	*	*	*
C8	*	*		*	*	*	*	*	*	*
C2	*	*	*		NS	*	*	*	*	*
C3	*	*	*	*		NS	NS	NS	NS	NS
C5	*	*	*	*	NS		NS	NS	NS	NS
C1	*	*	*	*	NS	NS		NS	NS	NS
C6	*	*	*	*	NS	NS	NS		NS	NS
C4	*	*	*	*	NS	NS	NS	NS		NS
C7	*	*	*	*	NS	NS	NS	NS	NS	

DHT = 0.197

Muestras de Agua, Ligeramente Tóxicas.

Los resultados obtenidos con las muestras de agua de las localidades: "El Pozo" (M-4), "Los Azufres" (M-6) y Az 34 "yacuzzi" (M-7) se han clasificado como Ligeramente Tóxicas ya que se observa una disminución en el índice de sobrevivencia de los organismo silvestres *Cantón-S* que resultaron ser más sensibles a la presencia de contaminantes en las muestras de agua (gráficas 8, 10 y 11).

Para la muestra M-4, el IS promedio de las moscas hembras y machos silvestres fue menor al de los otros fenotipos (tabla 4). El valor del índice de sobrevivencia promedio agrupó a los machos deficientes, hembras proficientes y hembras deficientes en reparación, seguidos por el grupo formado por las moscas silvestres y los machos proficientes en reparación, para los que el IS fue menor. Las diferencias se confirmaron mediante la prueba de Tukey (Tablas 13 a y 13 b).

Para las muestras M-6 "Los Azufres" y M-7 "Yacuzzi", sólo se encontró un grupo para el IS promedio y se confirmó un IS promedio diferente para los machos proficientes en reparación (Tabla 15 y 16). En el caso de la M-7, el IS de las moscas silvestres fue menor en las diluciones 12.5 y 25 %, pero en este caso el menor número de moscas recuperadas se podría explicar por la contaminación de los tratamientos en una de las repeticiones, por lo que el efecto no se asocia al tratamiento. La comparación del efecto de la concentración sin importar el fenotipo mostró, como se esperaba, un gran bloque en el que se encuentran los IS de las moscas expuestas, las cuales sólo difieren del IS de los testigos negativos concurrentes (tablas 16 a y 16b).

Muestras de Agua, No tóxicas

Las muestras de agua de "Los Tejamaniles" (M -1) y la del pozo Az 34 (M-5) no afectaron significativamente el IS de las moscas tratadas ni en el caso de las moscas proficientes, deficientes ni *Canton-s* (Gráficas 5 y 9). Aunque se observaron variaciones en los IS obtenidos, éstos se mantuvieron alrededor del testigo negativo concurrente y mostraron poca variación entre ellos. Sólo en el tratamiento con agua del pozo Az34 (M5), los machos proficientes se mantuvieron con un IS menor al del resto de los fenotipos.

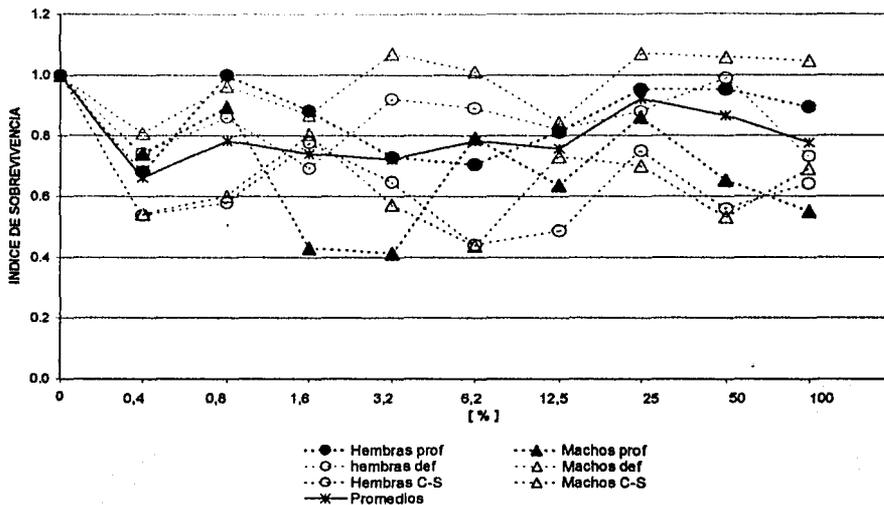
Para el caso de la muestra M-5 el análisis de varianza (ANOVA, $P < 0.05$) si mostró diferencias significativas pero sólo entre el fenotipo de los machos proficientes que estuvieron muy por debajo de los IS promedio de los demás fenotipos (tabla 5). El análisis de medias para concentraciones mostró diferencias significativas en la respuesta a la mínima concentración de muestra de agua 0.4% (tabla 14b).

Por otra parte, en prácticamente todas las muestras probadas se observó que el IS de las moscas (sin importar el fenotipo) expuestas a la concentración más baja [0.4 %] era significativamente menor (en ocasiones disminuyó hasta en un 50 %) que el obtenido con concentraciones mayores (0.8, 1.6%, etc.) (Gráficas 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11, Tablas 6 a la 16).

Con respecto a los índices sexuales sólo se encontraron diferencias en los IS de los machos proficientes en relación a las hembras deficientes de todas las muestras y compuestos aplicados en este trabajo (tabla 4). Cuando existe diferencia entre el índice sexual entre machos y hembras nos demuestra que la presencia de marcadores genéticos en los cromosomas sexuales afectó a los organismos de diferente forma según el sexo, tal parece que la presencia del balanceador en los organismos proficientes afecta más a los machos en su desarrollo y sobrevivencia que a las hembras.

Gráfica 8. Prueba de reparación del ADN en *Drosophila melanogaster* tratadas con la muestra de agua "EL Pozo" en las lagunas de Los Azufres.

a) Índice de Sobrevivencia



b) ÍNDICE SEXUAL (MACHOS)

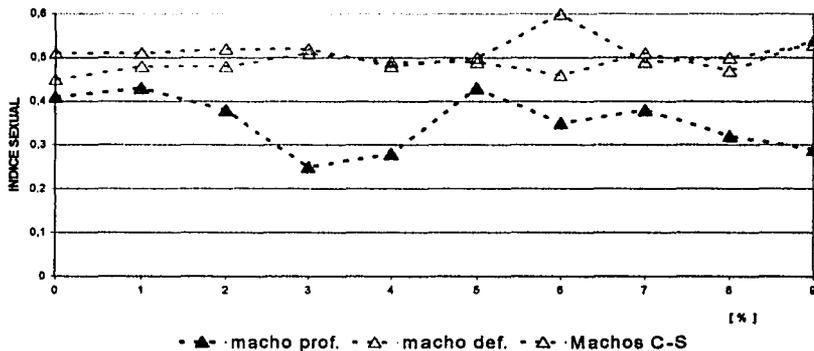


TABLA 13a. ANALISIS DE MEDIAS DE TUKEY PARA FENOTIPOS DE LA MUESTRA DE AGUA "EL POZO" (DHT) $p < 0.05$

FENOTIPOS	F2	F6	F5	F3	F1	F4
	Machos prof	Machos C-S	Hembras C-S	Hembras Def	Hembras prof	Machos Def
IS/ Promed.	0,617	0,684	0,721	0,961	0,903	1,026
F2		NS	NS	*	*	*
F6	NS		NS	NS	*	*
F5	NS	NS		NS	NS	*
F3	*	NS	NS		NS	NS
F1	*	*	NS	NS		NS
F4	*	*	*	NS	NS	

DHT = 0.214

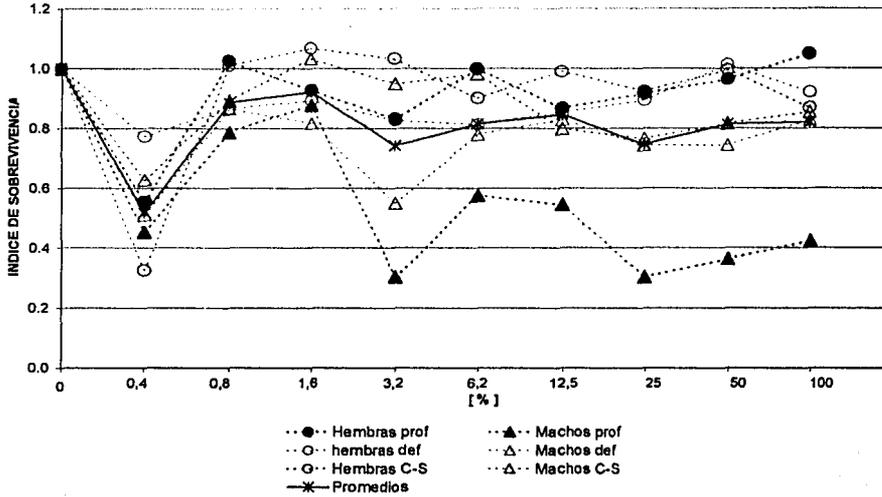
TABLA 13b. ANALISIS DE MEDIAS DE TUKEY PARA CONCENTRACIONES DE LA MUESTRA DE AGUA "EL POZO" (DHT) $p < 0.05$.

(%)	C2 0,4	C5 3,2	C4 1,6	C7 12,5	C10 100	C6 6,3	C3 0,8	C9 50	C8 25	C1 0
IS/prom	0,663	0,723	0,741	0,758	0,778	0,783	0,784	0,867	0,822	1
C2		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*
C5	NS		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*
C4	NS	NS		NS	NS	NS	NS	NS	NS	*
C7	NS	NS	NS		NS	NS	NS	NS	NS	*
C10	NS	NS	NS	NS		NS	NS	NS	NS	*
C6	NS	NS	NS	NS	NS		NS	NS	NS	*
C3	NS	NS	NS	NS	NS	NS		NS	NS	*
C9	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		NS	NS
C8	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		NS
C1	*	*	*	*	*	*	*	NS	NS	

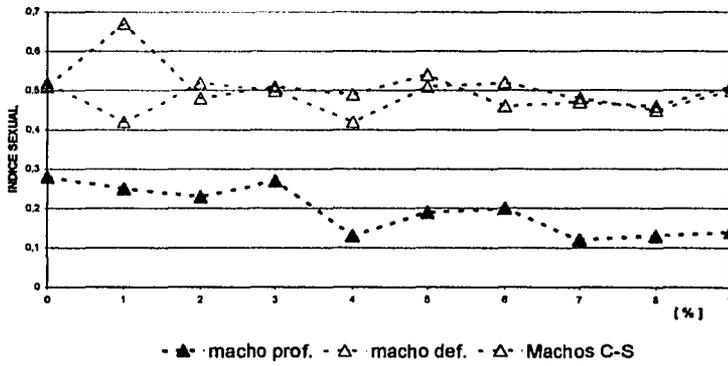
DHT = 0.214

Gráfica 9. Prueba de reparación del ADN en *Drosophila melanogaster* tratadas con la muestra de agua del pozo Az 34 en las lagunas de Los Azufres.

a) IINDICE DE SOBREVIVENCIA



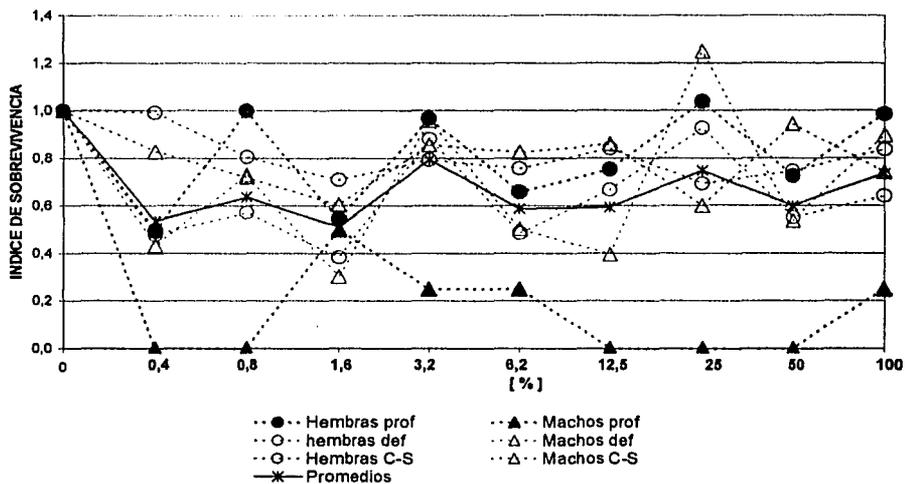
b) INDICE SEXUAL (MACHOS)



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Gráfica 10. . Prueba de reparación del ADN en *Drosophila melanogaster* tratadas con la muestra de los Azufres en las lagunas de Los Azufres.

a) Índice de Supervivencia



b) ÍNDICE SEXUAL (MACHOS)

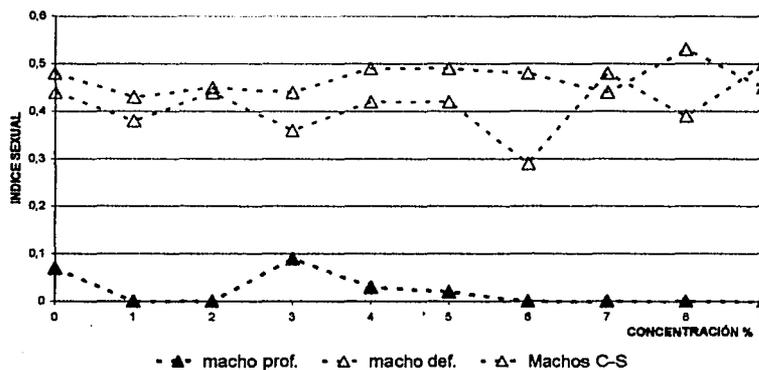


TABLA 14a. ANALISIS DE MEDIAS DE TUKEY PARA FENOTIPOS DE LA MUESTRA DE AGUA POZO Az 34 (DHT) p<0.05

FENOTIPOS	F2 Machos prof	F4 Machos Def	F3 Hembras Def	F6 Machos C-S	F5 Hembras C-S	F1 Hembras prof
IS/ Promed	0,488	0,764	0,888	0,895	0,912	0,920
F2	*	*	*	*	*	*
F4	*	*	NS	NS	NS	NS
F3	*	NS	NS	NS	NS	NS
F6	*	NS	NS	NS	NS	NS
F5	*	NS	NS	NS	NS	NS
F1	*	NS	NS	NS	NS	NS

DHT = 0,177

TABLA 14b. ANALISIS DE MEDIAS DE TUKEY PARA CONCENTRACIONES DE LA MUESTRA DE AGUA POZO Az 36 (DHT) p<0.05.

(%)	C2 0,4	C5 3,2	C8 25	C6 6,3	C9 50	C10 100	C7 12,5	C3 0,8	C4 1,6	C1 0
IS/prom	0,518	0,742	0,747	0,814	0,815	0,821	0,846	0,866	0,922	1
C2	NS	NS	NS	*	*	*	*	*	*	*
C5	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*
C8	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C6	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C9	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C10	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C7	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C3	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C4	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C1	*	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

DHT = 0,255

TABLA 15a. ANALISIS DE MEDIAS DE TUKEY PARA FENOTIPOS DE LA MUESTRA DE AGUA "LOS AZUFRES" (DHT) p<0.05

FENOTIPOS	F2 Machos prof	F3 Hembras Def	F4 Machos Def	F6 Machos C-S	F1 Hembras prof	F5 Hembras C-S
IS/ Promed	0,225	0,659	0,701	0,803	0,816	0,843
F2	*	*	*	*	*	*
F3	*	*	NS	NS	NS	NS
F4	*	NS	NS	NS	NS	NS
F6	*	NS	NS	NS	NS	NS
F1	*	NS	NS	NS	NS	NS
F5	*	NS	NS	NS	NS	NS

DHT = 0,209

TABLA 15b. ANALISIS DE MEDIAS DE TUKEY PARA CONCENTRACIONES DE LA MUESTRA DE AGUA "LOS AZUFRES" (DHT) p<0.05.

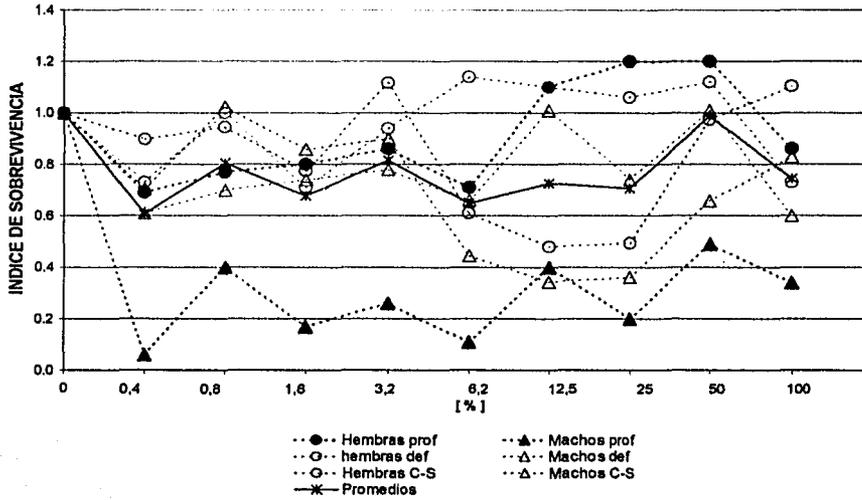
(%)	C4 1,6	C2 0,4	C6 6,3	C7 12,5	C9 50	C3 0,8	C10 100	C8 25	C5 3,2	C1 0
IS/prom	0,512	0,537	0,588	0,594	0,6	0,637	0,735	0,748	0,794	1
C4	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*
C2	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*
C6	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*
C7	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*
C9	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*
C3	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*
C10	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C8	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C5	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C1	*	*	*	*	*	*	NS	NS	NS	NS

DHT = 0,302

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 11. Prueba de reparación del ADN en *Drosophila melanogaster* tratadas con la muestra de agua del pozo Az 34 "yacuzi" en las lagunas de Los Azufres.

a) IINDICE DE SOBREVIVENCIA



b) INDICE SEXUAL (MACHOS)

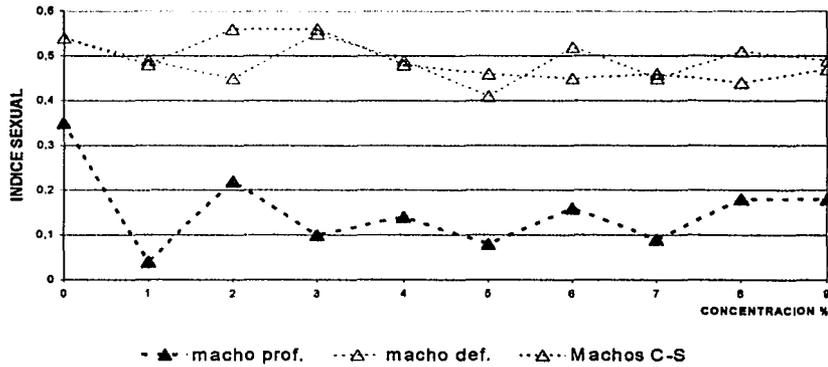


TABLA 16a. ANALISIS DE MEDIAS DE TUKEY PARA FENOTIPOS DE LA MUESTRA DE AGUA "YACUZI" (DHT) $p < 0.05$

FENOTIPOS	F2	F6	F4	F3	F5	F1
	Machos prof	Machos C-S	Machos Def	Hembras Def	Hembras C-S	Hembras prof
IS/ Promed	0,360	0,718	0,746	0,838	0,849	0,896
F2		*	*	*	*	*
F6	*		NS	NS	NS	NS
F4	*	NS		NS	NS	NS
F3	*	NS	NS		NS	NS
F5	*	NS	NS	NS		NS
F1	*	NS	NS	NS	NS	

DHT = 0,249

TABLA 16b. ANALISIS DE MEDIAS DE TUKEY PARA CONCENTRACIONES DE LA MUESTRA DE AGUA "YACUZI" (DHT) $p < 0.05$.

[%]	C2	C6	C4	C8	C7	C10	C3	C5	C9	C1
	0.4	6.3	1.6	25	12.5	100	0.8	3.2	50	0
IS/prom	0.61	0.65	0.68	0.71	0.73	0.75	0.80	0.82	0.99	1
C2		NS	*	*						
C6	NS		NS	NS						
C4	NS	NS		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C8	NS	NS	NS		NS	NS	NS	NS	NS	NS
C7	NS	NS	NS	NS		NS	NS	NS	NS	NS
C10	NS	NS	NS	NS	NS		NS	NS	NS	NS
C3	NS	NS	NS	NS	NS	NS		NS	NS	NS
C5	NS		NS	NS						
C9	*	NS		NS						
C1	*	NS								

DHT = 0.359

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VI. DISCUSION.

En los resultados obtenidos se observaron varios tipos de efectos inducidos por los compuestos utilizados y las muestras de agua contaminada provenientes de diferentes localidades de Los Azufres en la prueba de reparación *in vivo* de daño al ADN en *Drosophila melanogaster*. Con base en el índice de sobrevivencia (IS) de las moscas proficientes (*FM7*, alelos *mei* normales), deficientes (*mei-9^a*, *mei-41^{D5}*) y las *Canton-S* utilizadas en este trabajo, estos efectos se clasificaron en: 1) tóxicos, 2) ligeramente tóxicos y 3) no tóxicos.

Los machos proficientes en reparación mostraron un retraso en el tiempo de emergencia de pupa a adulto con respecto al resto de las moscas en la mayoría de los experimentos realizados, por lo que la recuperación de éstos siempre fue en un número menor, comparado con los otros genotipos. Lo anterior puede deberse a que los machos proficientes presentan el cromosoma balanceador *FM7* para el cromosoma *X*, el cual se utiliza para estabilizar a las mutaciones *mei* en la craza progenitora de las hembras madre (los alelos mutados *mei* están en el cromosoma *X* homólogo) (Linsdley y Zimm, 1992). La presencia de este balanceador tiene por efecto impedir la recombinación de los alelos *mei* mutados (*mei-9^a*, *mei-41^{D5}*) y evitar que se puedan perder durante la recombinación; este efecto se mantiene también en los machos de la siguiente generación que presentan los alelos silvestres de los genes *mei*. Por otro lado, hay que recordar que los machos de *Drosophila* son hemicingóticos para los genes que se localizan en el cromosoma *X*, el cual está alterado por las múltiples inversiones que caracterizan al balanceador *FM7* que pudieran estar alterando la expresión de los genes *mei* silvestres (Inoue *et al.* 1995).

La línea *Canton-S* se utilizó como línea de referencia ya que la disposición de sus cromosomas es de tipo silvestre y no expresan alguna mutación, ni presentan inversiones cromosómicas, por lo que al ser comparados con los organismos mutantes deficientes en reparación (*mei-9^a*, *mei-41^{D5}*) o con los portadores del cromosoma balanceador *FM7*, facilita establecer el efecto del genotipo en la respuesta genotóxica (Rivas *et al.* 1999).

Para confirmar la sensibilidad de la prueba de reparación *in vivo* con *Drosophila* se utilizaron varios compuestos, entre los que se incluyen los controles positivos MMC y ENU (Vogel *et al.* 1996; Castellani, 1998; Nickoloff y Hoekstra 1998; Ordaz, 1991); un compuesto con una débil actividad recombinogénica, el sulfato de níquel (Rodríguez-Amaiz y Ramos, 1986) y finalmente, el cianato de sodio, del que no se ha establecido actividad mutagénica, pero se ha mostrado que tiene la capacidad de reducir el crecimiento tumoral en ratas infectadas (Boffa y Allfrey, 1978; Jiménez, 1998).

1) Compuestos de referencia.

Los compuestos que produjeron un efecto genotóxico claro fueron la Etil-Nitrosourea (ENU) y la Mitomicina C (MMC), los cuales se seleccionaron como controles positivos para la prueba de reparación de daño al ADN en *Drosophila* por su actividad mutagénica y recombinogénica sobre el ADN.

El compuesto ENU es un agente alquilante que forma aductos de O⁶-alquilguanina y O⁶-alquilimidina, esta transformación química de las bases nitrogenadas altera la afinidad de las mismas y provoca lesiones por error de apareamiento (Moses y Summers, 1988). Los mutantes *mei-9* son deficientes en reparación por escisión de nucleótidos y aparentemente tienen reducida la actividad de las enzimas AP endonucleasas, por lo que los sitios AP se van acumulando al no poder reparar los sitios dañados en el ADN (Nivard *et al.* 1996). Lo anterior podría explicar la baja sobrevivencia de los organismos deficientes en reparación expuestos a la ENU. Por su parte, la baja sobrevivencia de los machos proficientes en reparación podría ser explicada por el efecto de las múltiples inversiones del cromosoma *FM7*.

La MMC es un compuesto que induce mutación génica, deleciones cromosómicas, no-disyunción y recombinación somática en *Drosophila*. Produce entrecruzamientos de ADN, los cuales se reparan por la acción cooperativa y secuencial de los sistemas de reparación por escisión y por recombinación (Nakamura *et al.* 1997). Así, en las moscas deficientes en reparación, además

de la deficiencia asociada al gen *mei-9*, la presencia del gen *mei-41*, impide la formación del complejo enzimático que participa en la reparación por recombinación. Se ha descrito que a determinadas concentraciones, la MMC bloquea la replicación y la transcripción del ADN, interfiriendo con la división celular, aún en organismos que presentan un sistema de reparación de tipo silvestre (Nickoloff y Hoekstra, 1998).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo para los organismos proficientes en reparación y los silvestres *Canton-S* muestran que la exposición a la MMC afectó la sobrevivencia de las moscas en el orden: silvestres > proficientes (hembras) > machos proficientes > organismos deficientes; en la concentración más alta resultó tóxica y aunque se asume que las moscas silvestres tienen la capacidad de reparar el daño inducido al ADN, la sobrevivencia de éstas también fue menor. La toxicidad fue más evidente para las moscas deficientes en reparación, las cuales no sobrevivieron aún a concentraciones en orden de magnitud menor (tabla 4).

Los compuestos utilizados para comprobar la eficiencia de la prueba, la ENU y la MMC fueron detectados satisfactoriamente por la prueba de reparación del DNA *in vivo* en *Drosophila*, como mutágenos que inducen lesiones directas al DNA que requieren de los mecanismos de reparación mencionados para su reparación.

El NiSO₄ (Gráfica 1) fue propuesto inicialmente como control positivo por las características químicas que presenta. El níquel (Ni) reacciona rápidamente con el ADN y disminuye la fidelidad de su síntesis. Se ha reportado que el Ni induce rompimientos de ADN de una sola hebra, en estudios bioquímicos se ha demostrado que las sales de Ni reaccionan fácilmente con el ADN y alteran la fidelidad de la síntesis del mismo (Miyaki *et al.* 1977; Sirover y Loeb 1976). Rodríguez-Amaiz y Ramos (1986) probaron la capacidad del NiSO₄ en *Drosophila melanogaster* para inducir mutaciones letales recesivas ligadas al sexo (SLRLT). Jiménez (1998) observó que el sulfato de níquel administrado a *Drosophila melanogaster* en forma subcrónica induce mutación y

recombinación somáticas (SMART). A las concentraciones probadas en este trabajo [0.02 a 0.65 mM], el NiSO₄ no fue tóxico para las moscas expuestas (excepto los machos proficientes, que se recuperaron en una frecuencia muy baja). Sin embargo, sí se ha reportado efecto mutagénico de este compuesto en otras pruebas de *Drosophila* (SMART) en células somáticas de la mosca (Jiménez, 1998).

Para el compuesto NaOCN (Gráfica 2), se encontraron diferencias entre las moscas silvestres y el resto de los fenotipos. Este compuesto fue utilizado por Jiménez (1998) que probó que el NaOCN administrado de manera subcrónica y por vía oral a larvas de *Drosophila* no mostró ser mutagénico y aparentemente puede disminuir la genotoxicidad del NiSO₄ cuando se administra previamente a la aplicación de otros mutágenos. En el presente trabajo, en las dos concentraciones menores del compuesto NaOCN (0.154 y 1.54 mM), el IS de las moscas deficientes y proficientes fue menor al de sus testigos correspondientes.

2) Muestras de agua.

En las muestras Az 26 (salmuera), Az 56 (salmuera), el "Pozo" (manantial sulfuroso), Yacuzzi (manantial sulfuroso tipo géiser), el IS de las hembras y los machos silvestres fue ligeramente menor (pero no significativo) que el obtenido para las moscas deficientes y las proficientes en reparación. Por otro lado, un aspecto interesante en los tratamientos con las muestras Az 26 y el "Pozo" fue que los mayores IS se obtuvieron para moscas portadoras de las mutaciones *mei-41^{D5}* y *mei 9^a* (deficientes en reparación), ya sea en forma homocigótica (hembras), hemicigótica (machos), o junto con *FM7* (hembras proficientes).

En 1984, Zijlstra y Vogel (citado por Zijlstra, 1987) mostraron que los niveles de respuesta metabólica son mayores en las moscas silvestres Canton-S que las cepas mutadas de varios tipos, en múltiples trabajos realizados con *Drosophila*. En 1982, Zimmering demostró la influencia que tienen los factores metabólicos en la inducción de daño genotóxico inducido por el compuesto Ciclofosfamida: en moscas con alta bioactivación o silvestres (*Canton-S*) la

respuesta obtenida en la prueba de SLRLT fue negativa; por otro lado, al probar este compuesto para su efecto clastogénico, moscas con cromosomas-X en anillo cruzadas con hembras *mei-9^{L1}* deficientes en reparación del ADN produjeron una respuesta positiva para la inducción de pérdida parcial de cromosomas sexuales (Zimmering, 1982 citado por Zijlstra, 1987).

Otro aspecto que se presentó en los tratamientos con las muestras de agua de "Yacuzzi", Az 56 y Az 34 fue que el IS de los machos de todos los fenotipos fue, en general, menor que el de las hembras. Debido a que las condiciones de cultivo, exposición y manipulación, fueron las mismas para todos los organismos tratados, lo único en lo que parecen diferir estos organismos es en la presencia de los cromosomas sexuales, XX (hembras) o XY (machos). Un efecto similar ha sido reportado en moscas expuestas a diferentes concentraciones de arsénico para evaluar mutación y recombinación somáticas (SMART) en los ojos del adulto (Ramos y Rodríguez, 1995), así como en la determinación de la genotoxicidad de muestras de agua contaminada por este metaloide (Ramos, *et al.*, 2000). Por otra parte, la capacidad de realizar recombinación somática ha mostrado modular la respuesta ante la genotoxicidad de compuestos como la azida de sodio en *Drosophila* (González y Ramos, 1997).

En los machos proficientes en reparación (*FM7/Y*) lo anterior se hace evidente en todos los lotes tratados en este trabajo. Los múltiples arreglos y la condición de hemigiosis propia de los machos proficientes resulta más relevante en la respuesta genotóxica que la deficiencia génica para reparar el DNA de los machos deficientes en reparación (*mei-41^{D5}*, *mei 9^{a/Y}*), los cuales, en general, produjeron índices de sobrevivencia más altos en las muestras de agua.

Por otro lado, como puede observarse en prácticamente todos los casos en la concentración más baja probada se obtuvo un índice de sobrevivencia menor, comparado con el obtenido a concentraciones mayores, sin importar el

genotipo de éstas (incluso en las moscas de tipo silvestre), por lo que este patrón podría señalar un comportamiento característico para *Drosophila*. Una respuesta similar fue reportada por Arellano (2002) para las moscas que se utilizan en la determinación de mutación y recombinación somáticas en células de las alas de *Drosophila* para las mismas muestras de agua.

En general, toda población biológica está conformada por organismos con diferente sensibilidad a diversos factores. Lo anterior constituye una ventaja cuando se pretende evaluar el peligro potencial que representa determinado agente físico, químico o biológico. La identificación oportuna de la respuesta de estos organismos constituye uno de los objetivos de la toxicología genética, ya que favorece la implementación temprana de medidas de seguridad con la finalidad de evitar o reducir el peligro potencial para el resto (la mayoría) de la población (Butterworth *et al.*, 2000). Es posible que la reducción en el índice de sobrevivencia recobrado a bajas concentraciones pueda estar relacionado con la inducción de los mecanismos de desintoxicación, en cuyo caso, aquellos organismos que no sobreviven probablemente sí detectan la presencia de los componentes de la muestra de agua, pero no logran inducir los pasos subsecuentes en la respuesta de desintoxicación.

La prueba de reparación *in vivo* del DNA de *Drosophila*, en la forma que fue adaptada en este trabajo (adición de la cepa *Canton-S*) es una metodología sumamente sensible, como lo pudimos observar en este trabajo, que discrimina entre la actividad tóxica y genotóxica de un compuesto, o en el caso de mezclas complejas como las probadas. Lo anterior es sumamente valioso para la identificación adecuada de respuestas falsas negativas y falsas positivas en otras pruebas de genotoxicidad en *Drosophila*.

El uso de esta prueba puede ser preliminar al desarrollo de otro tipo de metodologías para probar mutagénesis o genotoxicidad que no sean tan susceptibles a concentraciones muy bajas, por lo que se pudiera considerar como un modelo alternativo para la identificación de agentes con actividad genotóxica en *Drosophila melanogaster*. Además de su fácil ejecución y tiempo

relativamente corto, comparada con otras metodologías en *Drosophila melanogaster*, esta prueba tiene la ventaja de que responde a concentraciones similares a las utilizadas en sistemas celulares *in vitro*, con la ventaja adicional de que dicha respuesta implica la complejidad de un sistema *in vivo*. Sin embargo todavía no podemos establecer a esta prueba como un buen modelo de biomonitoreo por las múltiples inconvenientes en las respuestas de sobrevivencia de los organismos que presentan el balanceador *FM7* ante la presencia de mezclas complejas.

El efecto encontrado en este trabajo sugiere que la variación en los IS promedio podría estar asociada, al menos en parte: 1) con la deficiencia en reparación; 2) con la falta de homología entre los cromosomas de las hembras y machos proficientes en reparación (portadores de *FM7*); 3) con el orden de los genes en el cromosoma *FM7*.

VII. CONCLUSIONES.

- ◆ La prueba de reparación *in vivo* de daño al ADN en *Drosophila melanogaster*, fue positiva en los compuestos ENU y MMC.
- ◆ Las moscas utilizadas en la prueba de reparación del DNA *in vivo* de *Drosophila* no mostraron daño genotóxico a la exposición de NaOCN ni de NiSO₄.
- ◆ La prueba de reparación discriminó a las muestras de agua en: muy tóxicas (Az 26 y Az 56), tóxicas ("El Pozo", "Los Azufres" y "yacuzzi") y no tóxicas (Tejamaniles y el "Pozo" Az 34).
- ◆ El cromosoma balanceador *FM7* es un arreglo cromosómico que modifica la respuesta de genotoxicidad y reduce el índice de sobrevivencia en los machos portadores, proficientes en reparación.
- ◆ En los índices de sobrevivencia de *Drosophila* se recobra una constante disminución del Índice de Sobrevivencia ante la respuesta de los contaminantes del agua en la mínima concentración.
- ◆ El índice de sobrevivencia es un indicador sensible de la actividad tóxica y genotóxica de compuestos aplicados a la prueba de reparación del ADN.
- ◆ La prueba de reparación del DNA *in vivo* en *Drosophila melanogaster* puede utilizarse como una prueba preliminar para evaluar toxicidad y es un modelo alternativo para la evaluación de la posible actividad genotóxica de muestras de agua contaminada.

VIII. REFERENCIAS

1. Alink G.M., Frederix-Wolters E.M.H., Van Der Gaag M.A. Van Der Kerkhoff J.F.F. and Poels C.L.M. (1980). Induction of sister-chromatid exchanges in fish exposed to Rhine water. **Mutat. Res.** **78**, 369-374.
2. Allfrey V.G., Boffa L.C. and Vidali G. (1977) Selective inhibition with sodium cyanate of protein synthesis in colon cancer cells. **Cancer (Phila)**, **40**: 2692-2698.
3. Anuario Estadístico del Estado de Michoacán INEGI, 1992.
4. Arellano A. R. O. (2002). *Drosophila* como modelo *in vivo* para evaluar contaminantes. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, U.N.A.M. Méx. D. F. 52 pp.
5. Armannson H. and Kristmannsdóttir H. (1992). Genotoxic activity of different chromium compounds in larval cell of *Drosophila melanogaster*. **Environ. Molec. Mut.** **34**, 47-51.
6. Barragán R. M. R. y Arellano G. M. V. (1993). Composición química de efluentes geotérmicos, **Geotermia, Rev. Mex. De Geoenergía**, **9 (2)**, 165-172.
7. Bhui-Kaur A. Goodman M.F. and Tower J. (1998). DAN mismatch Repair Catalyzed by extracts of mitotic, posmitotic and senescent *Drosophila* tissues and involvement of mei-9 gene function for full activity. **Mol. Cell Biol.** **18:3**, 1436-1443.
8. Boffa L.D. and Allfrey V.G. (1978) Selective inhibition by sodium cyanate of protein synthesis in tumor cells. **J. Cell. Biol.** **78**: 362 (A).

9. Bohr V.A., Wassermann K., and Kraemer K.H (1993). DNA repair mechanisms. Alfred Benzon Symposium No. 35. Copenhagen: Munksgaard, pp. 1-428.
10. Boyd J.B. and Harris P.V. (1987) Isolation and Characterization of a Photorepair-Deficient Mutant in *Drosophila melanogaster*. **Genetics** **116**, 233-239.
11. Brown E.R., Hazdra J.J., Keith L., Greenspan I., Kwapinski J.B. and Beamer P. (1973) Frequency of fish tumors found in a polluted watershed as compared to no polluted Canadian water. **Cancer Res.** **33**, 189-198.
12. Brusick J. (1980) Principles of General Toxicology. Plenum Press, New York.
13. Budnik L.D., Sokal D.C., Falk H., Logue J.N. and Fox J.M. (1984). Cancer and birth defects near the Drake Superfund site, Pennsylvania. **Arch. Environ. Health**, **39**, 409-413.
14. Buffler P.A., Crane M. and Key M.M. (1985). Possibilities of detecting Health effects by studies of populations exposed to chemicals from waste disposal sites. **Environ. Health. Perspect**, **62**, 423-456.
15. Butterworth M. F., Gonshebbatt M. E. (2000). Biomonitor and biomarkers as indicators of environmental change 2. Kluwer Academic/Plenum Publishers, N.Y.
16. Cadenas R. (1999). Residual steam to energy: project for "Los Azufres" geothermal Field, México. **Geothermics** **28**, 395-423.
17. Castellani (1998). DNA damage and Repair. Chap. DNA repairs of alkylation damage and its relevance to mutation fixation in mammalian

- cell. Bignami M. Aquilina G. Zijno A. Frosina G. Abbondandolo A. and Dogliotti E.
18. Claxton L.D., Houk V.S. and Hughes T.J. (1998) Genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mutat. Res.** **410**, 237-243.
19. Comisión Federal de Electricidad PEMEX, subgerencia del Centro General de Operaciones de Ductos. Ubicación de geotermoelectricas Los Azufres.
20. DeMarini D.M., Brusick D.J. and Lewtas J. (1987). Used of limited protocols to evaluate the genotoxicity of hazardous waste in mammalian cell assay: comparison to *Salmonella*, **J. Toxicol. Environ. Health**, **22**, 225-239.
21. DeMarini D.M., Gallagher J.E., Houk V.S. and Simmons J.E. (1989). Toxicological evaluation of complex industrial waste: Implications for exposure assessment. **Toxicol. Letters**. **49**, 199-214.
22. Dusenbery R.L. and Smith P.D. (1996) Cellular response to DNA damage in *Drosophila melanogaster*. **Mut. Res.** **364**, 133-145
23. EDITORIAL (1991). Geotermia. **Rev. Mex. de Geoenergía**, **7 (3)**, 263-264.
24. <http://Flybase>. Report, (2000)
25. <http://Flybase.bio.indiana.edu:82> (2003)
26. Friedberg, E. C. (1980). DNA REPAIR, WH Freeman and Co. New York, U.S.A. 840 pp.
27. Fujikawa K. (1993) Genotoxic potency in *Drosophila melanogaster* of

selected aromatic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons as assayed in the ADN repair test. **Mutation Res.** **290**, 175-182.

28. González, C. E. and Ramos, M. P. (1997). Sodium azide induces mitotic recombination in *Drosophila melanogaster*. **Mut. Res.** **389**, 157-165.
29. Graf U. and Singer D., (1992). Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Rev. Int. Contam. Ambient.** **8 (1)**, 15-27.
30. Graf U., Würigler F., Katz A., Frei H., Juon H., Hall C. and Kale P., (1984). Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. **Environ. Mutagen.** **6**, 153-188.
31. Griffith J., Duncan R.C., Riggan W.B. and Pellom A.C. (1989). Cancer mortality in U.S. countries with Hazardous waste sites and ground water pollution. **Arch. Environ. Health.** **44**, 69-74.
32. Grisham J.W. (1986). Health Aspects of the Disposal of Waste Chemicals. **Pergamon Press.** N. Y. 454 pp.
33. Hari K. L., Santerre A., Sekelsky J. J., Mc.Kim K.S., Boyd J.B and Hawley R.S. (1995). The mei-41 Gene of *Drosophila melanogaster* is a structural and functional homologue of the Human Ataxia Telangiectasia gene. **Cell.** **82**, 815-821.
34. Hershberger J.C., Cullen I.J., Calabrese M.J. and Spero P.M. (1984). Epidermal, hepatocellular and cholangiocellular carcinomas in brown bullheads, *Ictalurus nebulosus* from industrially polluted Black River, Ohio. **Mar. Environ. Res.** **14**, 535-536.
35. Houk V.S. and DeMarini D.M. (1988). Use of the Microscreen phage-induction assay to assess the genotoxicity of 14 Hazardous industrial

- wastes. **Environ. Mol. Mutagen.** **11**, 13-29.
36. Houk V. S. (1992). The genotoxicity of industrial wastes and effluents, a review. **Mutat. Res.** **277**, 91-138
37. Hu J., Luke A., Chellani M., Zurvi K. A. and Lea M. A. (1988) **Biochem. Pharm.** **37** (11), 2259-2266.
38. INEGI, Sector Eléctrico Mexicano 1993.
39. Inoue H., Baba H., Awano K. and Yoshikawa k. (1995) Genotoxic effect of griseofulvin in somatic cell of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Res.** **343**, 229-234.
40. Jimenez M.I. (1998) Efecto del Cianato de Sodio (NaOCN) sobre la actividad genotóxica del sulfato de níquel (NiSO₄) evaluado mediante la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en alas de *Drosophila melanogaster*. **Tesis Licenciatura** (Biología). UNAM, México.
41. Keith C. T. and Schreiber S.L. (1995) PIK-Related Kinases: DNA Repair, Recombination, and Cell Cycle Checkpoints. **Science.** **270**, 50-51
42. Klekowski E. and Levin D.E. (1979). Mutagens in a river Heavily polluted with paper recycling waste: Results of Field and laboratory mutagen assays. **Environ. Mutagen.** **1**, 209-219.
43. Lea M.A., Koch M.R. and Morris H.P. (1975) Tumor selective inhibition of incorporation of H-labeled amino acids into protein by cyanate. **Cancer Res.** **35**: 2321-2326.
44. Lehninger A. L. (1995) Principios de Bioquímica. Ediciones OMEGA S. A. Barcelona

45. Linsdley, L. and Zimm, G. (1992) The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, Inc. U.K. 1142 pp.
46. López A. H. (1991). Geología de los Azufres. **Geotermia Rev. Mex. De Geoenergía**, 7 (3), 265-275.
47. Mapas cartográficos. Los Azufres E14A15 Maravatio. 1:500000
48. Monografía geológico-minera del estado de Michoacán. Consejo de Recursos Minerales SECOFI. Coordinación General de Minería (1995).
49. Moses R.E. and Summers W.C. (1988) DNA Replication and Mutagenesis. Chp. 49. Pags. 445-450.
50. Muñoz H. A. (1997). Comparación del potencial aneuploidogénico de compuestos citostáticos en células de alas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias U.N.A.M. México D. F. 70 pp.
51. Najem G.R., Louria D.B., Levanhar M.A. and Feuerman M. (1985). Clusters of cancer mortality in New Jersey municipalities; with special reference to chemical toxic waste disposal sites and per capita incom. Intl. **J. Epid.** 14, 528-537.
52. Nakamura Y. K., Kawai Z., Furukawa H., Matsuo T., Shimoi K., Tomita I. y Nakamura Y. (1997). Suppressing effects of S-methyl methanethiosulfonate and diphenyl disulfide on Mitomycin C induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster* and micronuclei in mice. **Mut. Res.** 385, 41-46
53. Negishi T., Sheatoni T., Fijikawa 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 ADN damages detected by the ADN-repair test. **Mutation Res.** 252, 119-128.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

54. Nguyen T.D., Boyd J.B. and Green M.M. (1979) Sensitivity of *Drosophila* Mutants to Chemical Carcinogens. **Mutation Res.** **63**: 67-77.
55. Nickoloff J.A. and Hoekstra M.F. (1998) DNA Damage and repair. Vol. 1 Human Press, Tatowa U.S.A.
56. Nivard M.J.M., Pastink A. and Vogel E.W. (1996). Mutational spectra induced under distinct excision repair conditions by 3 methylating agents: N-methyl-N-nitrosourea, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina and N-nitrosodimetilamina in postmeiotic male. Germ cells of *Drosophila*. **Mutat. Res.** **352**, 97-115.
57. Ordaz, T. M. G. (1991). Valoración de la prueba para detección de mutación y recombinación somática (SMART) empleando células del ojo de *Drosophila melanogaster*. Tesis de licenciatura. Fac. Ciencias, U.N.A.M Mex. D.F.
58. Obana H., Kumeda Y., Nishimune and Usami Y. (1994) Direct detection using the *Drosophila melanogaster* DNA-repair test and isolation of a DNA-damaging mycotoxin, 5,6-dihydropenicillic acid, in fungal culture. **Fd. Chem.Toxic**, **32**:1, 37-43.
59. Onho H., Hanaoka F. and Yamada M. (1982) Inducibility of sister chromatid exchanges by heavy metals ions. **Mutat. Res.** **104**:141-145.
60. Popoca, C. M. A. (2001) Actividad mutagénica de compuestos orgánicos asociados a sedimentos del Río Zahuapan, mediante el empleo de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura, Esc. Biología, U.A.P. Puebla, Mex.
61. Rani A. S., Qu D. Q. and Sidhu, M. K. (1993) **Carcinogenesis** **14** (5), 947-953.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

62. Ramos M. P., Abundis H.M., Gaytán J. C., Ordaz M. G., Orozco P. G., Maldonado J., Hernández J., González E., Reyes P., Galicia E., Muñoz J. A., (1993) Manual de laboratorio de genética para *Drosophila melanogaster*, Mc Graw-Hill, México, 131 pp.
63. Ramos M. P. (1994) Efecto genotóxico de algunas sales de Arsénico en *Drosophila melanogaster*. Tesis Doctoral, U.N.A.M. Facultad de Ciencias, México D. F.
64. Ramos M. P., Ordaz M. G., Dorantes A., Rivas H., Campos P. Martínez M. y Hernández B. (2000). *Drosophila* is a reliable biomonitor of water pollution. Butterwoth F, Gonsebatt ME (ed). **Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change 2**. 257-299. Kluwer Academic/Plenum Publisher, N. Y.
65. Rivas, M. H. (1999), Participación de la reparación en el daño inducido por mutágenos con diferente actividad química: N-Nitrosodimetilamina (DMN), Metil-Metano-Sulfonato (MMS), Colchicina, Azida de Sodio y Cloruro de Plomo. Tesis de licenciatura, E.N.E.P Iztacala U.N.A.M. Mex. 61pp.
66. Rivedal E. and Saner T. (1980) Synergistic effect on morphological and benzo (a) pyrene. **Cancer Lett.** **8**, 203.
67. Rodríguez-Arnaiz R. and Ramos M.P. (1986) Mutagenicity of nickel sulphate in *Drosophila melanogaster*. **Mutat. Res.** **170**: 115-117.
68. Sancar A. and Sancar G. B. (1988). DNA repair enzymes. **Ann. Rev. Biochem.** **57**, 29-67.
69. Sekelsky J.J., Mckim K.S., Chin G.M. and Hawley R.S. (1995). The *Drosophila* meiotic recombination gene *mei-9* encodes a homologue of

- the yeast excision repair protein RAD1. **Genetics** **141**, 619-627.
70. Sekelsky J.J., Burtis K.C. and Hawley R.S. (1998) Damage control: The pleiotropy of DNA repair genes in *Drosophila melanogaster*. **Genetics** **148**, 1587-1598.
71. Sekelsky J.J., Brodsky M.H., and Burtis K.C. (2000 a) DNA Repair in *Drosophila*: Insights from the *Drosophila* genome sequence. **The J. Cell Biol.** **150**, 31-36.
72. Sekelsky J.J., Hollis K.J., Eimerl A.I., Burtis K.C. and Hawley R. S. (2000 b) Nucleotide excision repair endonuclease genes in *Drosophila melanogaster*. **Mutat. Res.** **459**, 219-228.
73. Simmons J.E., DeMarini D.M. and Berman E. (1988). Lethality and hepatotoxicity of complex waste mixture. **Environ. Res.** **46**, 74-85.
74. Singh I. (1984) Induction of gene conversion and reverse mutation by manganese sulphate and nickel sulphate in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutat. Res.** **137**, 47-49.
75. Sirover M. A. and Loeb L. A. (1976) Infidelity of DNA synthesis in vitro, screening for potential metal mutagens or carcinogens. **Science.** **194**, 1434-1436.
76. Suzuki T., Hayashi M., Wang X., Yamamoto K., Ono T., Myhr B.C. and Sofuni T. (1997) A comparison of the genotoxicity of ethylnitrosourea and ethyl methanesulfonate in lacZ transgenic mice (Muta Mouse). **Mutat. Res.** **395**, 75-82.
77. The Merck Index (1989) An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals, 11 ed., Merck & Co. Inc., USA.

78. Verma, P. M., González, B. V., Sandoval, M. F., Tapia, S.R., Casimiro, E.E., Fernández, S. E., Rye, R., Gent, C. y Jonson C. (1998) Caracterización química e isotópica de las precipitaciones pluviales en el campo Geotérmico de Los Azufres, Mich., México y en zonas de referencia. **Geotermia Rev. Mex. De Geoenergía**, **4 (1)**, 55-68.
79. Vianna N.J. and Polan A.K. (1984). Incidence of low birth weights among Love Canal residents. **Science**. **226**, 1217-1219.
80. Vogel E.W., Nivard M.J.M., Ballering L.A.B., Bartsch H., Barbin A., Nair J., Comendador M.A., Sierra L.M., Aguirrezabalaga I., Tosal L., Ehrenberg L., Fuchs R.P.P., Janel-Bintz R. Maenhaut-Michel G., Montesano R., Hall J., Kang H., Miele M. Thomale J. Bender K., Engelbergs J. and Rajewsky M.F. (1996) DAN damage and repair in mutagenesis and carcinogenesis: implications of Structure-activity relationships for cross-species extrapolation. **Mutat. Res.** **113**, 177-218.
81. Weinert T.A., Kiser G.L. and Hartwell L.H. (1994). Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair. **Genes and Develop.** **8**, 652-665.
82. Witthe P.A., Rasmussen J.B. and Blaise C. (1996) Comparing the presence, potency and potential hazard of genotoxins extracted from a broad range of industrial effluents. **Environ. Mol. Mut.** **27**, 116-139.
83. Williams P.L. and Burson J.,C. (1985) Industrial toxicology. Safety and Health Applications in the Workplace. Chapter 14. Van Nostrand Reinhold. N.Y. pp.273-299.
84. Würgler F. E. and Graf U. (1982) Stability of *Drosophila melanogaster* chromosomes replicating for the first time in a repair-deficient cell. **Mut. Res.** **92**, 99-106.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

85. Würzler F. E. and Vogel E. (1987) *In vivo* mutagenicity using somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Chemical mutagens principles and methods for their detection**. Ed. Plenum Press. New York. Vol. 10, pp. 111-164.
86. Zijlstra J. A. (1987) Pharmacological and Mechanistic Aspects of Chemically Induced Mutagenesis in *Drosophila melanogaster*: Chapters 2, 6 and 7. Druk, Krips Repro Meppel. 200 pp.
87. Zimmering, S. (1982). Chromosome loss induced by Cyclophosphamide in ring X males of *Drosophila melanogaster*. **Mut. Res.** **105**, 85-88.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN