



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**EFFECTOS GENOTÓXICOS INDUCIDOS POR
LA EMETINA EN EL ENSAYO w/w+ DE
*Drosophila melanogaster***

TESIS

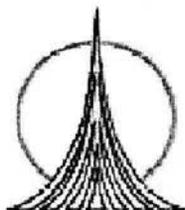
**PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

PRESENTA:

MARIA LUISA CARBAJAL RIVERA

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNAIZ
(FACULTAD DE CIENCIAS)**

**ASESOR INTERNO:
DR. MARIO ALTAMIRANO LOZANO
(FES ZARAGOZA)**



JUNIO 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A MIS PADRES

POR SU CARIÑO, APOYO Y DEVOCIÓN
LES DEDICO ESTE TRABAJO CON TODO
MI AMOR.

A MIS HERMANAS Y HERMANO

SANDY, ALE, ROSY, PERA, GABY Y
JUAN LES DEDICO ESTE TRABAJO
CON TODO MI CORAZÓN.

A MIS FAMILIARES

PERITA, LUZ MA. Y SOFIA COMO UNA
PEQUEÑA MUESTRA DE MI
AGRADECIMIENTO Y CARIÑO.

A MI ASESORA DE TESIS

A LA DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNAIZ

DE MANERA MUY ESPECIAL, DEDICO ESTA
TESIS POR SU INVALUABLE AYUDA
COMPRESIÓN Y APOYO.
PARA ELLA MI GRATITUD IMPERECEDERA

A LAS PROFESORAS

GUADALUPE ORDAZ Y AMÉRICA CASTAÑEDA
POR SU INAPRECIABLE AYUDA Y POR HACERME
SENTIR COMO EN FAMILIA.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS

A ALEX, POR SU INVALUABLE AYUDA
A JUDITH, HORACIO, MEMO POR SU
APOYO Y ALEGRÍA Y EN GENERAL A
TODOS MIS COMPAÑEROS DE
LABORATORIO POR SU AMISTAD Y
SOLIDARIDAD.

EN GENERAL

A TODAS LAS PERSONAS QUE
HICIERON POSIBLE ESTE TRABAJO
LES DOY LAS GRACIAS.

INDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	3
La toxicología genética	3
Los citocromos P450	6
La emetina	7
<i>Drosophila melanogaster</i>	10
Ciclo de vida	10
Resistencia a plaguicidas y metabolismo de xenobióticos	14
Citocromos P450 en <i>Drosophila</i>	15
El ensayo SMART	16
Planteamiento del problema	21
Hipótesis	21
Objetivo general	21
Objetivos particulares	21
3. Materiales y métodos	23
Compuesto químico	23
Pruebas de toxicidad	23
Tratamiento	23
Líneas de <i>Drosophila melanogaster</i> y sistemas de cruce	24
Ensayo SMART	25
Tratamiento estadístico	29
4. Resultados	31
5. Discusión	40
6. Conclusiones	44
7. Referencias	45
8. Tablas y gráficas	54

RESUMEN

Uno de los organismos más útiles en la toxicología genética es la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* por su capacidad para detectar, en las células somáticas, sustancias químicas capaces de reaccionar con macromoléculas celulares, provocando mutación, recombinación, delección y pérdida cromatídica. Recientemente esta prueba se ha mejorado con el uso de diversas cepas resistentes a pesticidas, las que han mostrado poseer una capacidad alta de biotransformación y permiten evaluar el efecto del metabolismo en la inducción de daño genético. El ensayo *w/w+* detecta en forma sencilla el cambio genético inducido por genotoxinas en *Drosophila melanogaster* mediante el análisis de manchas blancas que se observan en un contexto de ojos rojos las que pueden ser debidas en mayor medida a recombinación mitótica y en menor grado a mutación somática. Los eventos se generan a partir del daño inducido en una célula de los discos imaginales de las larvas los que al dividirse se manifiestan fenotípicamente en una etapa posterior como un clon. El compuesto analizado fue el alcaloide emetina. Los alcaloides son compuestos que la mayoría son tóxicos en los seres humanos. Así mismo se trató de detectar sus posibles relaciones entre dos tipos de cruza. La cruza tradicional entre hembras de ojos blancos y machos de ojos rojos (cruza 1) que valora la inducción de recombinación mitótica y, la cruza entre hembras heterocigotas que portan un cromosoma X en anillo y machos con cromosoma en varilla (cruza 2) y que permite el análisis simultáneo de la inducción tanto de recombinación mitótica como de aneuploidías. Se emplearon dos cepas para la realización de la prueba: la estandar (ST) que es silvestre, y la línea Haag (HG) que es resistente a pesticidas; la cepa ST contiene niveles basales de citocromo P-450, sin embargo la cepa Haag sobreexpresa de forma constitutiva altos niveles de P450. El compuesto se probó de manera aguda

por alimentación a larvas de 72 ± 3 hrs. durante 6 hrs. Los testigos concurrentes se trataron con el solvente que consistió en etanol al 2%. Se analizaron los ojos de las hembras F1 w/w+ . Se contó y clasificó la presencia de clones blancos (w) en el contexto de ojos silvestres (w+). Los resultados se evaluaron mediante la prueba de X^2 para proporciones (Frei y Würzler, 1988). Se compararon las frecuencias inducidas y el tamaño de manchas por ojo. La emetina mostró los siguientes efectos:

- (a) El alcaloide requiere ser metabolizado.
- (b) Se propone que la biotransformación genera un metabolito intermedio (la cefalina) que es reactivo.
- (c) La activación metabólica se lleva a cabo probablemente por las enzimas de la subfamilia CYP6 que son similares a las de la subfamilia CYP3 de los seres humanos.
- (d) El alcaloide induce tanto recombinación mitótica en la cepa resistente a pesticidas (Hague-R) como pérdida del cromosoma X en la cepa susceptible a pesticidas (estandar).

INTRODUCCIÓN

La toxicología genética.

La toxicología genética es una disciplina científica que trata de identificar y analizar los mecanismos de acción y las propiedades de aquellos agentes físicos, químicos o biológicos que sean capaces de producir efectos tóxicos en el material genético de los seres vivos. Muchos agentes tóxicos dañan el material genético a niveles que producen muerte celular y toxicidad generalizada, por lo que el objetivo primordial de la toxicología genética es el de detectar aquellos agentes (físicos, químicos o biológicos) capaces de interactuar con los ácidos nucleicos, en especial con el ácido desoxiribonucleico (DNA) que es el material genético de casi todos los organismos. La toxicología genética trata principalmente de identificar a los agentes que son capaces de interactuar con el DNA, a niveles de exposición que no se consideran tóxicos o a lo sumo subtóxicos (Brusick, 1987).

El término genotóxico fue usado por primera vez por Ehrenberg *et al.*, (1973), al establecer la relación entre la inducción de cáncer y daño genético. En 1983 la Comisión Internacional para la protección contra los mutágenos y Carcinógenos Ambientales (ICPEMC, 1983) estableció que el término genotóxico se refiere a aquellos agentes que son capaces de interaccionar con el DNA.

Los agentes genotóxicos pueden inducir diferentes eventos genéticos, tales como mutaciones puntuales, aberraciones cromosómicas, rompimientos cromatídicos o cromosómicos, recombinación mitótica y apoptosis.

Un compuesto mutagénico es aquél que induce mutaciones en el DNA que se heredan a los descendientes. Un compuesto carcinogénico es aquél que produce mutaciones en las células somáticas, lo cual podría estar asociado con los procesos de iniciación o promoción del cáncer (Beranek, 1990).

Un compuesto teratogénico es aquél que induce alteraciones genéticas y epigenéticas durante el desarrollo y formación del individuo (Moore, 1979), en tanto que un compuesto recombinogénico es el que es capaz de inducir recombinación mitótica en las células somáticas, lo que conduce a la pérdida de la heterocigosis y a la expresión de genes recesivos (Vogel, 1990). Un compuesto clastogénico es aquel que es capaz de romper a los cromosomas (Vogel y Nivard, 1999).

La inducción de daño genético por genotoxinas es un proceso que se lleva a cabo en las células mediante varios pasos: a) interacción del compuesto con el DNA, b) reparación o no del daño inducido y c) expresión del daño a nivel biológico (Vogel, 1990, 1992).

(a) *La interacción química del compuesto con el DNA* puede llevarse a cabo de forma:

1. Directa cuando los compuestos son activos por sí mismos, es decir, que no requieren de activación metabólica para mostrar su genotoxicidad.
2. Indirecta cuando el agente requiere ser modificado con el concurso de diversas enzimas para poder luego unirse covalentemente a las macromoléculas y provocar cambios en el DNA (Rodríguez-Arnaíz y Ramos Morales, 1992).

Por lo que con base en las propiedades químicas de los agentes genotóxicos, éstos se clasifican en directos, cuando reaccionan con el DNA sin activación metabólica; e indirectos ó promutágenos que son aquellos que requieren ser biotransformados.

La mayoría (cerca del 80%) de los compuestos genotóxicos son inertes, es decir, son lipofílicos a pH fisiológicos por lo que a través del metabolismo se convierten en productos hidrofílicos más fácilmente excretables. La

biotransformación de los compuestos extraños al metabolismo (denominados xenobióticos) se realiza en las células en dos fases: la fase I del metabolismo, o fase de funcionalización, en la que el compuesto inerte es activado por reacciones como la oxidación, la reducción o la hidrólisis, generándose así un compuesto electrofílico más fácilmente excretable, pero que también es capaz de interaccionar con los sitios nucleofílicos del DNA. Esta fase del metabolismo se lleva a cabo en las células con el concurso de diversas enzimas, tales como aquellos dependientes de los citocromos P450 y las esterasas (Rodríguez-Arnaiz, 2002). La fase II del metabolismo es la fase de conjugación, en la que el metabolito electrofílico es captado por diversas enzimas, tales como glutatión-S transferasas y las paraoxonasas, generándose un producto hidrosoluble conjugado que será más fácilmente excretado (Rodríguez-Arnaiz, 2002).

(b) Reparación del daño inducido.

La reparación del DNA es un proceso enzimático que se presenta naturalmente en las células. La interacción inicial de una genotoxina con el DNA produce un aducto, y éste podrá o no podrá ser removido de la macromolécula mediante las enzimas que participan en la reparación. La reparación será eficiente cuando se restituya la secuencia original y será deficiente o promotora de errores cuando el mecanismo de reparación introduce errores en la secuencia de nucleótidos (Vogel, 1990).

(c) Expresión biológica del daño

Si el daño genético inducido por una genotoxina no es reparado o si la reparación ha promovido errores, entonces el daño se expresará a nivel biológico. Si el compuesto es muy tóxico, el efecto biológico se manifiesta a través de la muerte de la célula o del individuo, considerándose letal. En dosis subtóxicas, la genotoxina puede inducir cambios genéticos en las células y dependiendo de la estirpe celular o del momento del desarrollo, la expresión biológica del daño podrá ser mutagénica, carcinogénica o teratogénica.

Los citocromos P450

Las enzimas oxidasas de función mixta denominadas P450 se encuentran en el retículo endoplásmico y en las mitocondrias de casi todos los seres vivos. Metabolizan tanto compuestos endógenos, tales como esteroides y ácidos grasos, así como compuestos exógenos (xenobióticos) tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos, drogas y pesticidas (González y Gelbain, 1991). Además estas enzimas confieren resistencia a insecticidas en los insectos (Gandhi *et al.*, 1992).

La modificación enzimática mediada por los citocromos P450 de los sustratos endógenos y exógenos se realiza mediante diversas reacciones de oxidación y reducción que corresponden a la fase I del metabolismo. Cada citocromo P450 es un sistema de multicomponentes que está ligado a membranas e involucra al menos tres proteínas: citocromo P450, citocromo b_5 y NADPH-citocromo P450 reductasa, así como oxígeno molecular (Omura y Sato, 1964).

Los P450 se denominan oxidasas de función mixta porque en ellas un átomo de la molécula de oxígeno es reducido a agua y el otro lo emplean para oxidar al sustrato (Estabrook y Cohen, 1969). La incorporación de oxígeno molecular al sustrato lo hace más hidrofílico, por lo cual las reacciones mediadas por los citocromos P450 son básicamente de desintoxicación. Sin embargo, en el caso de diversos promutágenos y procancerígenos, la biotransformación mediada por P450 produce metabolitos intermedios electrofílicos que son capaces de interactuar con los sitios nucleofílicos del DNA y provocar daño genético (González y Kimura, 2001).

Los citocromos P450 constituyen una superfamilia de genes que está presente en bacterias, algas, hongos, plantas y animales (González y Gelbain, 1991). Su número varía en las especies entre 50 y 200 genes (Nelson *et al.*, 1996). Entre los individuos de una especie existen enormes diferencias en la capacidad metabólica en particular la que se refiere a la activación de procarcinógenos, hecho que podría explicar, al menos en parte, la susceptibilidad individual frente a los agentes químicos que producen cáncer (Nebert, 1991).

La mayoría de los genes que codifican para los citocromos P450 están regulados, se expresan como una respuesta adaptativa al estrés ejercido por los compuestos xenobióticos, de modo que, los fenómenos de inducción e inhibición de los P450 están relacionados con la regulación de su expresión génica. Los mecanismos de inducción resultan por la activación transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona, mientras que los de inhibición implican la detención e inhibición de la enzima correspondiente (Rodríguez-Arnaiz, 2002).

La emetina

La emetina es el alcaloide principal de la ipecacuana que se extrae de las raíces de la rubiácea *Uragoga ipecacuanha* (Fig. 1). En la medicina tradicional se emplea como antiamebicida cuando cursan infecciones pulmonares y como emético (vomitivo).

La ipecacuana ha mostrado ser un emético eficiente, ya que se ha empleado con éxito en los procesos de desintoxicación de los seres humanos adultos (Gordon, 1985). El jarabe de ipecacuana induce la actividad del nervio vago aferente (Endo *et al.*, 2000) y mostró una alta afinidad por diversos receptores neuronales como el receptor de la hidroxitriptamina (5-HTA) (Hasegawa *et al.*, 2002).

En un caso de ingestión crónica de emetina en un ser humano se encontraron diversas anomalías en la cavidad oral: alteraciones estructurales en las fibras bucales debidas a oxidación, atrofia muscular y actividad incrementada de los lisosomas (Kuntzer *et al.*, 1989). El abuso en el consumo de emetina provoca disfunciones cardiacas, daño al miocardio y, puede provocar la muerte (Pan y Combs, 1995; Ho y Cohen, 1998). En exposiciones agudas puede reducir la fuerza de contracción del músculo cardiaco, por lo que la emetina es cardiotóxica (Lemmens *et al.*, 1996).

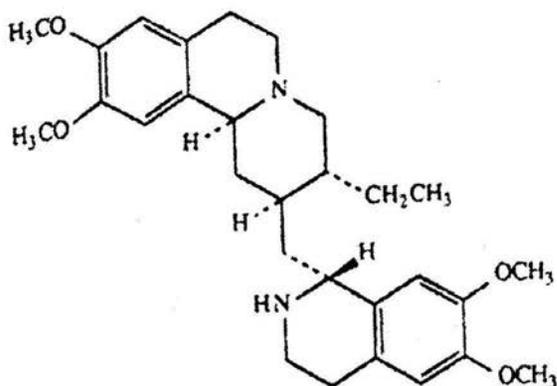


Fig. 1. Fórmula molecular de la emetina (Merck-Index, 1989).

La emetina se ha empleado en pacientes con desórdenes alimenticios, tales como la anorexia y la bulimia (Ho y Cohen, 1998), y recientemente se ha utilizado con éxito en la terapia contra el alcoholismo, ya que se ha mostrado que inhibe a las deshidrogenasas y suprime la adicción al alcohol (Nikolaenko, 2001).

La emetina es un agente inmunosupresor, inhibe el desarrollo y diferenciación celular del timo en ratones. Los eventos tempranos de

diferenciación del timo se analizaron, mediante la expresión de los genes *c-myc* y *c-fos*, encontrándose un decremento gradual a nivel del RNAm de estos oncogenes y un aumento en la actividad de la tirosinasa (Schweighoffer *et al.*, 1993). El tratamiento con emetina en ratones adultos indujo en los timocitos, la fosforilación en diversos fragmentos de RNAm naciente (Csuka y Banfalvi, 1997), y en células de criceto chino inhibe la síntesis de proteínas (Leatherman y Middlebrook, 1993; Rosenwald *et al.*, 2001), así como la actividad enzimática de los leucocitos leucémicos en células humanas *in vitro* (Rao *et al.*, 1999).

La emetina inhibe la síntesis de ácidos grasos de cadena larga, ya que interfiere en la L-carnitina, que es el transportador esencial dentro de la mitocondria involucrado en la biosíntesis de los lípidos (Sengupta y Sengupta, 1995; Wagner *et al.*, 2000).

En estudios de farmacocinética, llevados a cabo para evaluar el rango de absorción y el tiempo de eliminación de la emetina en los seres humanos, se detectó en sangre en los primeros 5 minutos, encontrándose su máxima concentración a los 20 minutos; a las 3 horas ya no se detectó en la sangre circulante (Scharman *et al.*, 2000; Matsuoka *et al.*, 2001). La emetina es metabolizada por la fracción microsomal de hígado humano, biotransformación que es mediada por dos isoformas del citocromo P450. La enzima CYP3A4 convierte a la emetina en cefalina (9-O-dimetilemetina) (Fig. 2) y, la CYP2D6 en otra reacción de O-desmetilación en 10-O-dimetilemetina (Asano *et al.*, 2001).

El alcaloide ha sido empleado también para combatir las infecciones producidas por diversas especies de *Trypanosoma (brucei y congolense)* y de *Amoeba proteus*, estableciéndose que los mecanismos de acción pudieran ser la inhibición en la biosíntesis de proteínas y/o la intercalación de algunos de los metabolitos en el DNA. En ambos organismos la emetina mostró además ser citotóxica (Schenkel *et al.*, 1996; Merschjohann *et al.*, 2001). En cuanto a la

genotoxicidad, la dihidroemetina mostró ser mutagénica en *Salmonella typhimurium* y en *Escherichia coli* (Espinosa-Aguirre *et al.*, 1994).

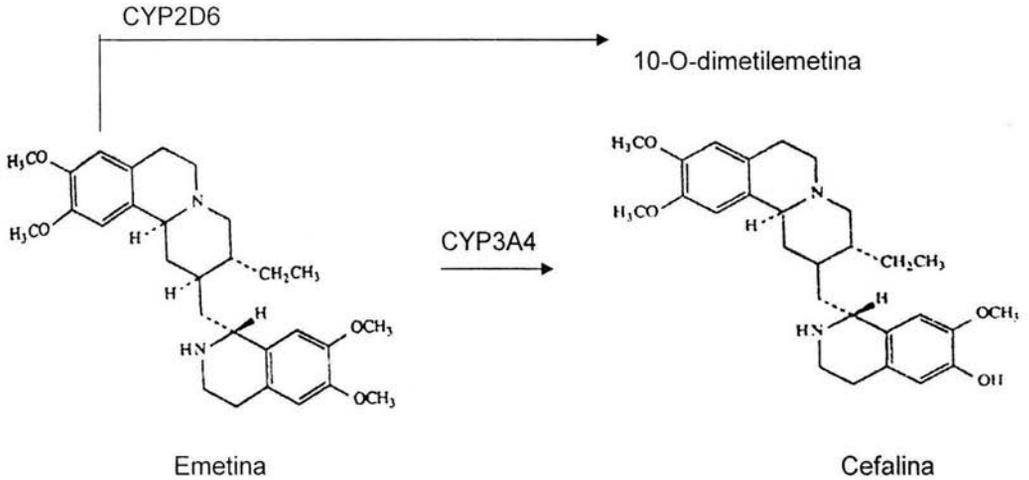


Fig. 2. Metabolitos intermedios de la emetina en la fracción microsomal del hígado humano (Index-Merck, 1989).

Drosophila melanogaster

Ciclo de vida

Después de la fertilización del óvulo inicia el desarrollo del organismo a partir del cigoto o huevo, el cual es depositado en el medio de cultivo. Las siguientes divisiones mitóticas dan origen a una larva que pasa por 3 estadios, el último se transforma en una pupa. En esta etapa de desarrollo se diferencian los órganos y por último eclosiona el imago o adulto. Su ciclo de vida es aproximadamente de 10 días a 25 grados centígrados y con una humedad relativa del 60% (Fig. 3) (Demerec, 1965).

El ciclo de vida depende de la temperatura; si ésta es mayor a 30°C, las moscas pueden volverse estériles o morir; si las temperaturas son menores a 25°C, el ciclo se alarga: a 15°C el ciclo de vida dura 18 días y a 10°C tiene una duración de 57 días (Zimmering, 1976).

Las larvas presentan fenotípicamente 2 tipos de células; a) larvarias y, b) imaginales las que alcanzan su diferenciación al entrar a la metamorfosis en la pupa. Su crecimiento es por divisiones mitóticas sucesivas en diferentes periodos del desarrollo de la larva.

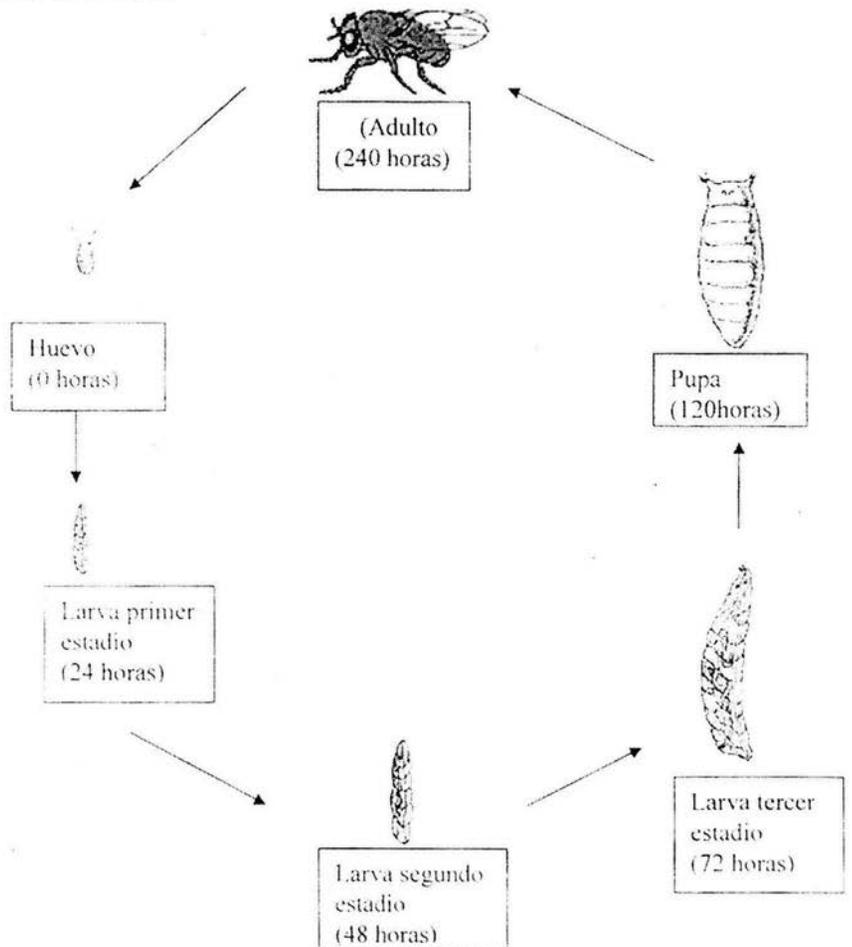


Fig. 3. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (modificado de medio Carolina).

Las células larvarias forman el cuerpo de la larva, se dividen continuamente durante estos estadios (Demerec, 1965; Würgler y Vogel, 1986). Las células de los discos imaginales siguen un ritmo de división característico y diferente al de las células larvales. En la larva de tercer estadio se distinguen los siguientes discos: labial (lb), tráquea (tr), disco de la antena (a), disco del ojo (e), disco del primer par de patas (I), del segundo par de patas (I2), del tercer par de patas (I3), disco del halterio (h), testículo (t), disco del ala (w), ovario (o) y disco genital (g) (Demerec, 1965). De todos los anteriores sólo el disco imaginal que dará origen al ojo se comienza a diferenciar tempranamente (Fig. 4).

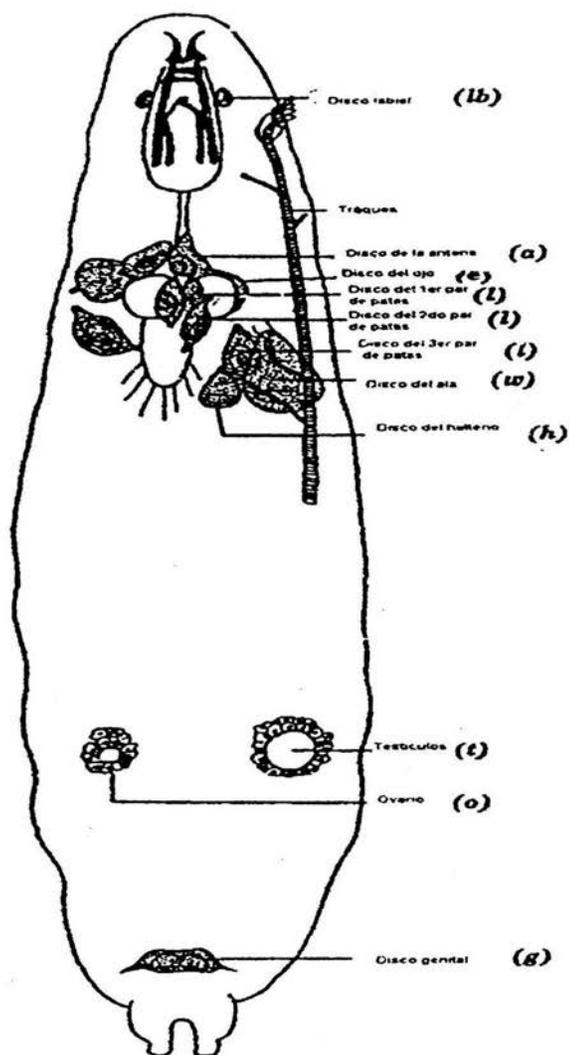


Fig. 4. Localización e identificación de los discos imaginales en una larva madura de *Drosophila melanogaster* (Demerec, 1965).

Resistencia a plaguicidas y metabolismo de xenobióticos.

Existen cepas de *Drosophila melanogaster* que tienen la capacidad de sobrevivir a toxinas que son letales a sus congéneres susceptibles. En virtud de que el empleo de sustancias químicas sintéticas ha generado resistencia a los mismos por parte de los organismos, se considera que este aspecto puede ser aplicado como un modelo para estudiar las bases moleculares del cambio evolutivo, en particular, sobre la adquisición cualitativa de fenotipos diferentes (Wilson, 2001). Se ha calculado que existen alrededor de 450 especies de insectos y ácaros que han desarrollado resistencia a plaguicidas. Dicha resistencia involucra un número finito de reacciones bioquímicas y de opciones genéticas. Se han encontrado tres tipos de adaptaciones bioquímicas que confieren resistencia a productos químicos utilizados como pesticidas:

1. *Decremento en la absorción.* La participación de los genes que controlan la penetración del insecticida y la retardan.
2. *Modificación del sitio blanco.* El insecticida al haber ingresado al organismo interactúa con las moléculas blanco, usualmente proteínas y altera su función, debido a cambios sutiles en la proteína.
3. *Aumento en los mecanismos de desintoxicación,* mecanismo de resistencia que es el más importante en el reino animal. Está mediado por los citocromos P450 en la fase I del metabolismo o por las glutatión S-transferasas (GST) en la fase II del metabolismo. La resistencia metabólica a insecticidas y a productos químicos en general se debe principalmente a cambios en los mecanismos de expresión génica ya sea por un aumento en la transcripción del gen que confiere resistencia (sobrexpresión) o por el incremento en el número de copias génicas (amplificación). La sobreexpresión constitutiva es el mecanismo más importante de resistencia en *Drosophila* (Rodríguez-Arnaiz, 2002) y se presenta tanto en los genes que codifican para los citocromos P450 como en las que codifican para las GSTs.

Los citocromos P450 en *Drosophila*

Los citocromos P450 están incluidos a nivel subcelular en la bicapa lipídica del retículo endoplásmico liso y en las mitocondrias. Se localizan a nivel tisular en mayores concentraciones en el intestino medio, en los cuerpos grasos pericuticulares y en los túbulos de Malpigio (Hodgson y Randy, 1991).

Los citocromos P450 en *Drosophila* están involucrados en la síntesis de diversas hormonas tales como las juveniles, que se expresan durante el desarrollo larvario, y los ecdiesteroides que participan en la metamorfosis del insecto (Rodríguez-Arnaiz, 2002). Se ha mostrado que las enzimas de la familia 6, en particular CYP6A2, participan en la biotransformación de sustratos exógenos generándose daño genético (Saner *et al.*, 1996).

Los citocromos P450 de *Drosophila* pertenecen a las familias: 4,6,9,12,18 y 28. Sólo los genes de la familia 4 incluyen frecuencias que se encuentran en los vertebrados, los genes de las otras cinco familias son específicos de *Drosophila* (Nelson *et al.*, 1996). Muchas de las secuencias génicas están agrupadas, hecho que revela su origen evolutivo por duplicación (Rodríguez-Arnaiz, 2003).

Con la secuenciación completa del genoma de *Drosophila melanogaster*, hecho que ocurrió en el año 2000, fue posible establecer por métodos bioinformáticos (algoritmo BLAST) la presencia de 90 secuencias P450: de ellas 83 corresponden a genes funcionales y 7 a pseudogenes (Tijet *et al.*, 2000), solamente 5 de los 83 genes carecen de intrones. Más de la mitad de los genes pertenecen a las familias 4 y 6. La mayoría de los genes están agrupados y se localizan en los cromosomas 1, 2 y 3; el cromosoma 2 contiene más de la mitad de los genes que codifican para estas enzimas. De todos estos genes solamente han sido caracterizados funcionalmente 2: CYP6A2 que participa en la

biotransformación de sustratos exógenos (Saner *et al.*, 1996) y el CYP6G1, único gen que confiere resistencia a pesticidas en *Drosophila* (Daborn *et al.*, 2002).

El empleo de cepas resistentes a pesticidas ha mostrado, para el caso de numerosas proenotoxinas ambientales, que existe una correlación entre la biotransformación de compuestos químicos orgánicos ubicuos en el ambiente y la resistencia a pesticidas, fenómeno mediado por los citocromos P450 (Rodríguez-Arnaiz *et al.*, 1993; Dunkov *et al.*, 1996; Rodríguez-Arnaiz y Ordaz, 2002).

El ensayo SMART

En general para evaluar los efectos genotóxicos inducidos por diversos tipos de compuestos químicos se emplean en el bioensayo organismos con ciclo de vida corto, cuyos aspectos genéticos sean bien conocidos y que dejen gran número de descendientes. *Drosophila melanogaster* es un organismo que se considera un buen modelo biológico de prueba ya que se conoce muy bien su biología, sus cromosomas se encuentran totalmente mapeados tanto a nivel genético y citológico como a nivel molecular. Además, es un organismo que ha acompañado a los genetistas en el establecimiento de diversos conceptos, mecanismos y procesos esenciales, así como en la construcción del edificio conceptual de la disciplina (Rodríguez-Arnaiz, 2003).

Para evaluar los efectos genéticos que producen los compuestos químicos se han desarrollado técnicas en líneas de *Drosophila melanogaster*, entre los que destaca el ensayo SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) o prueba de inducción de mutación somática y recombinación mitótica. La prueba SMART inicia empleando los marcadores de células de los discos imaginales de las alas en *Drosophila* y se valida con varios compuestos (Graf *et al.*, 1984). Después se propusieron ensayos empleando los discos imaginales del ojo: *white-coral*, *white-zeste*, *white-ivory* y la más reciente *white*.

El propósito de la prueba SMART es el de detectar, de forma sencilla, el cambio genético inducido por genotoxinas en *Drosophila melanogaster* mediante el análisis de manchas que se observan en la superficie del adulto debidas a la recombinación mitótica y a la mutación somática. Estos eventos se generan a partir del daño inducido en una célula de los discos imaginales de las larvas los que al dividirse se manifiestan fenotípicamente en una etapa posterior como un clon (Graf *et al.*, 1989). Los clones serán de mayor tamaño (>64 células) si son inducidos al inicio de la vida larvaria, mientras que los producidos en el segundo y tercer estadio serán sucesivamente más pequeños.

El ojo compuesto de la *Drosophila melanogaster* está formado por cerca de 800 unidades fundamentales llamadas omatidias, las cuales provienen de una serie de divisiones en los discos imaginales de los ojos durante los tres estadios larvarios, encontrándose cerca de 20 células en el primer estadio, de 100 a 150 en el segundo y de 780 a 800 en el tercero (Becker, 1976). El número de divisiones celulares se calcula con la fórmula 2^n , por lo que en el primer estadio se dan 4 divisiones celulares, en el segundo 3 y en el tercero 3.

El ensayo de mutación somática y recombinación mitótica que emplea el marcador *white*, que produce ojos color blanco, se basa en la obtención de hembras transheterocigotas (*w/w+*). Durante el desarrollo embrionario de éstas pueden inducirse diversas alteraciones genéticas que producirán una mancha blanca (clon) en el contexto de los ojos rojos. El clon mutante puede haberse originado por mutación somática, recombinación mitótica y aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas (no disyunción) (Fig. 5). Estos eventos genéticos pueden originarse por la unión de la genotoxina mediante enlaces químicos covalentes con el DNA, por la inhibición de la síntesis del DNA, por la inhibición de la polimerización de las proteínas que forman el huso y por agentes intercalantes (Würgler y Vogel, 1986; Vogel y Nivard, 1993) por lo que se ha mostrado que la mayoría de las manchas provienen de recombinación mitótica, ya

que al emplear líneas portadoras de una inversión que involucra a casi todo el cromosoma X, el número de manchas recobradas se reduce considerablemente (García-Bellido y Wandosell, 1978; Vogel y Szakmary, 1990; Ballering *et al.*, 1993).

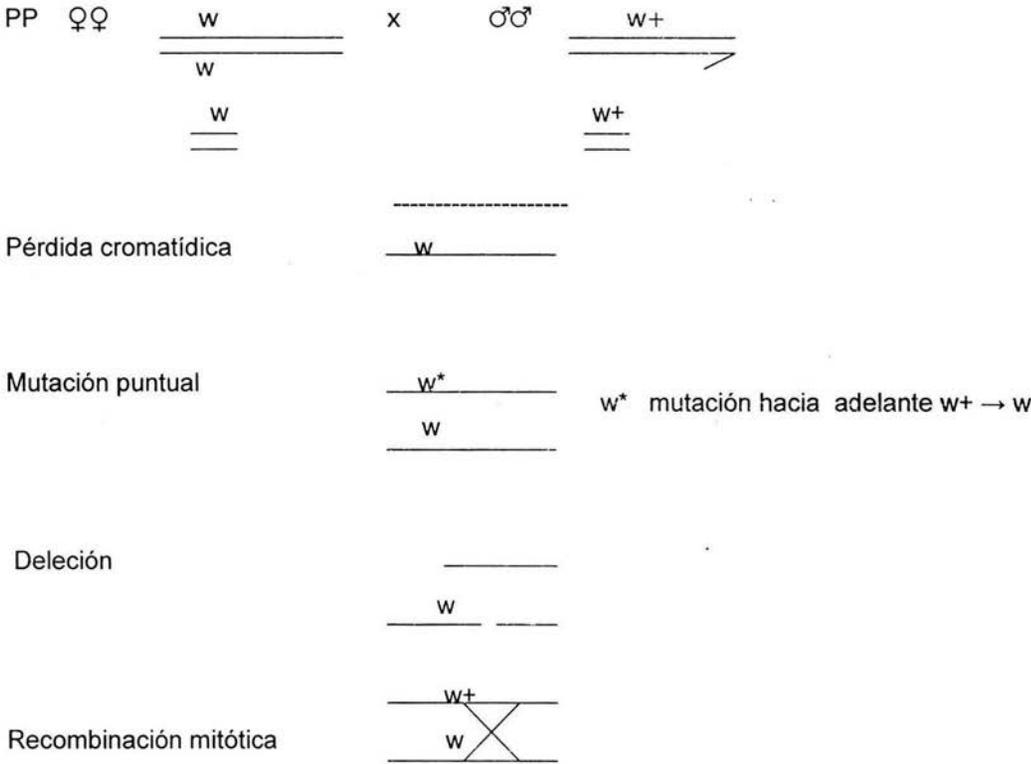


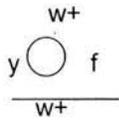
Fig. 5. Eventos genéticos que pueden producir un clon *white* (*w*) en *Drosophila*.

Desde un punto de vista cuantitativo, la recombinación mitótica constituye el mayor evento más frecuente (85%), medido por el sistema *w/w+*.

El ensayo SMART-ojo puede combinarse con el empleo de diversas cepas resistentes (IR) y cepas susceptibles a insecticidas (IS), de las cuales las primeras muestran mayor capacidad de biotransformación (Vogel *et al.*, 1991). De estas cepas, la Hague-R ha mostrado que biotrasforma sustratos tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos y las aminas aromáticas (Rodríguez-Arnaiz *et al.*, 1993; Rodríguez Arnaiz y Ordaz, 2002). El ensayo w/w+ de *Drosophila* permite detectar fundamentalmente la recombinación mitótica que causa pérdida de la heterocigosis del alelo silvestre. Cuando se emplean cepas susceptibles y cepas resistentes a pesticidas es posible estudiar el papel que desempeñan los citocromos P450 en la biotransformación de progentoxinas (Rodríguez Arnaiz *et al.*, 1993). Con un sistema de cruza apropiado será posible detectar, además de la recombinación mitótica inducida, aberraciones cromosómicas estructurales, las cuales involucran también un rompimiento en el DNA y el rearreglo posterior. Para esta prueba se requiere emplear líneas que porten un cromosoma en anillo para seguir, en las células somáticas, su pérdida a través de la formación de clones visibles como pequeñas manchas blancas en el contexto del ojo rojo (Fig. 6) (Vogel y Nivard, 1999).

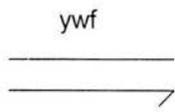
En este trabajo se evaluará el efecto genotóxico inducido por la emetina en las células somáticas de *Drosophila melanogaster* mediante el ensayo w/w+, empleando dos sistemas de cruza: (1) estándar, con cepas susceptibles (IS) y resistentes (IR) a pesticidas; (2) recombinación mitótica y pérdida de los cromosomas sexuales, en cepas susceptibles y resistentes a pesticidas.

P ♀♀



x

♂♂



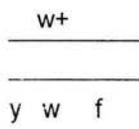
++

cuerpo amarillo, ojos blancos, cerdas forked

F1

hembras

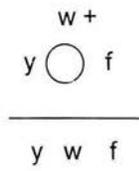
XX



++

hembras

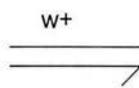
XrX



yf

machos

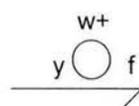
XY



++

machos

XrY



yf

Fig. 6. Recombinación mitótica y pérdida del cromosoma X en el ensayo w/w+.

Planteamiento del problema

La emetina es un fármaco que se utiliza en tratamientos de diversos trastornos de salud, sin embargo, existen algunas evidencias de que este alcaloide podría ser genotóxico. Ante este problema, es necesario investigar sus efectos en organismos modelo, tales como la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y, de esta manera contribuir al conocimiento de los efectos de dicho fármaco.

Hipótesis

Si la emetina es un compuesto genotóxico, entonces inducirá recombinación mitótica y pérdida del cromosoma X en las células somáticas de *Drosophila melanogaster*, teniendo como consecuencia que en el ensayo w/w+ la frecuencia de manchas en las series tratadas es mayor que en los testigos concurrentes.

Objetivo general

Evaluar el efecto genotóxico inducido por la emetina mediante el ensayo somático w/w+ de *Drosophila melanogaster*.

Objetivos particulares

- Obtener la LD₅₀ para la emetina
- Obtener la curva dosis-respuesta

- Comparar la respuesta inducida por la emetina en cepas susceptibles y resistentes a pesticidas.
- Determinar el papel que desempeña el metabolismo en los distintos sistemas de cruzas
- Analizar la frecuencia de pérdida del cromosoma X inducida por el alcaloide
- Deducir el mecanismo de acción de la emetina

MATERIALES Y MÉTODOS

Compuesto químico

La emetina (CAS 483-18-1) fue adquirida de la casa comercial SIGMA (San Luis Missouri,EUA). El compuesto se disolvió en alcohol al 2%.

Pruebas de toxicidad

En experimentos preliminares se determinó la toxicidad del alcaloide. Se encontró la dosis letal media (LD_{50}), parámetro que se emplea para conocer cuál es la concentración a la que muere el 50% de los organismos en un período de 48 hrs.

Se colocaron 10 individuos adultos en frascos homeopáticos (viales) en un rango de concentraciones de emetina que iban de 0.5 mM a 50 mM, tomándose las lecturas del número de individuos muertos cada 4 horas, durante 48 hrs. La prueba se realizó por duplicado. La LD_{50} resultó ser la concentración de 0.5 mM. Se probaron además 2 concentraciones adicionales por debajo de este parámetro: 0.125 y 0.250 mM.

Tratamiento

El alcaloide fue probado mediante tratamientos agudos a larvas de 72 ± 3 horas de edad durante 6 hrs (Fig. 7)

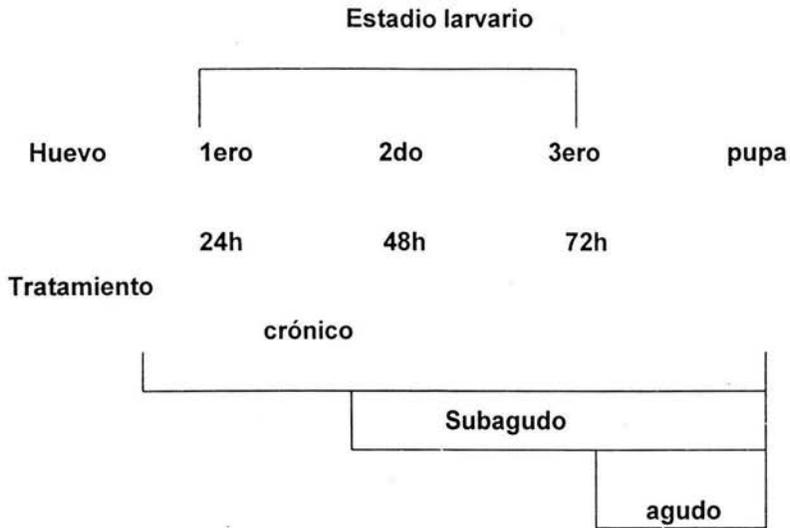


Fig. 7. Tipos de tratamientos a larvas de *Drosophila melanogaster*.

Líneas de *Drosophila melanogaster* y sistemas de cruce

Se emplearon las siguientes 4 líneas de *Drosophila* en el ensayo:

- (a) una cepa susceptible a pesticidas (IS): ♀♀ *w/w* (*w-white*, color de ojos blanco)ST, ♀♀ *y/y* (*y-yellow*, color de cuerpo amarillo) ST y ♂♂ *y/Y* ST.
- (b) cepa resistente a pesticidas (IR): ♀♀ *w/w* HG-R, ♀♀ *y/y* HG-R y ♂♂ *y/Y* HG-R
- (c) *y-f* (*f-forked*, cerdas acortadas) con cromosoma X en anillo (*Xr*) susceptible a pesticidas.
- (d) cepa *ywf* susceptible a pesticidas.

Las cruzas fueron de dos tipos:

- (1) La cepa ST-*w* (♀♀) se cruzó con (♂♂) ST-*y* y la cepa HG-*w* (♀♀) se cruzó con ♂♂ HG-*y* para obtener hembras transheterocigotas (*w/w+*) (Fig. 8).

(2) Tanto para (IS) como para (IR) ♀♀ hembras silvestres se cruzaron con ♂♂ yf (Xr) y las ♀♀ de la F1, se cruzaron con ♂♂ ywf para obtener los fenotipos: ♀♀++(XX), ♀♀yf (XrX), ♂♂++(XY) y ♂♂yf (XrY) (Fig. 9).

Los cultivos se mantuvieron a 25° C y 60% de humedad.

El marcador para la detección de mutación y recombinación somática empleado fue el que produce color de ojos blanco (*w-white*). Se encuentra en el cromosoma X a 1.5 unidades de mapa (X-1.5) (Lindsley y Zimm, 1992).

En las cruzas 1 y 2 se emplearon entre 100 hembras vírgenes y 50 machos en frascos lecheros, donde se dejaron durante 3 días, se sincronizaron durante 6hrs para que ovipositaran las hembras y a las 72±3 hrs se retiraron las larvas, empleando una solución de sacarosa al 20% con ayuda de un embudo de separación. Después se tomaron aproximadamente 300 larvas para cada concentración de emetina y se colocaron en un vial sin fondo, sellado con tela en un extremo y en el otro con un tapón de esponja. El vial se colocó dentro de un vaso de precipitado pequeño con la emetina disuelta en etanol al 2%, en las concentraciones de 0.125 mM, 0.250 mM, 0.5 mM. Las larvas del testigo se trataron con una solución de etanol al (2%). Las larvas del testigo y de cada uno de los tratamientos permanecieron en las soluciones respectivas durante 6 hrs, pasadas las cuales se transfirieron a frascos lecheros con medio de cultivo hasta terminar su desarrollo. El análisis de los ojos se realizó entre el primer y el 5° día después de la emergencia de los adultos.

Ensayo SMART

Las hembras adultas w/w+ de la cruz 1 y las adultas provenientes de la cruz 2 fueron anestesiadas con éter etílico. Posteriormente se colocaron en una solución de alcohol etílico al 96% (90 partes), Tween 80 (1 parte) y agua destilada

(9 partes). Sobre una platina y con un pincel delgado se detuvieron del abdomen de manera que se fueran observando los diferentes ángulos de los ojos. Las manchas u omatídias afectadas se detectaron bajo un microscopio de disección a 120x. Si las manchas estaban separadas por cuatro omatídias entre sí se consideró que provenían de dos eventos genéticos diferentes.

Para evaluar el efecto genotóxico del compuesto utilizado, se hizo una distinción entre manchas chicas y grandes (Vogel, 1992; Vogel y Nivard, 1993). Las chicas tienen de 1 a 2 omatídias afectadas, mientras que las grandes más de 2. Las manchas totales se obtuvieron sumando las manchas chicas y las grandes.

El porcentaje de manchas por ojo se obtuvo dividiendo el número de manchas (chicas, grandes y totales) entre el número de ojos analizados multiplicado por 100, mientras que para la frecuencia inducida se restó el porcentaje de manchas totales por ojo de los grupos tratados, del encontrado en los testigos concurrentes.

$$\% \text{ manchas por ojo} = \frac{\text{Manchas (chicas, grandes y totales)}}{\# \text{ ojos analizados}} \times 100$$

$$\text{Frecuencia inducida} = \begin{array}{l} \% \text{ manchas totales} \\ \text{por ojo de los grupos} \\ \text{tratados} \end{array} - \begin{array}{l} \% \text{ manchas totales} \\ \text{por ojo de los} \\ \text{testigos concurrentes} \end{array}$$

Fig. 8. Cruza 1:

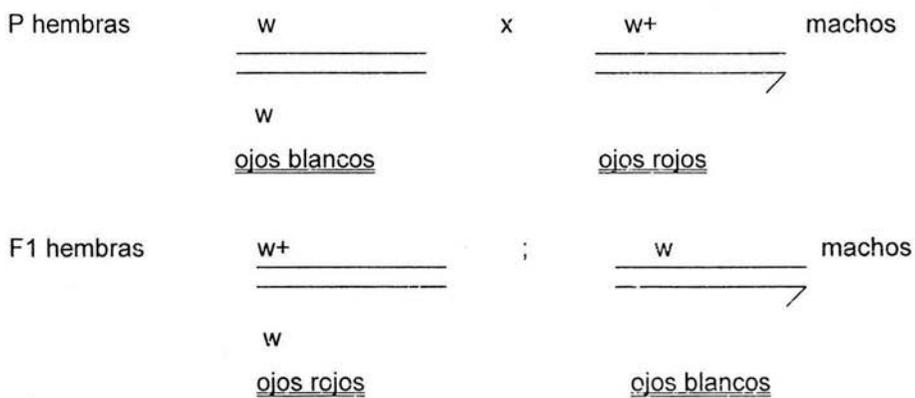
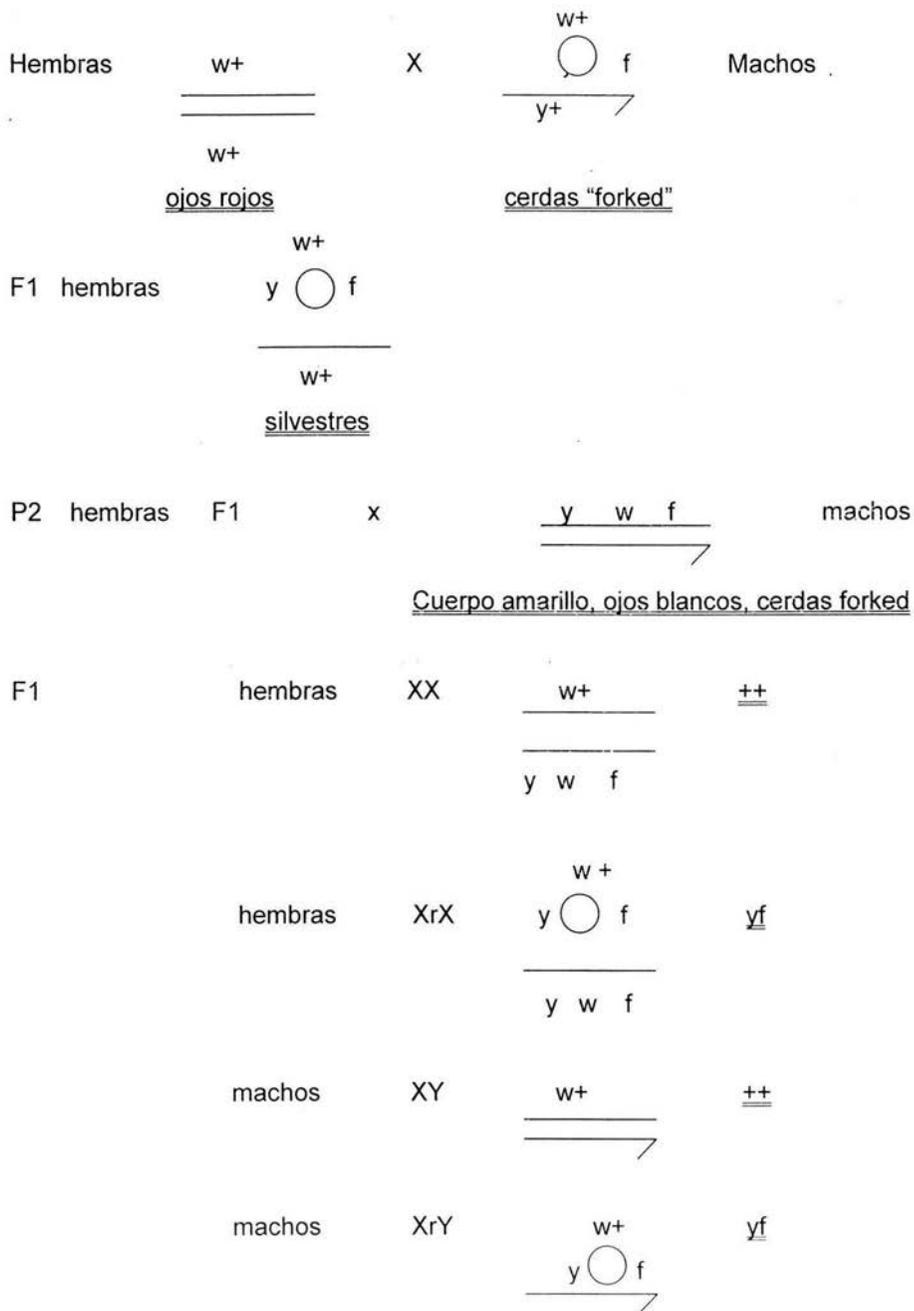


Fig.9.Cruza 2



Tratamiento estadístico

Con el fin de evaluar y distinguir si los resultados son positivos, inconcluyentes, débiles positivos o negativos en pruebas de mutagénesis para *Drosophila* los resultados se analizaron mediante la prueba de decisión múltiple Selby y Olson de acuerdo con Frei y Würigler (1988) en la cual se contrastaron las siguientes hipótesis:

Hipótesis nula (H_0) que propone que no hay diferencias en las frecuencias de mutación entre el testigo concurrente y las series tratadas.

Hipótesis alternativa (H_A) que postula que los resultados del tratamiento incrementarán m veces la frecuencia espontánea.

De acuerdo a lo anterior se tienen las siguientes opciones:

Si la H_0 es aceptada y la H_A rechazada, el resultado será negativo

Si la H_0 es rechazada y H_A aceptada, el resultado es positivo

Si se rechazan la H_0 y la H_A , el resultado será débil positivo

Si se aceptan tanto la H_0 como la H_A , el resultado será inconcluyente (Fig. 10)

Hipótesis	Ha	
	Aceptada $1-\beta$	Rechazada β
Ho aceptada $1-\alpha$	Inconcluyente $P= (1-\alpha) (1-\beta)$ $= 1-\alpha-\beta +\alpha\beta$	Negativo $P= (1-\alpha)\beta$ $= \beta -\alpha\beta$
Rechazada α	Positivo $P= \alpha(1-\beta)$ $=\alpha-\alpha\beta$	Débil positivo $P= \alpha\beta$

Fig. 10. Probabilidad de error (P) para cada uno de los cuatro posibles diagnósticos (positivo, negativo, débil positivo e inconcluyente) (Frei y Wurgler 1988).

Los resultados del tratamiento estadístico se confirmaron con la prueba de X^2 para proporciones (Kastenbaum y Bowman, 1970), considerando:

N_c = Número de ojos analizados en el testigo

N_t = Número de ojos analizados en la serie tratada

n = número total de mutaciones

p = proporción de mutaciones en el testigo

q = proporción de mutaciones en la serie tratada

Bajo la H_0 .

$$p_0 = N_c/(N_c+n) \quad q_0 = N_t/(N_c+N_t)$$

Donde p_0 y q_0 representaron los números de mutaciones esperadas en el testigo y la serie tratada respectivamente.

Bajo la H_a

$$p_a = N_c/(N_c+mN_t) \quad q_a = N_t/(N_c+mN_t)$$

Donde p_a y q_a representaron los números de mutaciones esperadas bajo H_a en el testigo y la serie tratada respectivamente.

Regla de decisión para ambas hipótesis: Si X^2 experimental $> X^2$ ($=0.05$)($n=1$) se rechaza H_0 ó H_a , según sea el caso.

RESULTADOS

Las concentraciones de emetina en los tratamientos agudos fueron 0.5mM, 0.250mM, 0.125mM, los testigo se trataron con el solvente (etanol al 2%).

Cada experimento se realizó con al menos una repetición, se compararon los resultados obtenidos en los tres experimentos mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis (paquete estadístico de cómputo, Statistica versión 6.0). No se observaron diferencias significativas entre las repeticiones de cada experimento ($p > 0.05$) por lo cual se procedió a la suma de los resultados de los experimentos respectivos. El análisis de datos se realizó mediante la prueba X^2 para proporciones.

En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos de la cruza 1 al exponer a larvas IS e IR de 72 ± 3 hrs de edad a diferentes concentraciones de emetina.

En las tablas 2 y 3 se muestran los resultados obtenidos con la cruza 2 al exponer a larvas HG-R y ST respectivamente de 72 ± 3 hrs de edad a diferentes concentraciones del compuesto.

Cruza 1

En la cepa estandar (IS) la frecuencia espontánea de manchas totales fue de 6.3%. Las manchas chicas y grandes se presentaron en una proporción un poco mayor a 1 (1.18). El tamaño promedio del clon fue de 6.97. En la cepa Hague-R (IR) la frecuencia espontánea de manchas totales fue de 13.3. Las

manchas chicas y grandes mostraron una relación de 2 (8.9/4.4). El tamaño promedio del clon mostró ser de 2.63 (Tabla 1).

El tratamiento agudo con emetina a las larvas de la craza estándar indujo una frecuencia total de manchas/ojo de 11.6 en la concentración más baja (0.125mM) y de 6.4 en la más alta (0.50mM) resultados que mostraron no ser estadísticamente significativos al compararlos con el testigo concurrente (Tabla 1). El tamaño promedio del clon osciló entre 3.44 y 6.3 . La distribución de manchas por tamaño se muestra en la gráfica 1. Puede notarse que las manchas chicas (1 a 2 omatidias afectadas) se presentaron en un número mayor que las grandes. La relación entre manchas chicas y grandes fue de 1.5 en la concentración más baja y de 1 en la más alta.

El tratamiento con emetina a las larvas de la craza resistente a pesticidas mostró inducir una frecuencia total de manchas (%) de 37 y 29.5 en las concentraciones de 0.125 y 0.250 mM respectivamente y de 22 en la más alta. Al comparar estas frecuencias con el testigo concurrente mostraron ser estadísticamente significativas las dos primeras (Tabla1). La distribución de manchas por tamaño se muestra en la gráfica 2. Las manchas chicas presentaron una relación de 3 veces mayor que las grandes. El tamaño promedio del clon en todas las concentraciones fue de alrededor de 3 omatidias afectadas.

La comparación de la frecuencia de manchas chicas, grandes y totales en las cepas ST y HG se muestra en la gráfica 3. Puede notarse que la contribución más importante al total de manchas se debe a la aportación de las manchas chicas.

La frecuencia inducida por la emetina de manchas totales en la cepa ST y HG se muestra en la gráfica 4. La relación con respecto a la concentración fue similar en ambas cepas: mayor en las concentraciones más bajas y menor en la más alta. Esta relación indirectamente proporcional solo fue significativa en las

concentraciones más bajas. Esta gráfica representa el comportamiento neto de los genotipos susceptibles y resistentes a pesticidas de la cruz 1, ya que a la frecuencia total de las series tratadas en las tres concentraciones se le restó la frecuencia espontánea.

Cruza 2

En la tabla 2 se muestra la distribución de manchas en los genotipos portadores de Xs lineal (ST) y de Xs en anillo.

Los genotipos de la cruz 2 ST son los siguientes: ♀♀++XX, ♀♀ yf rXX, ♂♂ ++XY, ♂♂ yf rXY.

En las ♀♀++XX la frecuencia espontánea de manchas totales para el testigo concurrente fue de 5 y la proporción de manchas chicas con respecto a las grandes de 1.24, mientras que el tamaño promedio del clon resultó ser de 5.5.

La frecuencia de manchas totales fue de 12.49 en la concentración más baja y de 8.03 y 7.89 en las concentraciones intermedias (0.25mM) y alta (0.50mM) respectivamente. El tamaño promedio del clon osciló entre 3.29 y 5.85, mostrando ser sólo la concentración más baja significativa, desde el punto de vista estadístico. La distribución de manchas por tamaño muestra que la frecuencia de manchas chicas (1-2 omatidias) es mayor que la frecuencia de manchas grandes (>2 omatidias) (Gráfica 5). En la gráfica 6 se muestra que el total de las manchas se debe en mayor medida a las manchas chicas.

En las ♀♀ yf rXX se encontró una frecuencia espontánea de manchas totales de 18.33, mientras que la relación de manchas chicas con respecto a las grandes fue de 4.5 y el tamaño de clon en promedio de 2.36 (Tabla 2).

En las series tratadas, la frecuencia total de manchas más alta fue de 31.61 en la concentración de 0.50mM, mientras que para las concentraciones más baja

e intermedia fueron de 29.78 y 28.69 respectivamente. El tamaño promedio del clon osciló entre 1.18 y 2.65. Desde un punto de vista estadístico las concentraciones baja y alta mostraron ser significativas (Tabla 2). La distribución de manchas en cuanto al tamaño indica que las manchas chicas (1 a 2 omatidias) son proporcionalmente más frecuentes que las manchas grandes (>2 omatidias) (Gráfica 7).

La gráfica 8 muestra que la frecuencia de manchas chicas al total de las manchas es la contribución más importante al efecto observado.

En el fenotipo ♂♂ ++XY la frecuencia total espontánea de manchas fue de 5.42, la proporción de manchas chicas en comparación con las grandes es de 3.4 y el tamaño promedio del clon fue de 2.45 (Tabla 2).

La frecuencia total de manchas más alta resultó ser la de 0.125mM con 8.82% y de 7.82% y 6.45% para las concentraciones de 0.25 y 0.50mM respectivamente. El tamaño promedio del clon varió entre 2.1 y 3.16. Desde el punto de vista estadístico ninguna de las tres concentraciones resultó ser significativa (Tabla 2). La distribución de manchas por tamaño indica que la frecuencia de manchas chicas (1-2 omatidias) es mayor que la de manchas grandes (>2 omatidias) (Gráfica 9).

En la gráfica 10 las manchas chicas muestran una relación inversamente proporcional a la concentración, al igual que el comportamiento de las manchas totales. Por otro lado los valores más altos son los de las manchas chicas.

Para el genotipo ♂♂ yf rXY la frecuencia espontánea de manchas totales fue de 7.54, la relación de manchas chicas con respecto a las manchas grandes fue de 7.02, mientras que el tamaño promedio del clon fue de 2.5 (Tabla 2).

El valor de la frecuencia total de manchas fue de 30 en la concentración más baja, 12.67 en la intermedia 0.25mM y 14.04 en la concentración más alta.

Mientras que el valor p para las 3 concentraciones del tamaño promedio del clon fue de 2. Dos de las concentraciones fueron estadísticamente significativas (Tabla 2). La distribución de manchas por tamaño muestra que la frecuencia de manchas chicas (1 a 2 omatidias) es mayor en gran proporción que las manchas grandes (>2 omatidias), principalmente en la concentración más baja (Gráfica 11).

En amplio rango podemos observar en la gráfica 12 que los valores que más influyen en la frecuencia de manchas totales son los de las manchas chicas.

En la gráfica 13 se observa la frecuencia inducida de manchas totales comparando los 4 fenotipos de la cruce 2ST. Se muestra que los portadores de cromosoma circular presentan mayor respuesta que los genotipos con cromosoma en varilla: 11.45 en hembras y 22.46 en machos en la concentración de 0.125mM respectivamente. La frecuencia de pérdida del cromosoma X en anillo de 6.5% encontrada en la concentración más alta, es también estadísticamente significativa. De igual manera las hembras muestran el mismo tipo de respuesta estadísticamente significativa con porcentajes de 11.45% y 13.28% en la concentración más baja y más alta respectivamente. Por el contrario los genotipos con cromosomas en varilla presentan las frecuencias más bajas y sólo una, 0.125mM en hembras, es estadísticamente significativa. Respecto a su comportamiento, los dos genotipos presentan mayor frecuencia en la concentración de 0.125 mM y en la concentración intermedia, mientras la más alta disminuye por lo que la frecuencia es inversamente proporcional a la concentración. Esta gráfica nos proporciona el comportamiento neto de los 4 genotipos de la cruce 2, cepa ST, ya las a las frecuencias totales de mutación para cada concentración se le restaron las frecuencias espontáneas de los testigos correspondientes.

En la tabla 3 se concentran los resultados de la distribución de manchas en los genotipos portadores de Xs lineal (HG) y de Xs en anillo.

Los genotipos de esta cruce son los mismos que los de la cruce 2 ST.

En las ♀♀++XX, la frecuencia espontánea de manchas totales fue de 6.46, la proporción de manchas chicas y grandes fue de 2.09 y el tamaño promedio del clon de 3.2 omatidias afectadas (Tabla 3)

Para las series tratadas, el compuesto indujo una frecuencia total de manchas de 21.56% para la concentración de 0.50mM, mayor que las otras dos concentraciones, de 15.8 y 9.09 en las concentraciones de 0.125 y 0.25mM respectivamente. Las concentraciones de 0.125 y 0.50 mostraron ser estadísticamente representativas. El tamaño promedio del clon no rebasó los límites de 2.67 y 3.53 (Tabla 3). La distribución de manchas por tamaño revela que la frecuencia de manchas chicas (1 a 2 omatidias) es mayor, especialmente en las concentraciones de 0.125 y 0.50 mM que las manchas grandes (>2 omatidias) (Gráfica 14). En la gráfica 15, se muestra que la frecuencia que más aporta al total de las manchas es la de (1 a 2 omatidias afectadas).

En las ♀♀ y rXX, la frecuencia espontánea de manchas totales es de 11.98, la proporción de manchas chicas y grandes es de 8.66 y el tamaño promedio del clon es de 2.06. (Tabla 3).

En cuanto a las concentraciones, de la que se tuvo mayor respuesta fue la de 0.125mM con 14.48% en la más alta 0.50 la respuesta fue de 9.19% y por último la concentración intermedia fue de 7.09%. Estos valores, desde el punto de vista estadístico no indican que la emetina tenga actividad positiva en este genotipo (Tabla 3). El tamaño promedio del clon osciló entre 2.44 y 3.25. La distribución de manchas por tamaño indica que las manchas chicas (1 a 2 omatidias) son mucho más frecuentes que la suma de las otras categorías de manchas (Gráfica 16). Las barras de frecuencias de manchas chicas son casi igual a las de las manchas totales (Gráfica 17).

En las series HG con genotipo ♂♂ ++XY, la frecuencia espontánea de manchas totales fue de 8.52, la proporción de manchas chicas y grandes fue un poco más de 3 veces (3.11) y los clones en promedio fueron de 2.37 omatidias afectadas (Tabla 3).

Para las series tratadas, el porcentaje más alto en cuanto a frecuencias fue el de 15.41% de la concentración intermedia, le siguió el de la concentración baja con 11.9% y por último el de la concentración de [0.50] con 9.74%. El valor más pequeño y más grande de tamaño promedio del clon fue de 1.9 y 2.8 omatidias afectadas, ninguna de las tres concentraciones es estadísticamente significativa (Tabla 3).

La distribución de manchas por tamaño nos indica que las manchas chicas son en gran proporción mayores que las manchas grandes (Gráfica 18). En cuanto a la frecuencia de manchas chicas y grandes, las primeras juegan un papel predominante en la producción de las totales (Gráfica 19).

El genotipo ♂♂ yf rXY muestra una frecuencia espontánea de manchas totales de 10.92, un tamaño promedio del clon de 2.11 y la proporción de manchas chicas con respecto a las grandes es de 5.5 (Tabla 3).

La concentración más baja del tratamiento de la cruce 2HG, fue la que indujo una respuesta mayor. Sin embargo ninguna de las tres concentraciones mostró inducir de forma significativa pérdida de cromosoma X en anillo en los machos. El tamaño promedio del clon osciló entre 1.73 y 2.44 (Tabla 3). La distribución de manchas por tamaño muestra una diferencia muy grande y la mayoría son manchas chicas (1 a 2 omatidias) (Gráfica 20).

La gráfica 21 evidencia que las manchas chicas contribuyen en gran medida a la totalidad de las manchas. Aunque los resultados no son significativos se observa una respuesta indirectamente proporcional a la concentración.

La frecuencia inducida de manchas totales, cruza 2 HG se presenta en la gráfica 22.

De los 4 genotipos solamente uno de ellos (Hembras ++XX), en dos concentraciones los resultados muestran ser estadísticamente significativas, (0.125 con 9.34 % y 0.50mM con 15.13%).

Todas las demás concentraciones en los otros genotipos presentan una respuesta negativa. Ninguno de los genotipos presenta el mismo tipo de comportamiento. Así, por ejemplo machos que portan cromosoma en varilla presentan un pico de actividad en la concentración intermedia respuesta que es diferente al genotipo correspondiente en las hembras (XX). En los organismos que portan un cromosoma en anillo disminuye la respuesta conforme aumenta la concentración, aunque los machos XrY mostraron ser más susceptibles que las hembras XrX. Sin embargo en ambos genotipos la respuesta llegó a cero en la concentración más alta. Esta gráfica nos muestra el comportamiento neto de cada genotipo, ya que a cada frecuencia total de manchas por concentración se le restó la frecuencia espontánea.

En la gráfica 23 se muestra la frecuencia inducida de manchas totales en las hembras HG y ST de la cruza 2. Como se puede observar, éstas presentan un comportamiento similar, la inducción de recombinación mitótica (♀♀ XX) fue significativa en la cruza ST y HG, pero solamente en la cepa HG resultó ser positiva en la concentración más alta. La pérdida del cromosoma en anillo, (♀♀ XrX) mostró ser solamente significativa en la cepa ST.

En la gráfica 24 se muestran las frecuencias inducidas de manchas totales en machos ST y HG-R. Puede notarse que en los machos que portan el cromosoma en varilla (XY) en ambas cruzas (ST y HG) la respuesta es similar en las concentraciones más baja (0.125mM) y más alta (0.50mM), con un ligero

incremento en la cepa HG en la concentración intermedia (0.250mM); sin embargo, ninguna de ellas fue estadísticamente significativa. En los machos que portan el cromosoma en anillo (XrY) la respuesta fue diferente: mientras que en la cepa HG los resultados son estadísticamente no significativos, en la cepa ST la respuesta fue positiva en las concentraciones más baja y más alta.

Discusión

El objetivo general de este trabajo fue el de evaluar el efecto genotóxico inducido por la emetina, mediante el ensayo somático w/w+, empleando tanto el sistema convencional como de recombinación mitótica y de pérdida de un cromosoma X en anillo (medida de clastogenicidad) (Vogel y Nivard, 1999).

Los estudios realizados en *Salmonella typhimurium* y en *Escherichia coli*, mostraron que la emetina es mutagénica en estos organismos (Espinosa-Aguirre *et al.* 1994) y además citotóxica en *Amoeba proteus* (Schenkel *et al.* 1996); sin embargo, las conclusiones obtenidas con estos organismos de prueba deben ser confirmadas en organismos pluricelulares, con metabolismo similar al del ser humano y en este sentido *Drosophila melanogaster* cumple con diferentes ventajas para ser empleada en dicha valoración (Vogel y Sobels, 1976). Por ello pareció una atractiva idea el estudiar los posibles efectos genotóxicos inducidos por la emetina en *Drosophila* y determinar si el alcaloide requiere ser biotransformado, es decir, si es de acción directa o indirecta, objetivo particular que se alcanza al comparar la respuesta en las cepas ST y HG (cruza 1). Así mismo, se valoró con un sistema de cruzas apropiado (cruza 2) si la emetina es capaz de inducir simultáneamente recombinación mitótica y pérdida del cromosoma X en anillo.

Los resultados obtenidos en la cruza 1 muestran que la relación entre la dosis de la emetina y la inducción de daño genético es inversamente proporcional (Gráfica 4). En este ensayo, el alcaloide mostró ser activo solamente en la cepa HG (Tabla 1).

Aunque la cepa ST expresa de manera basal a los citocromos P450 es notable que la respuesta encontrada en la cepa HG se deba a la sobreexpresión

constitutiva de los genes de la superfamilia CYP6 (Rodríguez-Arnaiz, 2003) que participan tanto en la resistencia a pesticidas (Daborn *et al.*, 2002) como en la biotransformación de compuestos xenobióticos (Saner *et al.*, 1996). La emetina es metabolizada en el hígado humano, reacción que produce al metabolito intermedio cefalina (Fig. 2) y que es mediada por CYP3A4 (Asano *et al.*, 2001). Se ha mostrado que los genes de la subfamilia CYP6 de *Drosophila* son semejantes a los de la subfamilia CYP3 de los seres humanos (Aoyama *et al.*, 1989) por lo que la respuesta encontrada en la cepa HG podría deberse a la biotransformación mediada por CYP6.

Los eventos genéticos que pueden producir una mancha blanca en el ensayo w/w+ son: recombinación mitótica, mutación puntual, delección y pérdida cromatídica (Fig. 5), sin embargo, se sabe que la mayoría de las manchas blancas provienen de recombinación mitótica (Vogel y Szakmary, 1990) por lo que el efecto positivo inducido por la emetina en la cepa HG puede deberse casi exclusivamente a recombinación (Gráfica 4).

En células somáticas, la pérdida del cromosoma en anillo puede resultar tanto del rompimiento del mismo como de la inducción de Intercambio de Cromátidas Hermanas (SCEs). Además en células XrX (cruza 2, Fig. 6), el intercambio de información genética entre rX y el cromosoma en varilla en la heterocromatina, la pérdida del cromosoma dicéntrico y la muerte de las células rX/O podría producir una mancha blanca; otra causa para la pérdida del cromosoma X (rX) pudo ser la no disyunción, resultando una aneuploidía (Vogel y Nivard, 1999). Este veneno mitótico débil (clones no mayores de tres veces a los testigo concurrente) se asocia con citotoxicidad. Por otra parte, redujo la sobrevivencia en larvas de 72 hrs de edad (3er estadio) después del tratamiento en algunos genotipos en la cruce 2 ST.

Uno de los principales aspectos de este estudio ha sido el conocer si la emetina es recombinogénica o si induce preferentemente la pérdida del

cromosoma X en anillo lo cual puede ser analizado a través de la inducción de manchas blancas en los 4 fenotipos que se obtienen en la cruce 2.

- a) Hembras XX, recombinación intergénica
- b) Hembras XrX, pérdida de cromosoma circular
- c) Machos XY, recombinación intragénica
- d) Machos XrY, pérdida de cromosoma circular

Los experimentos en larvas de 72 ± 3 hrs de edad fueron adecuados, ya que en cualquiera de los genotipos (XrX, XrY), la pérdida del cromosoma X actúa como un letal, o sea que tales clones sucumben a la competencia celular, puesto que la pérdida del cromosoma X en anillo (rX), si se induce en las células prematidiales del 3er estadio larval, generan clones viables en forma de pequeñas manchas blancas en el ojo adulto (Vogel y Nivard, 1999).

Los resultados obtenidos con la emetina en la cruce ST muestran que induce preferentemente pérdida del cromosoma en anillo puesto que de los 4 genotipos la respuesta es significativa en los organismos que portan cromosoma en anillo y, positiva solamente en las hembras que portan cromosoma en varilla (XX) (Gráfica 13).

Cuatro de los siete tamaños de clase se presentaron en números muy bajos y aproximadamente el 80% de todas las manchas afectadas fueron sólo de 1 a 2 omatidias y cerca del 8% fueron manchas de 3 a 4 células. Este efecto era el esperado, ya que no hay más de 2 ó 3 divisiones mitóticas entre la exposición al compuesto y la formación de manchas visibles blancas (Becker, 1976).

La respuesta de la cepa ST en la cruce 2 con respecto a la inducción de recombinación mitótica intergénica (XX) mostró nuevamente ser inversamente proporcional a la dosis y solamente fue significativa en la dosis más baja (Tabla 2)

activación mediada por los citocromo P450 que se expresa de forma basal. La emetina no indujo recombinación intragénica en los machos que portan el cromosoma X en varilla (XY) (Gráfica 13).

En la cruce 2 con la cepa HG la respuesta fue claramente recombinogénica (Tabla 3). Es probable que a concentraciones bajas el alcaloide fuese activado hacia un metabolito intermedio (cefalina) reactivo. En la dosis intermedia, probablemente se estableció una competencia entre la activación y la desintoxicación y en la dosis más alta la sobreexpresión constitutiva de CYP6 fue la responsable de la respuesta encontrada (Gráfica 22). La respuesta de esta cruce en cuanto a la inducción de pérdida del cromosoma X en anillo fue negativa.

La detección simultánea de recombinación mitótica y pérdida de cromosoma X en anillo permite establecer los mecanismos de acción de los compuestos xenobióticos.

El empleo de este ensayo para valorar la genotoxicidad inducida por la emetina permitió establecer que el alcaloide induce tanto recombinación intergénica (♀♀ XX) en la cepa HG como pérdida del cromosoma X en anillo en la cepa ST (♀♀ XrX) (Gráfica 23). Asimismo, la recombinación intragénica no fue inducida (♂♂ XY) en ninguna de las cepas (Gráfica 24) y nuevamente la pérdida del cromosoma X en anillo en los machos provenientes de la cruce ST fue positiva.

Por lo tanto, el empleo de las dos cepas (estándar y resistente a pesticidas) en los dos ensayos w/w+ (tradicional y el aquí reportado) que miden tanto la recombinación mitótica como las aneuploidías permitió establecer el mecanismo de acción de la emetina y el espectro de efectos genéticos inducidos.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede considerar que:

- (1) La curva dosis-respuesta es inversamente proporcional.
- (2) Es muy probable que la emetina sea de acción indirecta, ya que en la cruce 1 la cepa HG-R presenta una respuesta positiva en la frecuencia inducida de manchas totales, respuesta que es negativa en la cepa ST. La biotransformación del compuesto es probablemente debida a la expresión constitutiva de los genes que codifican para los citocromos P450 de la familia 6.
- (3) En la cruce que valora simultáneamente la inducción de recombinación mitótica y pérdida del cromosoma X en anillo (cruce 2), la respuesta depende del genotipo de los progenitores.
- (4) En la cepa heterocigota que porta un cromosoma X en anillo y cromosomas estandar (ST) la emetina indujo recombinación mitótica (♀♀ XX) solamente en la concentración más baja. La pérdida del cromosoma en anillo fue inducida de forma consistente tanto en ♀♀ XrX como en ♂♂ XrY .
- (5) En la cepa heterocigota XrX-HG el alcaloide solamente produjo recombinación mitótica en las ♀♀ XX , efecto que es similar al observado en el ensayo tradicional w/w+ (cruce 1).
- (6) La emetina es probablemente biotransformada hacia un metabolito intermedio muy reactivo que induce recombinación mitótica; la pérdida del cromosoma X en anillo inducida solamente en la cruce ST probablemente se debe a un evento clastogénico de acción directa.

REFERENCIAS

Aoyama T, Yamano S, Waxman D J, Laponson D P, Meyer V A, Fisher V, Tyndale R, Inaba T, Kalow W, Gelbain H V y González F J (1989). Cytochrome P450 h PCN 3, a novel cytochrome P450 III A gene product that is differentially expressed in adult human liver. *J. Biol. Chem.* 264, 10388-10395.

Asano T, Kushida H, Sadakane C, Ishihara K, Wakui Y, Yanagisawa T, Kimura M, Kamei H, Yoshida T (2001) Metabolism of ipecac alkaloids cephaeline and emetine by human hepatic microsomal cytochrome P450s and their inhibitory effects on P450 enzyme activity. *Biol. Pharm. Bull.*24:678-682.

Ballerig LAP, Nivard MJM y Vogel EW (1993) Characterization of the genotoxic action of three structurally related 1,2-dihaloalkanes in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 285: 209-217.

Becker HJ (1976) Mitotic recombination. En: *The genetics and biology of Drosophila* vol 1c, Academic Press, New York. p 1019-1087.

Beranek., D T (1990) Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutation Res.* 231: 11-30.

Brusick D (1987) *Principles of genetic toxicology*. Plenum Press, New York. 278 p.

Csuka I, Banfalvi G (1997) Analysis of 5'-termini of early intermediates of Okazaki fragments accumulated in thymocytes after emetine treatment of mice. *DNA Cell Biol.* 30:554-561.

Daborn P J, Yen J I, Bogwitz M R, Le Goff G, Feil E, Jeffers S, Tijet N, Perry T, Heckel D, Batterham P, Feyereisen R, Wilson T G, French-Constant R H (2002) A single p450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science* 297:2253-2256.

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

Dunkov B, Rodríguez –Arnaiz R, Pitlendrigh B, French-constant R, Feyereisen R (1996) Cytochrome P450 gene clusters in *Drosophila melanogaster*. *Mol.Gen.Genet.* 251:290-297.

Ehrenberg L, Brookes P, Druckrey H, Lagerlof B, Litwin J, Williams G (1973) The relation of cancer induction and genetic damage. En: *Evaluation of genetic risks of environmental chemicals*. Ambio Special Report N°3. Royal Swedish Academy of Sciences, Universitetsforlaget, Stockholm.

Endo T, Nemoto M, Ogawa T, Tamakai H, Hamaue N, Hirafuji M, Takeda Y, Hasegawa M, Fugii Y, Minami M (2000) Pharmacological aspects of ipecac syrup (TJN-119)-induced emesis in ferrets. *Res.Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*108:187-200.

Espinosa-Aguirre JJ, Aroumir C, Meza M T, Cienfuegos E, Cortinas De Nava C (1994) Genotoxicity of amebicide and antihelmintic drugs in *Escherichia coli* Pol A+/Pol A.Mol. Cell Biol.14:4011-4019.

Estabrook P y Cohen B (1969) *Microsomes and drug oxidations*. J. R. Gillete (Ed) Academic Press, New York, pp 95-109.

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

Gandhi R, Varak E y Goldberg M L (1992) Molecular analysis of a cytochrome P450 gene of family 4 on the *Drosophila* X chromosome. *DNA Cell Biol.* 11:397-404.

García Bellido A y Wandosell E (1978) The effect of inversions on mitotic recombination in *Drosophila melanogaster* *Mol. Gen. Genet.*31:317-321.

González F J y Gelbain H V (1991) cDNA-expressed human cytochrome P450's: a new age of molecular toxicology and human risk assesment. *Mutation Res.* 247:113-127.

González F J y Kimura S (2001) Understanding the role of xenobiotic-metabolism in chemical carcinogenesis using gene knockout mice. *Mutation Res.* 477: 79-87.

Gordon G (1985) Ipecacuahana induced emesis in the treatment of self-poisoned adults. *Arch. Emerg. Med.*2:203-208.

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

Graf U, Frei H, Kägi A Katz A J , Würgler F E (1989) Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing test. *Mutation Res.* 222: 359-373.

Hasegawa M, Sasaki T, Sadakane K, Tabuchi M, Takeda Y, Kimura M, Fujii Y (2002) Studies for the emetic mechanisms of ipecac syrup (TJN-119) and its active components in ferrets: involment of 5-hydroxytryptamine receptors. *Jpn J Pharmacol*:89:113-119.

Ho PC, Cohen MC (1998) Rapidly reversible cardiomyopathy associated with chronic ipecac ingestion. *Clin. Cardiol.* 21:780-783.

Hodgson E y Randy R (1991) Insect cytochrome P450. En: *Molecular aspects of monooxygenases and bioactivation of toxic compounds*. Arinc, E J B Schenkman y E Hodgson (Eds), Vol. 202. Plenum Press, Nato ASI Series, p 75-91

ICPEMC (1983) Screening strategy for chemicals that are potential germ-cell mutagens in mammals. *Mutation Res.* 144:117-177.

Kastenbaum M A y Bowman K O (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Res.* 9:527-549.

Kuntzer T, Bogousslavsky J, Deruaz J P, Janzer R, Regli F (1989) Reversible emetine-induced myopathy with ECG abnormalities: a toxic myopathy. *J Neurol.*236:246-248.

Leatherman D L, Middlebrook J L (1993) Effect of emetine on T-2 toxin-induced inhibition of protein synthesis in mammalian cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266:741-748.

Lemmens R, Karkhaneh A, Studenik C, Heistracher P (1996) Cardiotoxicity of emetine dihydrochloride by calcium channel blockade in isolated preparations and ventricular myocytes of guinea-pig hearts. *Cell Biol Toxicol*,12:1-9.

Lindsley D L, Zimm G (1992) The Genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press Inc. 1133 pp.

Matsuoka T, Tabata H, Matsushita S (2001) Monocytes are differentially activated through HLA-DR, -DQ, and -DP molecules via mitogen-activated protein kinases. J. Immunol. 166:2202-2208.

Merck -Index (1989) An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 11th.Ed. Merck and Co, Inc. New Jersey EUA, 2496p.

Merschjohann K, Sporer F, Steverding D, Wink M(2001) In vitro effect of alkaloids on bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and *T. congolense*. Planta Médica 67:623-627.

Moore K L (1979) Embriologia Clinica, 2^a ed. Interamericana.México D.F.397 PP.

Nebert D (1991) Role of genetics and drug metabolism in human cancer risk. Mutation Res. 247: 267-281.

Nelson D R, Koymans L, Kamataki T, Stegeman J, Feyereisen R, Waxman D, Waterman M, Gotoh O, Coon M, Estabrook R, Gunsalus I y Nebert D (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. Pharmacogenetics 6: 1-42.

Nikolaenko VN (2001) Maintenance of homeostasis of endogenous ethanol as a method for the therapy of alcoholism Bull. Exper. Biol. med. 131:231-233.

Omura T y Sato R (1964) The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. I Evidence of its hemoprotein nature. J. Biol. Chem. 239, 2370-2378.

Pan SI, Combs AB (1995) Effects of pharmacological interventions on emetine cardiotoxicity in isolated perfused rat hearts. *Cell Immunol.*163 :296-302.

Rao KN, Bhattacharya R K, Veankatachalam S R (1999) Inhibition of thymidylate synthase by pergularinine, tylophorinidine and deoxytubulosine. *Indian J. Biochem. & Biophys.*36:442-448.

Rodríguez-Arnaiz R (2002) *Metabolismo de las toxinas ambientales*. Fondo de Cultura Económica. Serie: La ciencia para todos.

Rodríguez-Arnaiz R (2003) *Drosophila* como organismo modelo en la Biología Experimental en: *La célula*. L F Jiménez y H Merchant (Eds). Editorial Pearson Education (Addison-Wesley-Prentice Hall), pp761-791.

Rodríguez Arnaiz R, Ramos Morales P (1992) *Drosophila* como sistema para detectar agentes genotóxicos. Coordinación de Servicios Editoriales de la Facultad de Ciencias, UNAM. México, pp.7-10.

Rodríguez-Arnaiz R, Ordaz G (2002). Structure-activity relationships of several anisidine and dibenzanthracene isomers in the w/w+ somatic assay in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 514:193-200.

Rodríguez-Arnaiz R, Vogel E W, Szakmary A (1993) Strong intra-species variability in the metabolic conversion of six procarcinogens to somatic cell recombinogens in *Drosophila*. *Mutagenesis* 8:543-551.

Rosenwald I B, Pechet L, Han A , Lu L, Pihan G, Woda B, Chen J J, Szymanski (2001) Expression of translation initiation factors F-4E and F-2 alpha and a potential physiologic role of continuous protein synthesis in human platelets. *Thromb. Homeost.* 85:142-151.

Saner C, Werbel B, Würgler S E, Sengstas C (1996) Metabolism of promutagens catalized by *Drosophila melanogaster* CYP 6A2 enzyme in *Sacharomyces cerevisiae*. Environ.. Mol. Mutagen. 27:46-58.

Scharman E J, Hutzler J M, Rosencrance J G, Tracy T S (2000) Single dose pharmacokinetics of syrup of ipecac. Ther. Drug Monit. 22:566-573.

Schenkel E, Dubois J G, Helson-Cambier M, Hanocq M (1996) Cytotoxicity of polyamines to *Amoeba proteus*: role of polyamine oxidase. Cell Biol Toxicol 12:1-9.

Schweighoffer T, Schweighoffer E, Sviresheva M, Apati A, Balofh A, Csuka I, Luat N, Banfalvi G (1993) Oncogene expression in thymocytes after emetine treatment of mice. Cell Mol. Biol. Res. 39:647-656.

Sengupta M, Sengupta O (1995) Correlation of biological activity (therapeutic and toxic) with solvochromic properties of metronidazole, emetine hydrochloride and diloxanide furoate. Indian J. Biochem. Biophys. 32:302-307.

Tijet N, Helvig Ch, Feyereisen R (2000) The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: Annotation, intro-exon organization and phylogeny. Gene 262:189-198.

Vogel E W (1990) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila*. The w/w+ eye mosaic test . Sylvius Lab., Netherlands 21pp.

Vogel E W (1992) Test for recombinogens in somatic cells of *Drosophila*. Mutation Res. 284:159-175

Vogel E, Sobels F (1976) The function of *Drosophila* in genetic toxicology testing. En: Chemicals mutagens principles and methods for their detection, A Hollander Ed. Plenum Press, New York, vol 4, pp 93-142.

Vogel E W y Nivard M J (1993) Performance of 181 chemicals in a *Drosophila* assay predominantly monitoring interchromosomal mitotic recombination. *Mutagenesis*, 8:57-81

Vogel W E, Nivard J M (1999) A novel method for the parallel monitoring of mitotic recombination and clastogenicity in somatic cells *in vivo*. *Mutation Res.* 431:141-153.

Vogel E, Nivard W y Zijlstra J A (1991) Variation in spontaneous and induced mitotic recombination in different *Drosophila* populations: a pilot study on the effects of poliaromatic hydrocarbons in six newly constructed tester strains. *Mutation Res.* 250:291-298.

Vogel W E y Szakmary A (1990) Basic principles and evaluation of results at assays measuring genotoxic damage in somatics cells of *Drosophila* En: *Mutation and Environment*. Parç B. Willey-Liss. Pp 149-158.

Wagner C A, Lakeville U, Kaltenbach S, Moschens A, Broer A, Risler T, Broer S, Lang F (2000) Functional and pharmacological characterization of human Na(+)-carnitine cotransporter hOCTN2. *Am. Physiol. Renal.* 279:584-91.

Wilson G T (2001) Resistance of *Drosophila* to toxins. *Annu, Rev, Entomol* 46:545-571.

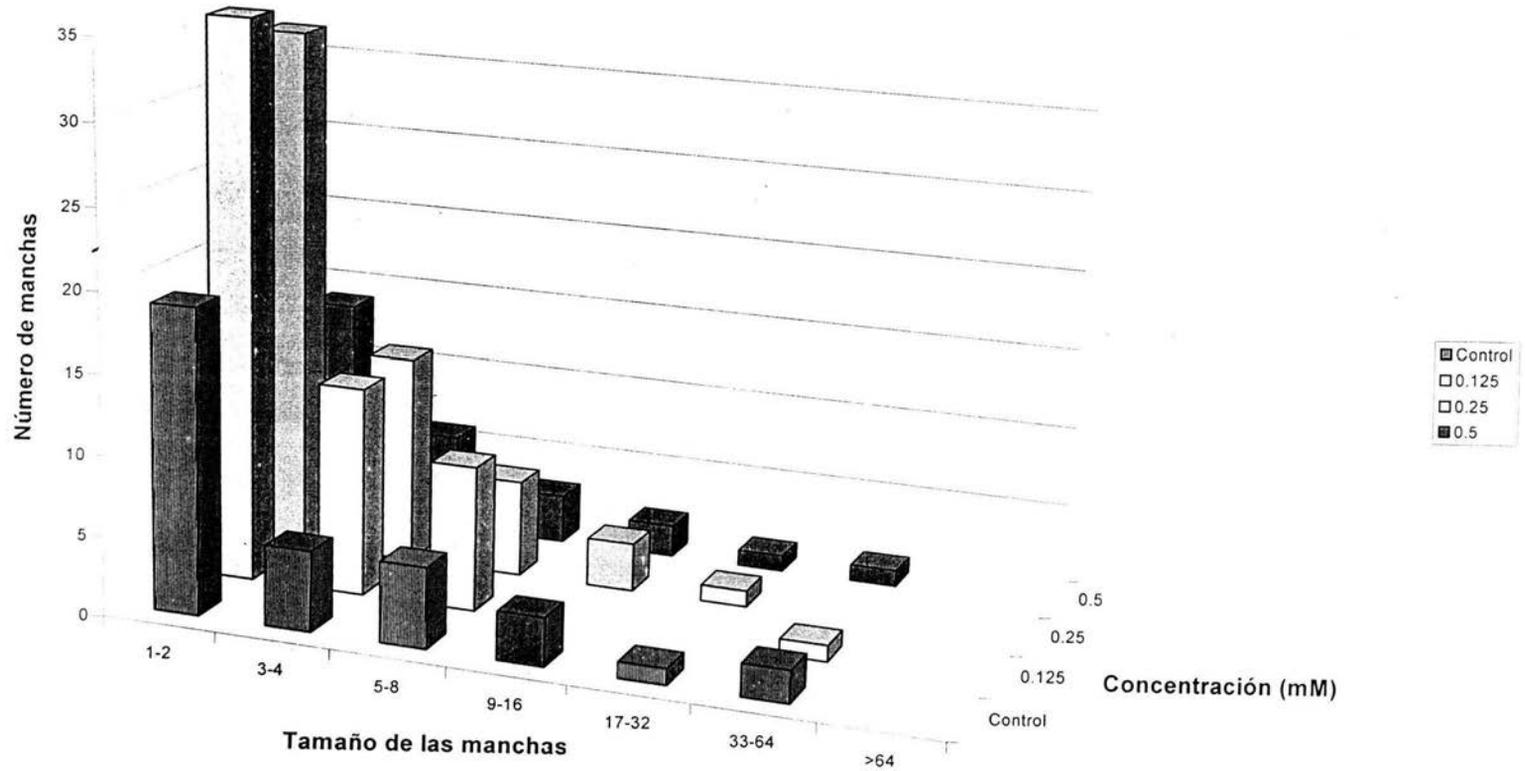
Würgler F E, Vogel E W (1986) *In vivo* mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*. En: *Chemical mutagens: principles and methods for their detection*, volume 10, J. de Serres (Ed).Plenum Press. New York, pp 1-72.

Zimmering S (1976) *Selected methodologies for mutagenic testing in Drosophila melanogaster*. Brown University, Providence USA, p 1-26.

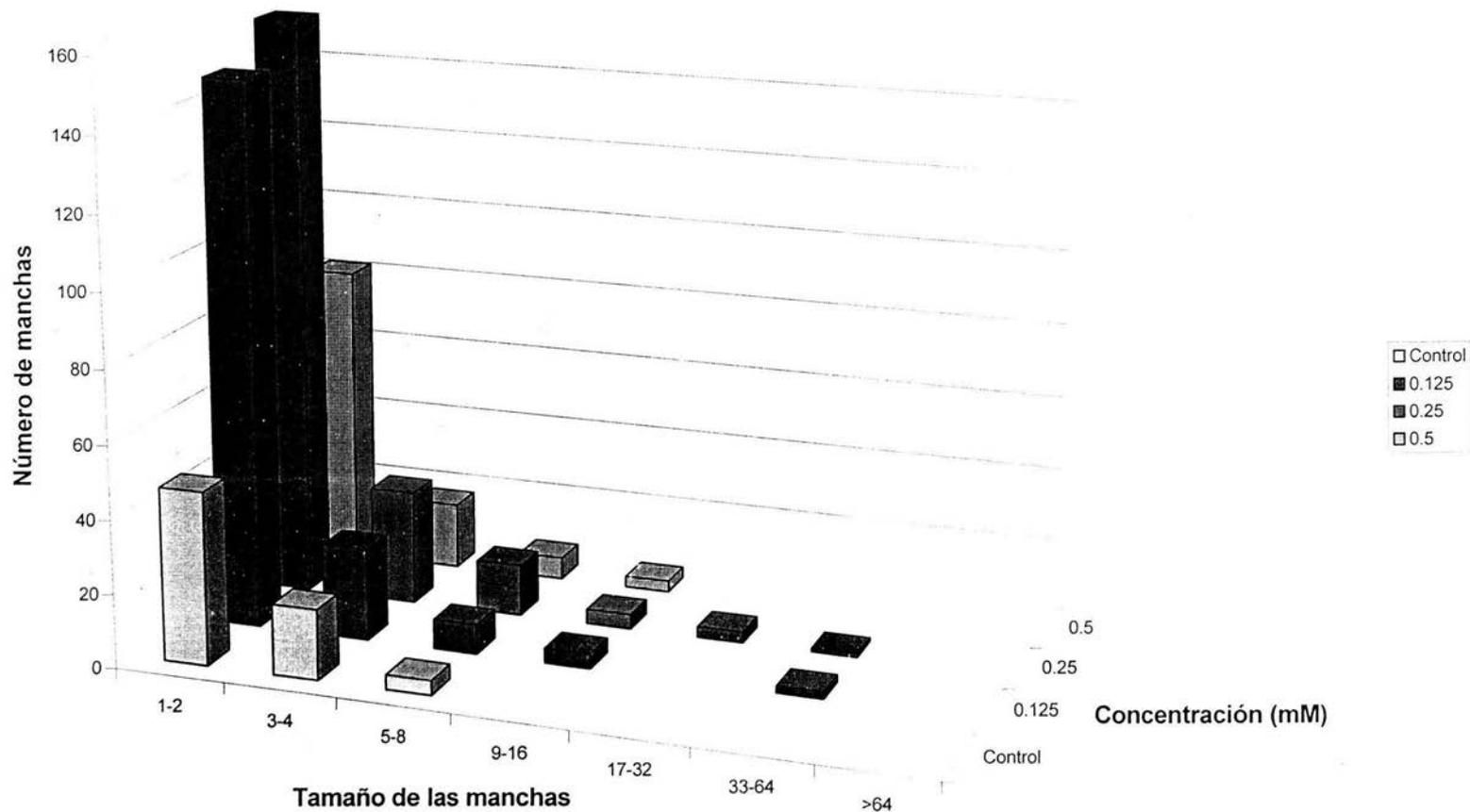
Tabla 1. Distribución de manchas chicas (1-2 omatidias), grandes(>2 omatidias) y totales, tamaño promedio del clon y clones por 10^4 células inducidos por emetina en el ensayo w/w+ de *Drosophila melanogaster*. Cruza 1. Genotipos IS(ST) e IR(HG-R)

Geno- tipo	Concentra- ción (mM)	N° de Ojos	Distribución de las manchas (tamaño)							TOTAL	Manchas por 100 ojos			Tamaño promedio del clón	Clones por 10^4 células	Acti- vidad
			1-2	3-4	5-8	9-16	17-32	33-64	>64		Chicas 1-2	Grandes >2	TOTAL			
ST	testigo	558	19	5	5	3	1	2	35	3.4	2.9	6.3	6.97	10.92		
ST	0.125	500	35	13	9			1	58	7	4.6	11.6	3.56	10.32	-	
ST	0.25	500	33	13	6	3	1		56	6.6	4.6	11.2	3.44	9.63	-	
ST	0.5	424	14	6	3	2	1	1	27	3.3	3.1	6.4	6.3	10.02	-	
HG	testigo	526	47	19	4				70	8.9	4.4	13.3	2.63	8.75		
HG	0.125	504	148	25	8	4		2	187	29.4	7.7	37.1	3.14	29.12	+++	
HG	0.25	716	158	31	14	4	3	1	211	22.1	7.4	29.5	3.22	23.72	+++	
HG	0.5	492	82	18	6	3			109	16.7	5.5	22.2	2.75	15.13	-	

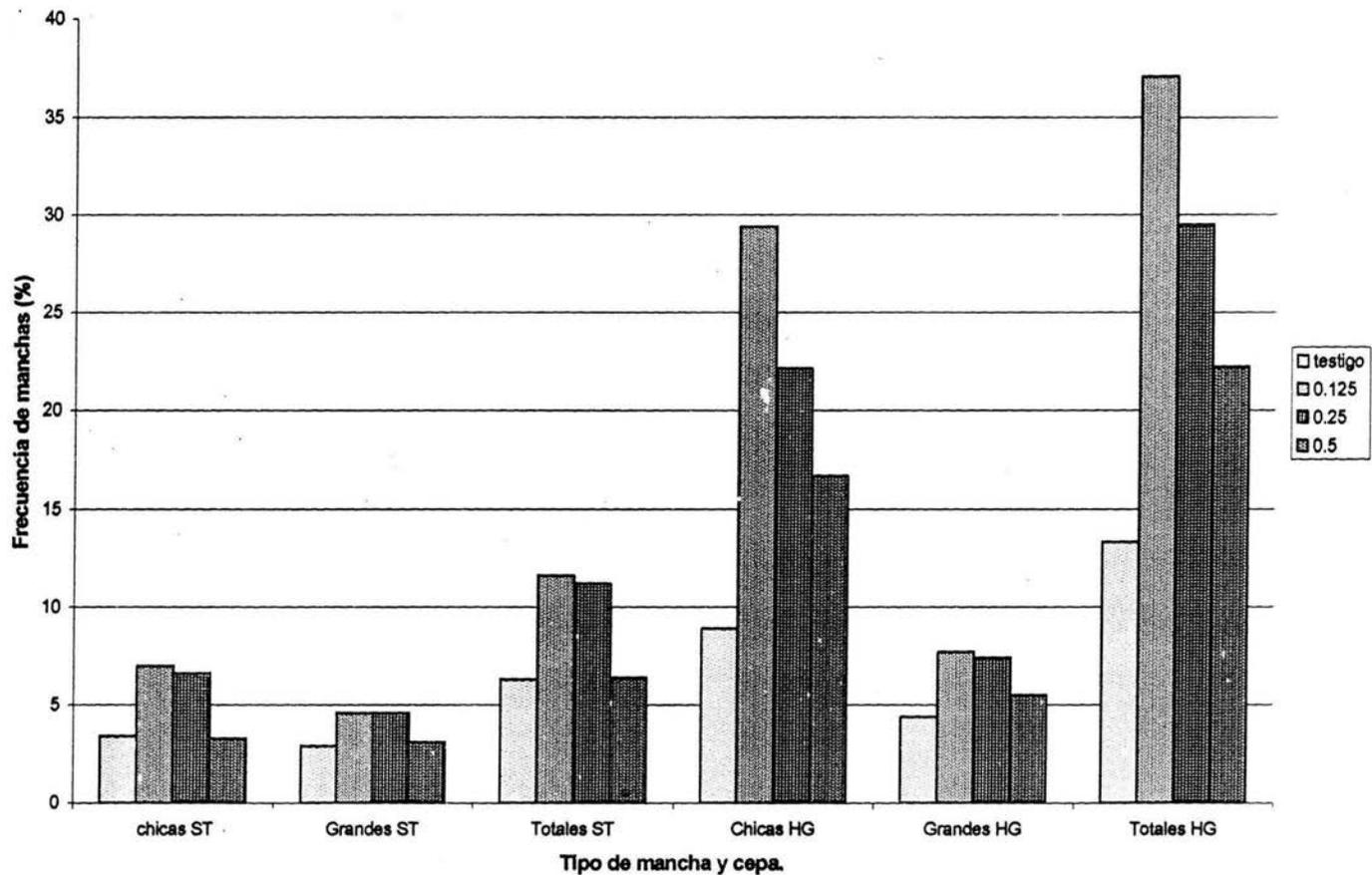
Gráfica 1. Distribución del tamaño de manchas inducida por emetina en el ensayo w/w+ en *Drosophila melanogaster*. Cruza 1. Cepa ST.



Gráfica 2. Distribución del tamaño de manchas inducida por la emetina en el ensayo w/w+ en *Drosophila melanogaster*. Cruza 1. Cepa HG.



Gráfica 3. Manchas chicas, grandes y totales/100 ojos, inducidas por la emetina en el ensayo somático w/w+ de *Drosophila melanogaster*. Cruza 1.



Gráfica 4. Frecuencia inducida de manchas totales por emetina en el ensayo w/w+ en *Drosophila melanogaster*. Cruza 1. Cepas ST y HG.

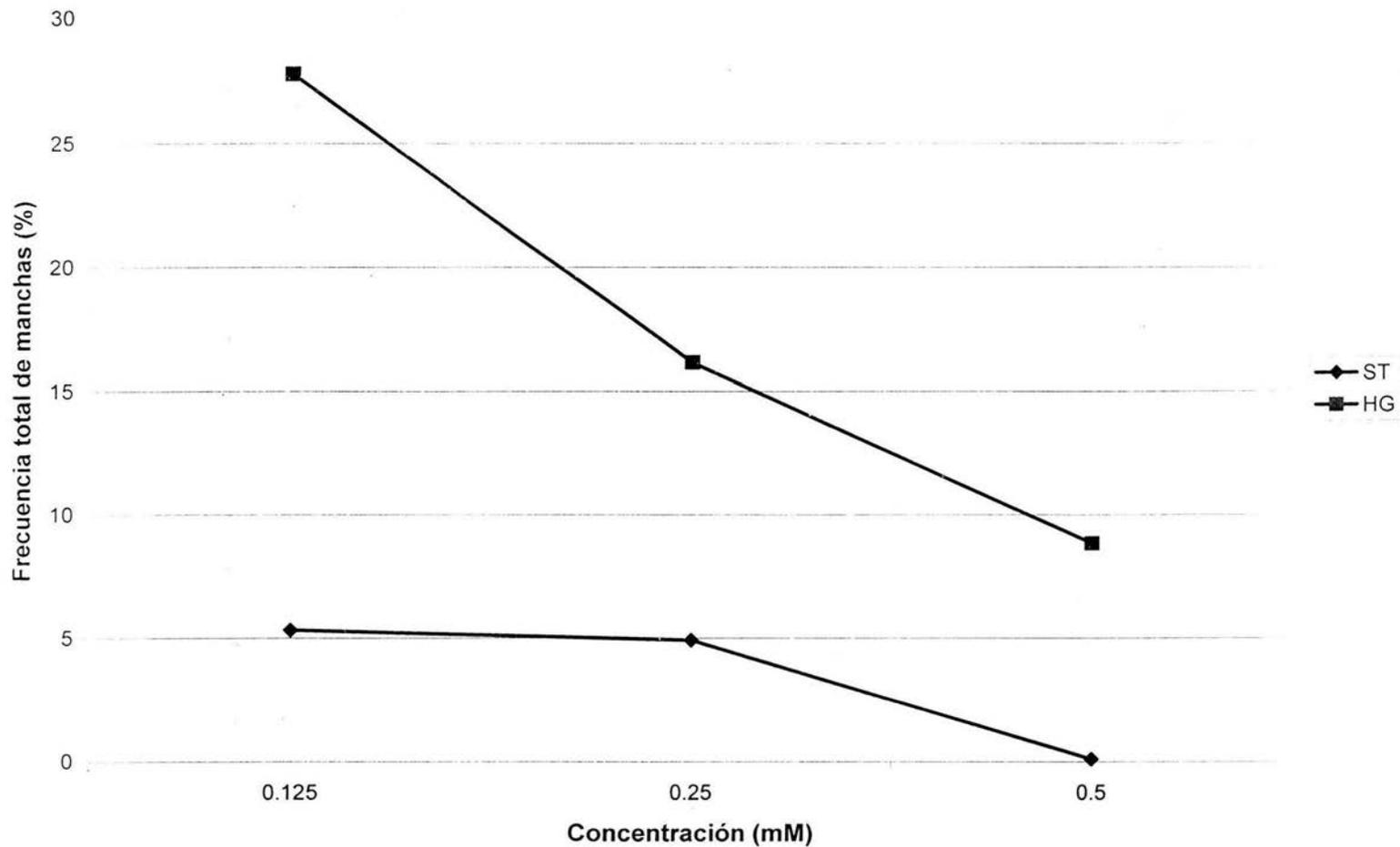
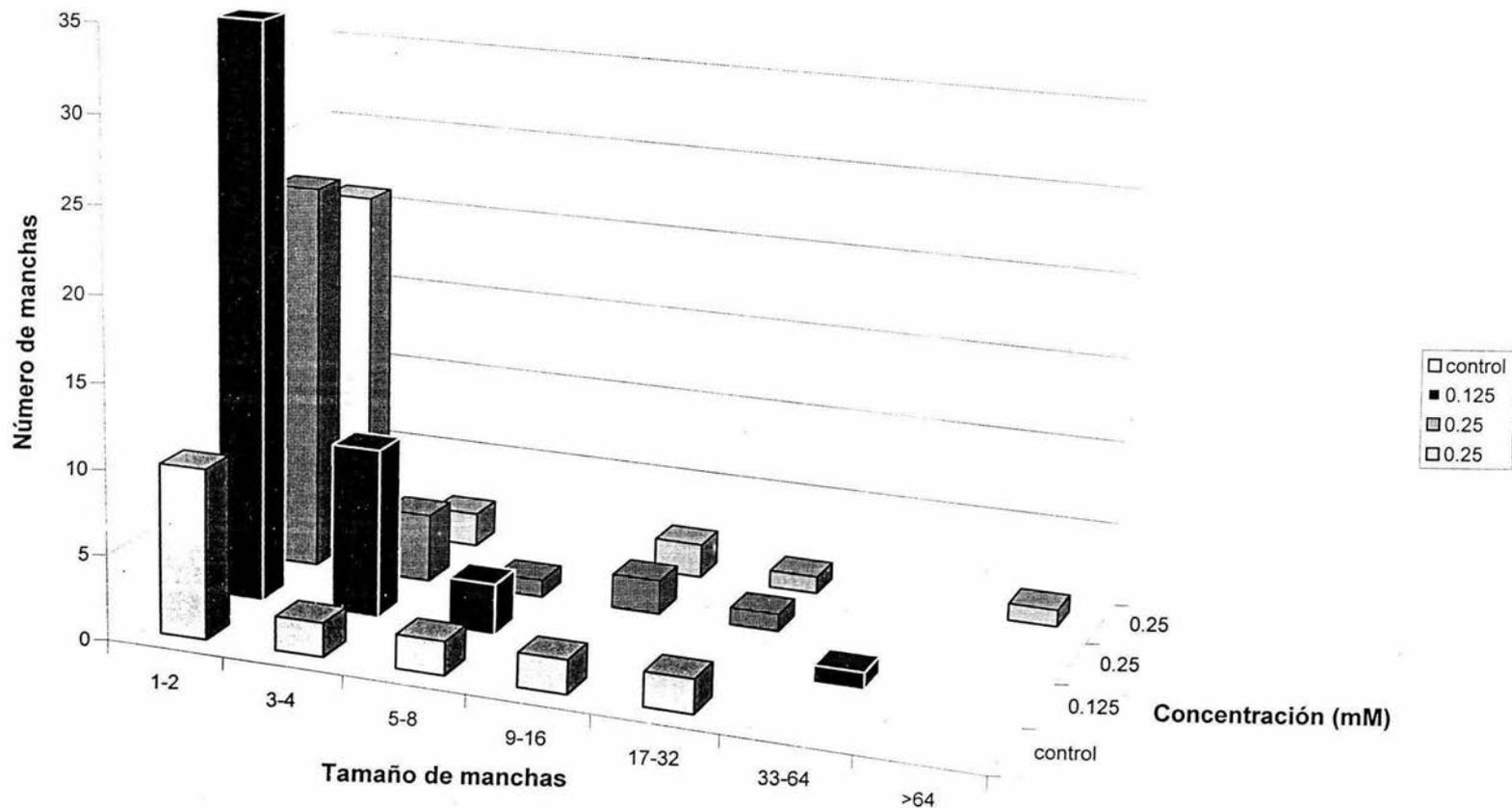


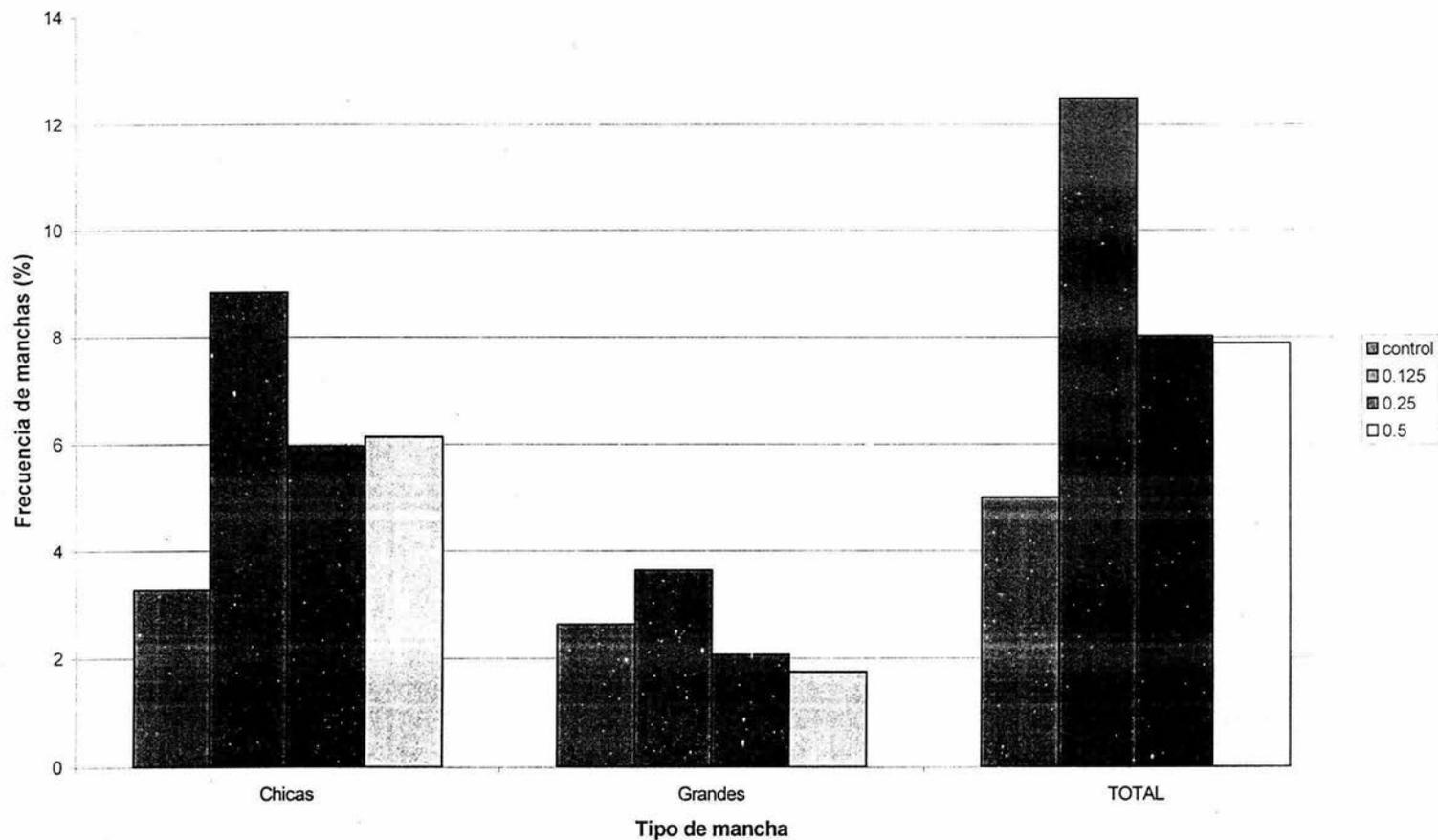
Tabla 2. Distribución de manchas en los genotipos portadores de Xs lineal (ST+) y de Xs en anillo

Genotipo/ Concentración (mM)	Nº de ojos	Distribución de manchas							TOTAL	Manchas por 100 ojos			Tamaño promedio del clón	Clones por 10 ⁴ células	Actividad	
		1-2	3-4	5-8	9-16	17-32	33-64	>64		Chicas 1-2	Grandes >2	TOTAL				
♀♀ ++ XX																
Testigo	306	10	2	2	2	2		18	3.27	2.63	5	5.55	8.16			
0.125	384	34	10	3			1	48	8.85	3.64	12.49	3.43	10.71	+		
0.25	386	23	4	1	2	1		31	5.96	2.07	8.03	3.29	6.6	-		
0.5	342	21	2		2	1		27	6.14	1.75	7.89	5.85	11.54	-		
♀♀ yf rXX																
Testigo	180	27	5	1				33	15	3.33	18.33	2.36	10.81			
0.125	356	99	6			1		106	27.81	1.97	29.78	2.24	16.67	+		
0.25	134	141	8	1			1	39	27.94	0.75	28.69	1.18	8.59	-		
0.5	310	89	7	1			1	98	28.71	2.9	31.61	2.65	20.94	+		
♂♂ ++ XY																
Testigo	406	17	4	1				22	4.19	1.23	5.42	2.45	3.31			
0.125	408	31	3	2				36	7.6	1.22	8.82	2.1	4.63	-		
0.25	396	21	5	4		1		31	5.3	2.52	7.82	3.16	6.18	-		
0.5	310	15	2	2	1			20	4.84	1.61	6.45	2.7	4.35	-		
♂♂ yf rXY																
Testigo	106	7		1				8	6.6	0.94	7.54	2.5	4.71			
0.125	326	85	9	4	1			99	26.07	4.29	30	2.35	17.84	+		
0.25	142	113	11	5	1			18	11.97	0.7	12.67	2.11	6.87	-		
0.5	292	36	4			1		41	12.33	1.71	14.04	2.58	9.05	+		

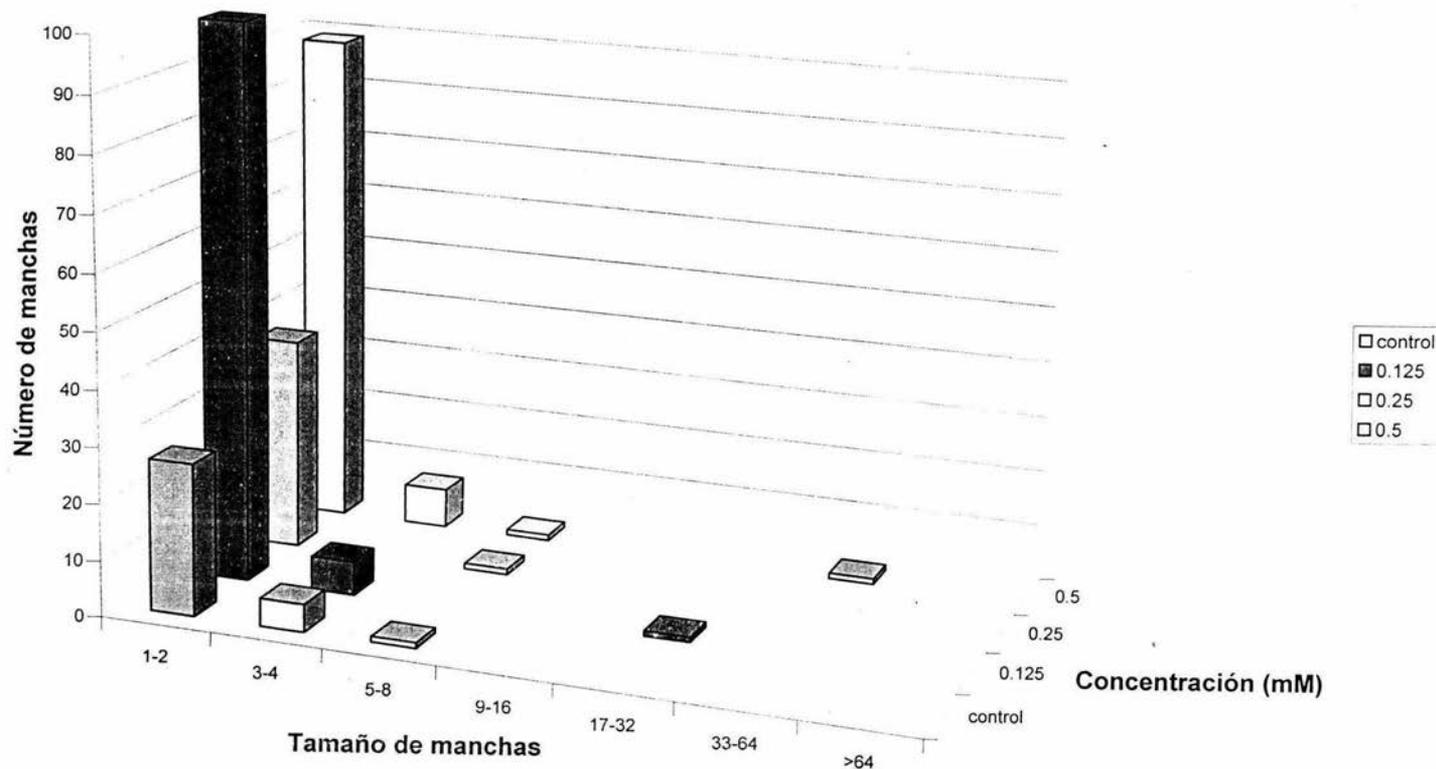
Gráfica 5. Distribución de manchas por tamaño inducida por emetina en el ensayo w/w+ en *Drosophila melanogaster*. Cruza 2 ST. Hembras ++ XX.



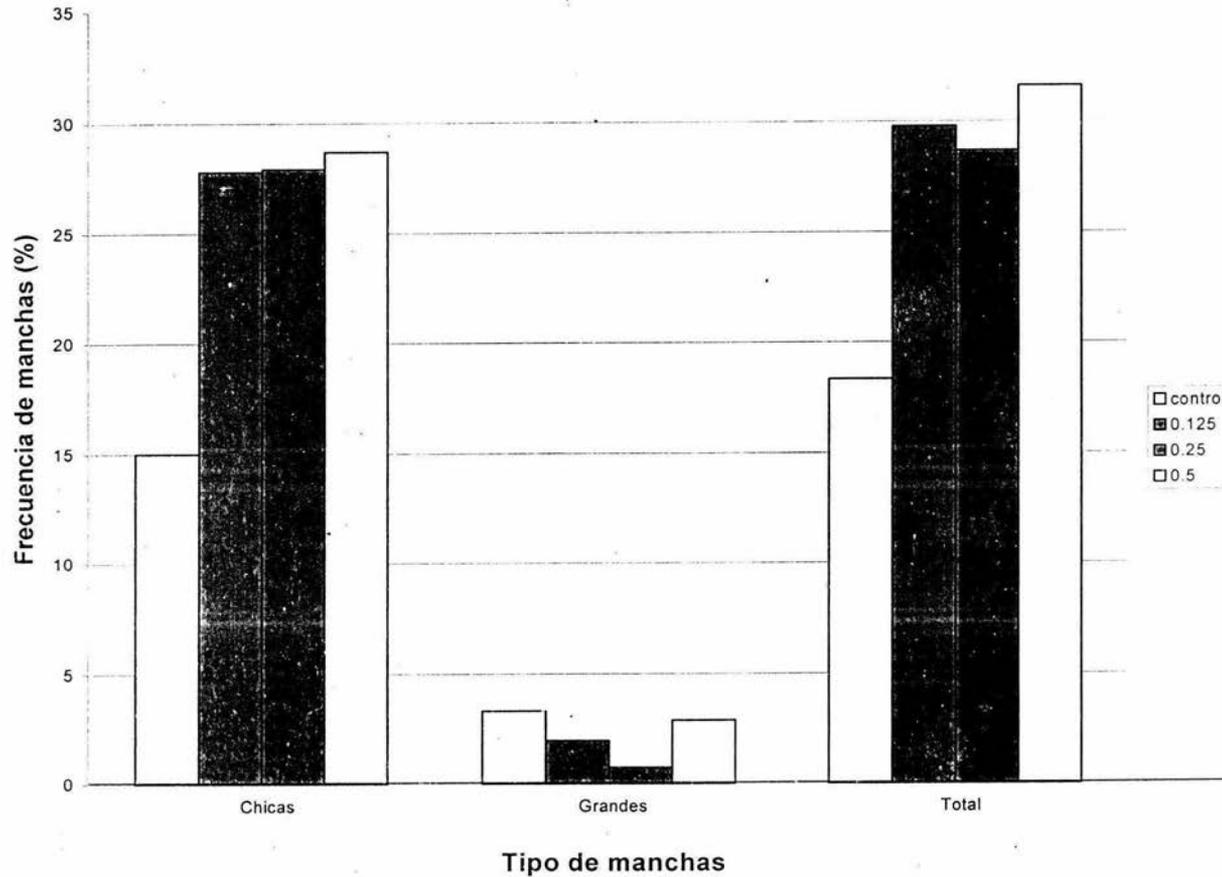
Gráfica 6. Manchas chicas, grandes y totales/100 ojos, inducidas por la emetina en el ensayo somático w/w+ de *Drosophila melanogaster*. Cruza 2 ST. Hembras ++ XX.



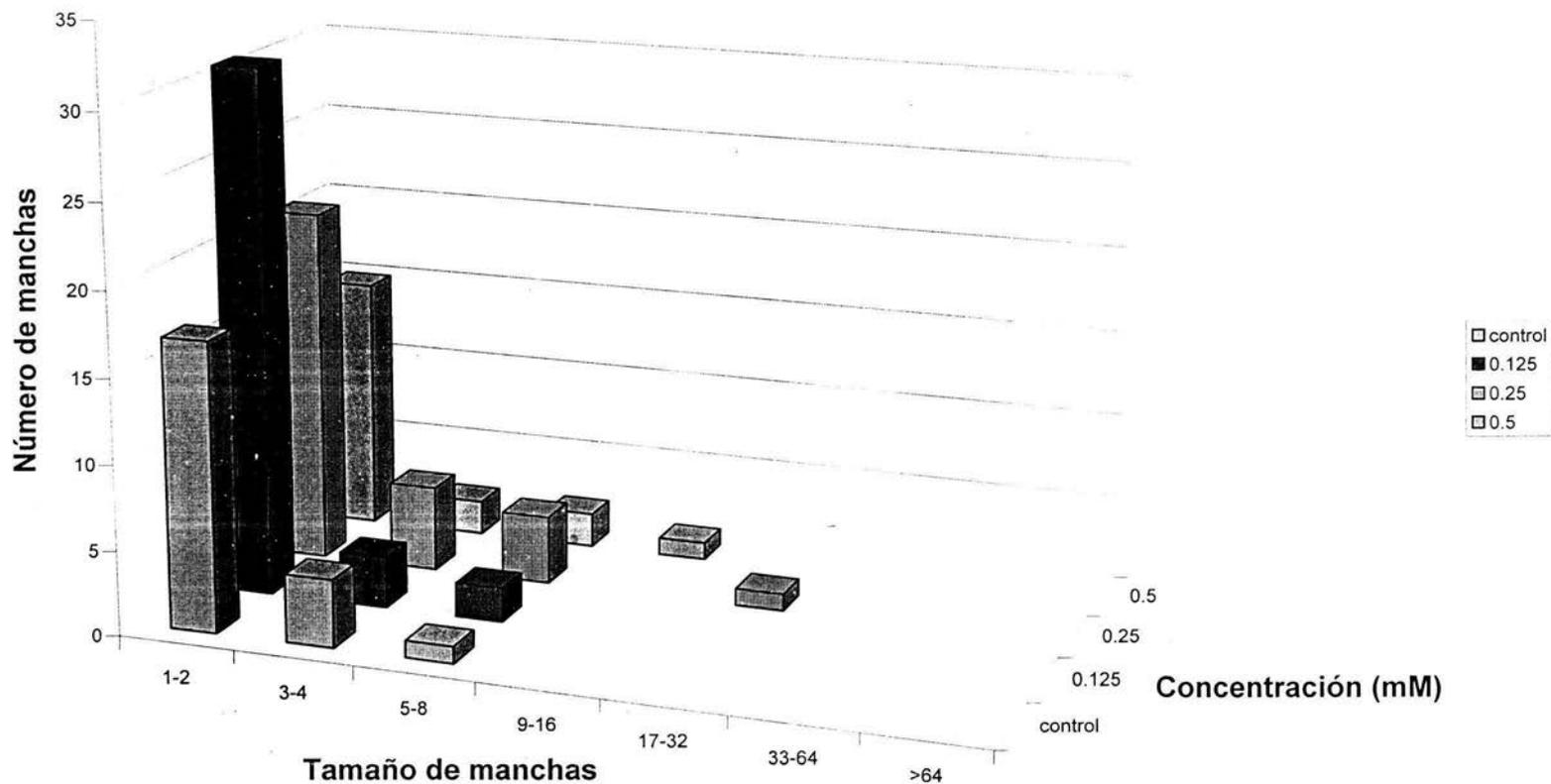
Gráfica 7. Distribución del tamaño de manchas inducida por la emetina en el ensayo w/w+ en *Drosophila melanogaster*. Cruza 2 ST. Hembras yf rXX



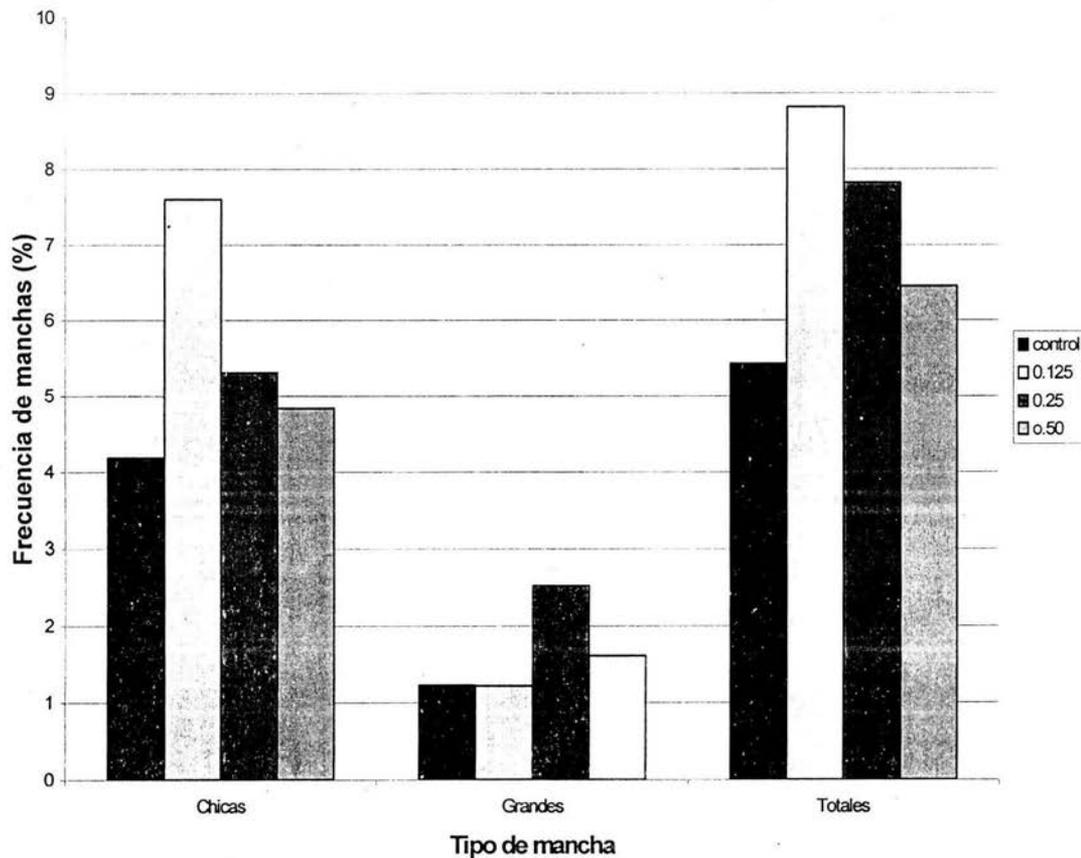
Gráfica 8. Manchas chicas, grandes y totales/100 ojos, inducidas por la emetina en el ensayo somático w/w+ de *Drosophila melanogaster*. Cruza 2 ST. Hembras yf rXX.



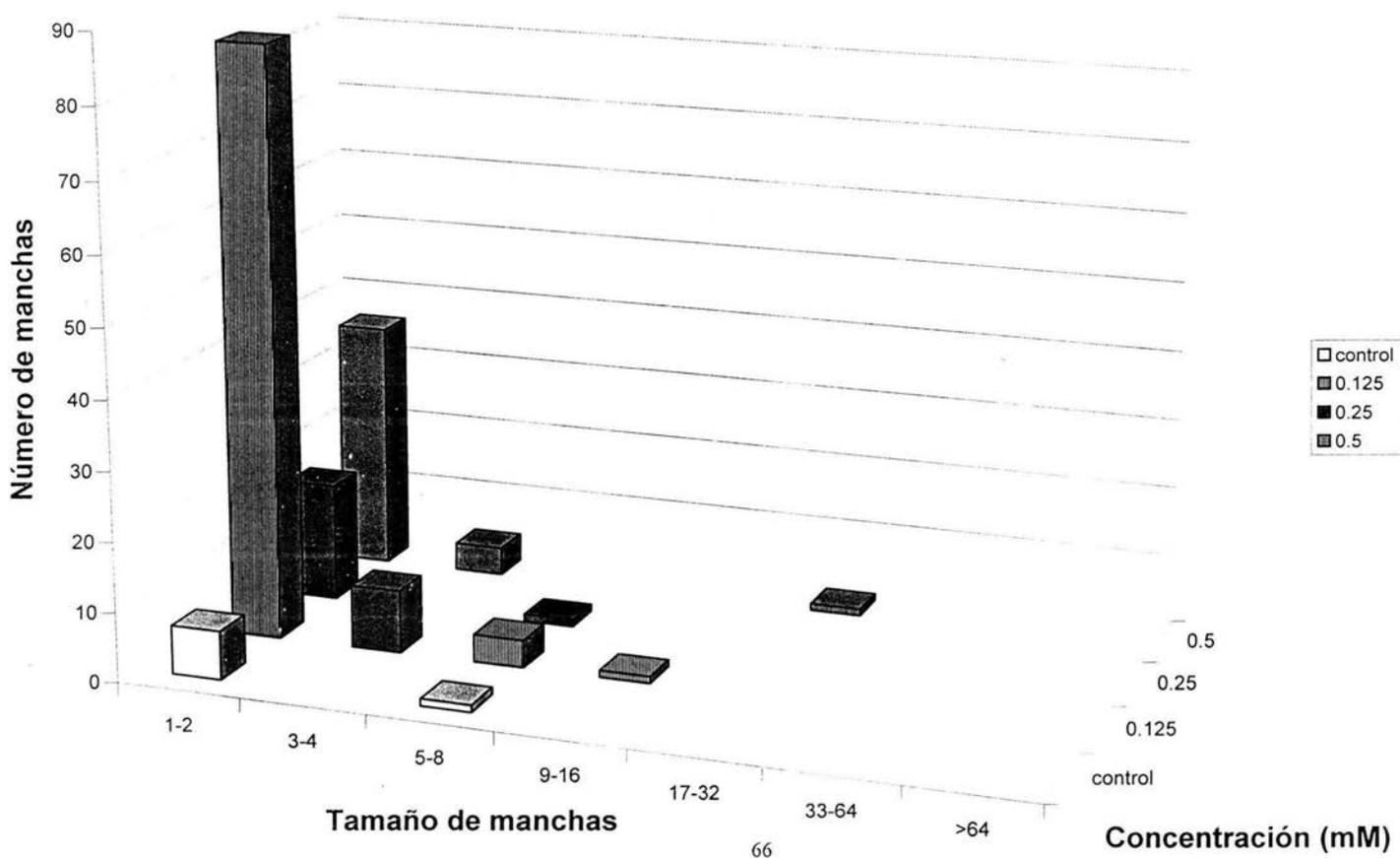
Gráfica 9. Distribución de manchas por tamaño inducida por emetina en el ensayo w/w+ en *Drosophila melanogaster*. Cruza 2 ST. Machos ++ XY.



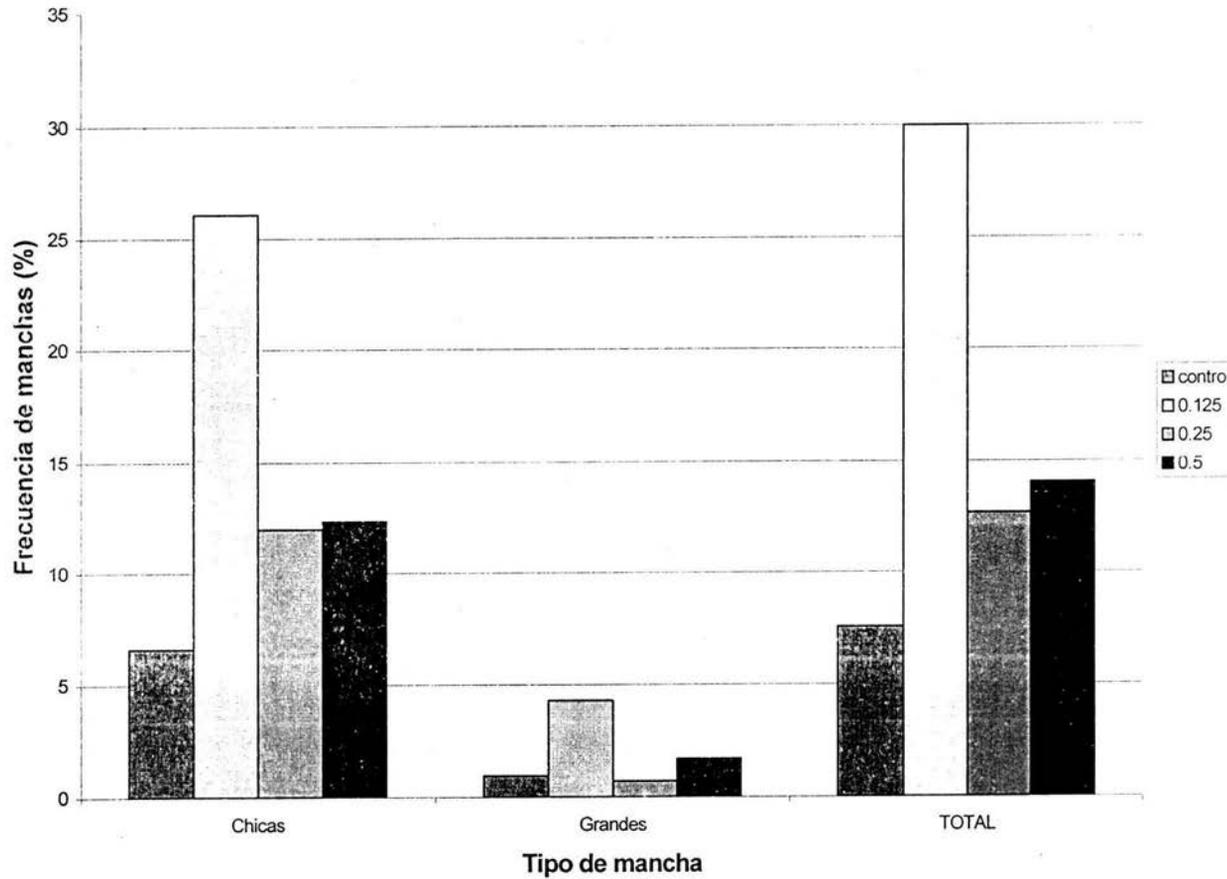
Gráfica 10. Manchas chicas, grandes y totales/100 ojos, inducidas por la emetina en el ensayo somático $w/w+$ de *Drosophila melanogaster*. Cruza 2 ST. Machos ++ XY.



Gráfica 11. Distribución del tamaño de manchas inducida por la emetina en el ensayo w/w+ en *Drosophila melanogaster*. Cruza 2 ST. Machos yf rXY.



Gráfica 12. Manchas chicas, grandes y totales/100 ojos, inducidas por la emetina en el ensayo somático w/w+ de *Drosophila melanogaster*. Cruza 2 ST. Machos yf rXY.



Gráfica 13. Frecuencia inducida de manchas totales por la emetina en el ensayo w/w+ de *Drosophila melanogaster*. Cruza 2 ST.

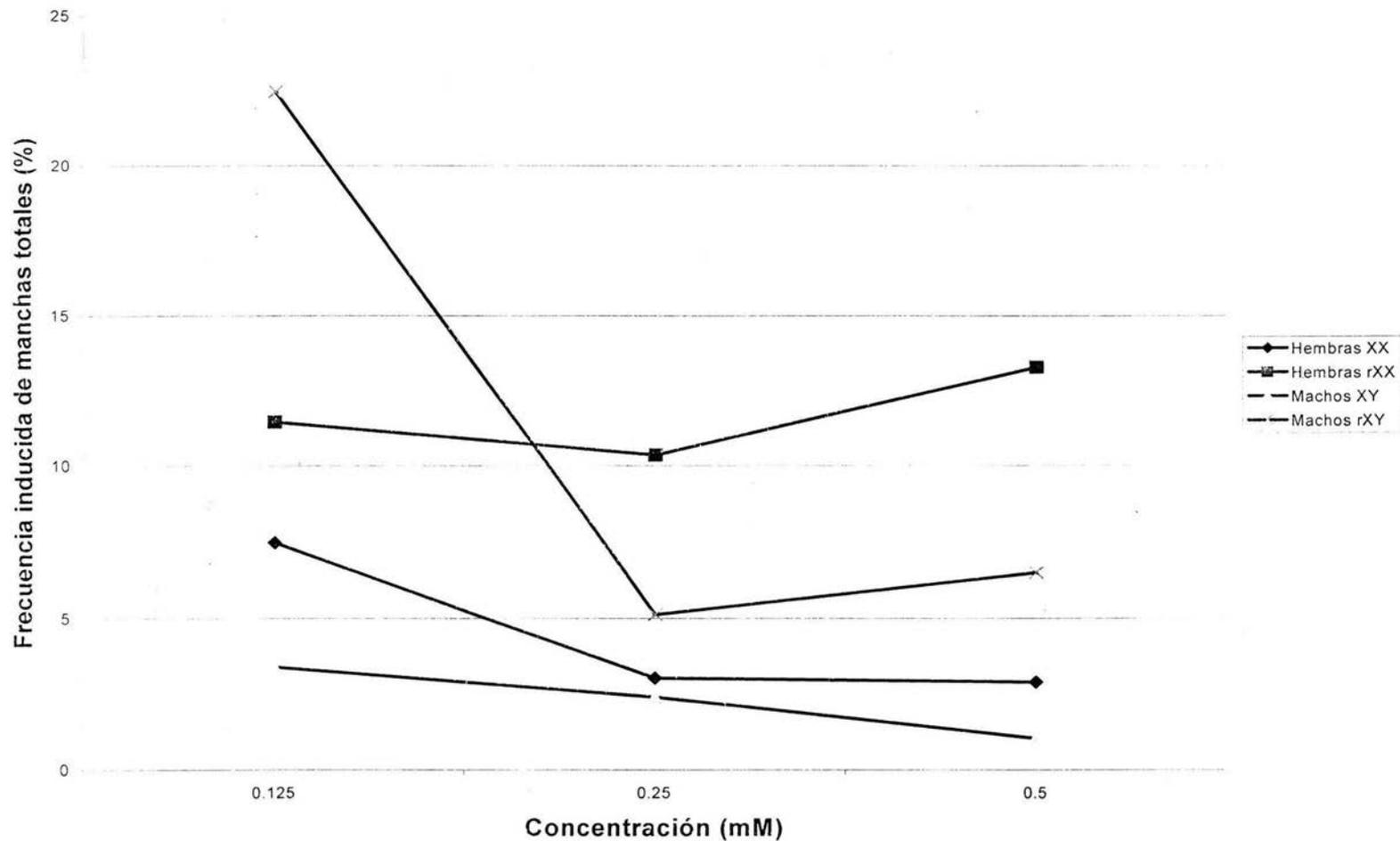
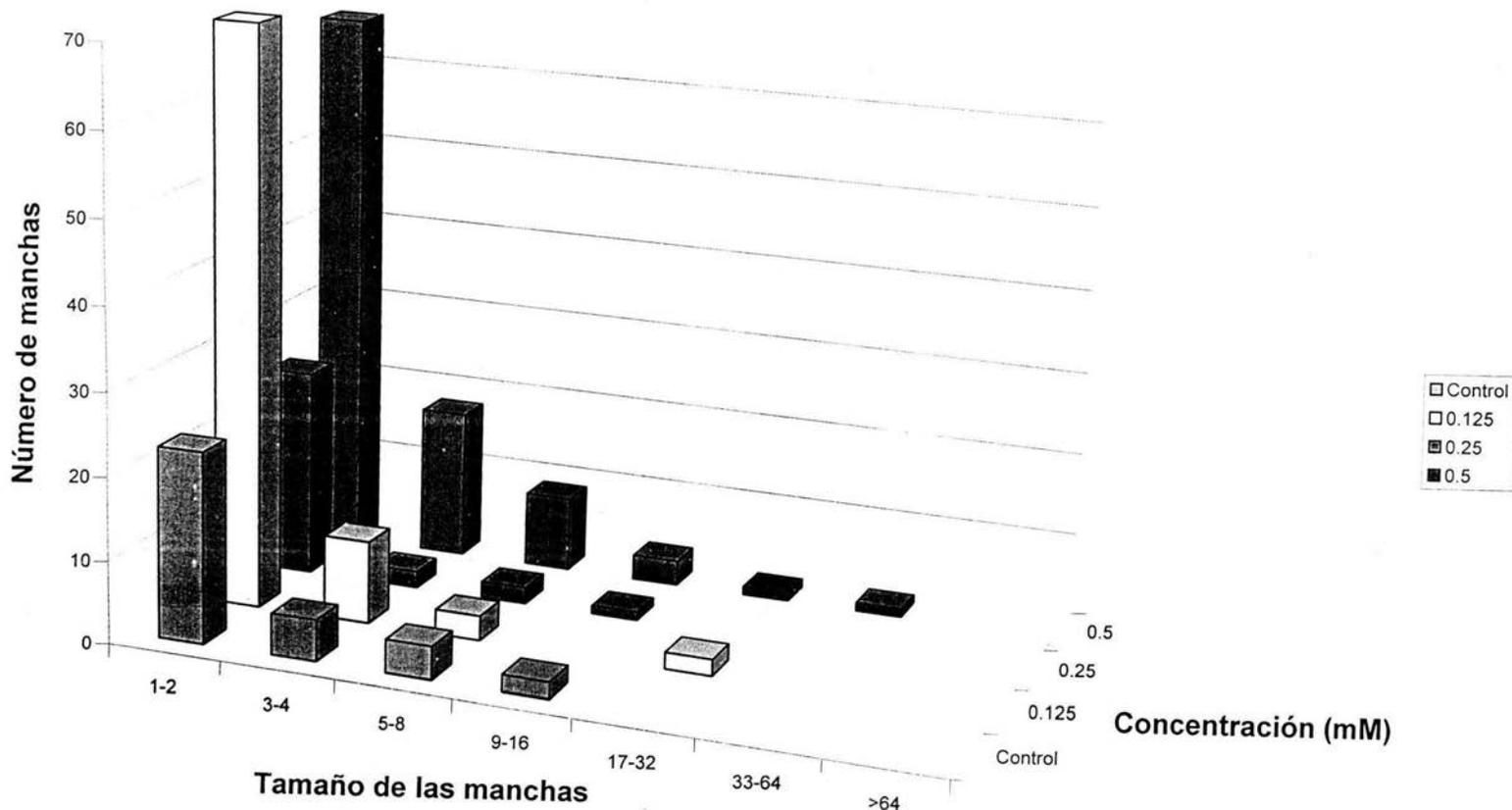


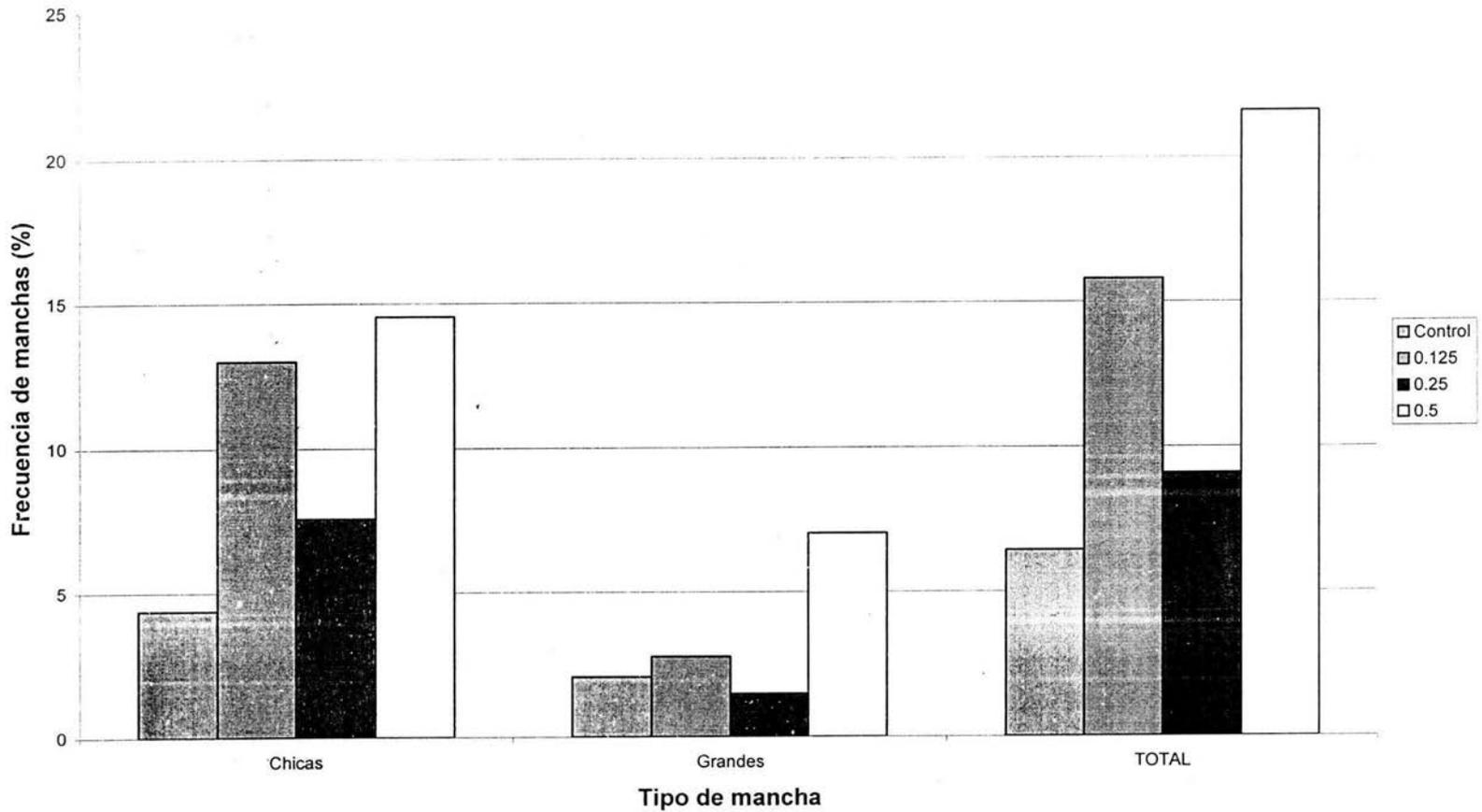
Tabla 3. Distribución de manchas en los genotipos portadores de Xs lineal (HG+) y de Xs en anillo

Genotipo/ Concentración (mM)	No de ojos	Distribución de manchas						TOTAL	Manchas por 100 ojos			Tamaño promedio del clón	Clones por 10 ⁴ células	Actividad	
		1-2	3-4	5-8	9-16	17-32	33-64		Chicas 1-2	Grand es >2	TOTAL				
♀♀ ++ XX															
Testigo	526	23	5	4	2			34	4.37	2.09	6.46	3.2	5.17		
0.125	538	70	10	3		2		85	13	2.79	15.8	2.67	10.5	+	
0.25	330	25	2	2	1			30	7.58	1.51	9.09	2.8	6.36	-	
0.5	454	66	18	9	3	1	1	98	14.5	7.05	21.6	3.53	19.1	+	
♀♀ yf rXX															
Testigo	242	26	3					29	10.7	1.24	12	2.06	6.17		
0.125	214	25	4		1	1		31	11.7	2.8	14.5	3.25	11.8	-	
0.25	254	15	2	1				18	5.9	1.19	7.09	2.7	4.78	-	
0.5	272	23	1		1			25	8.46	0.73	9.19	2.44	5.6	-	
♂♂ ++ XY															
Testigo	434	28	6	3				37	6.45	2.07	8.52	2.37	5.05		
0.125	462	49	5	1				55	10.6	1.3	11.9	1.9	5.65	-	
0.25	292	38	5	1			1	45	13	2.4	15.4	2.8	10.8	-	
0.5	462	40	3	2				45	9.26	1.16	9.74	2.06	5.01	-	
♂♂ yf rXY															
Testigo	238	22	4					26	9.24	1.68	10.9	2.11	5.76		
0.125	186	28	4	2				34	15	3.22	18.3	2.44	11.2	-	
0.25	274	33	11	1				45	12	4.38	16.4	2.37	9.37	-	
0.5	246	14	1	1				15	5.69	0.41	6.1	1.73	2.63	-	

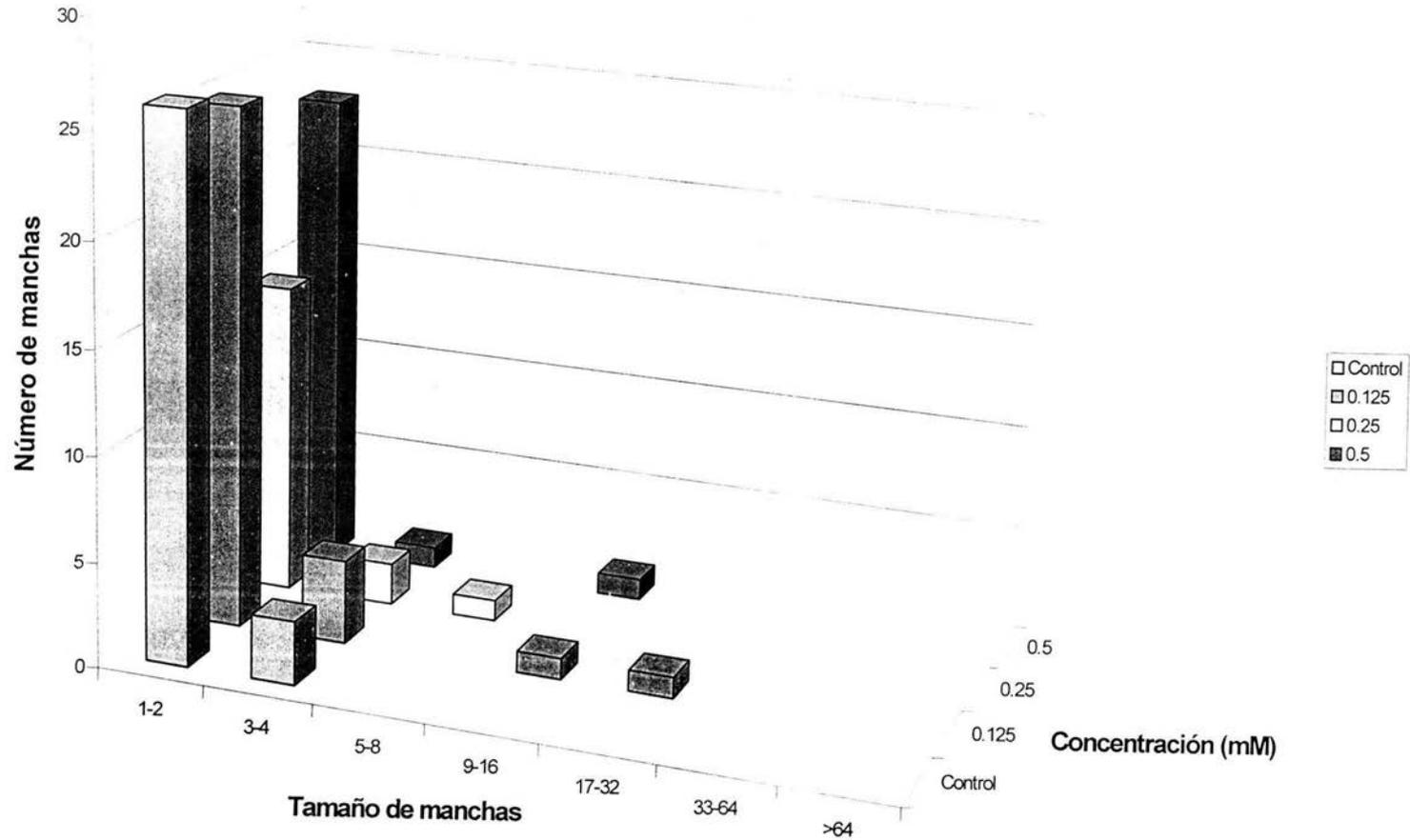
Gráfica 14. Distribución de manchas por tamaño inducida por emetina en el ensayo w/w+ en *Drosophila melanogaster*. Cruza 2 HG. Hembras ++ XX.



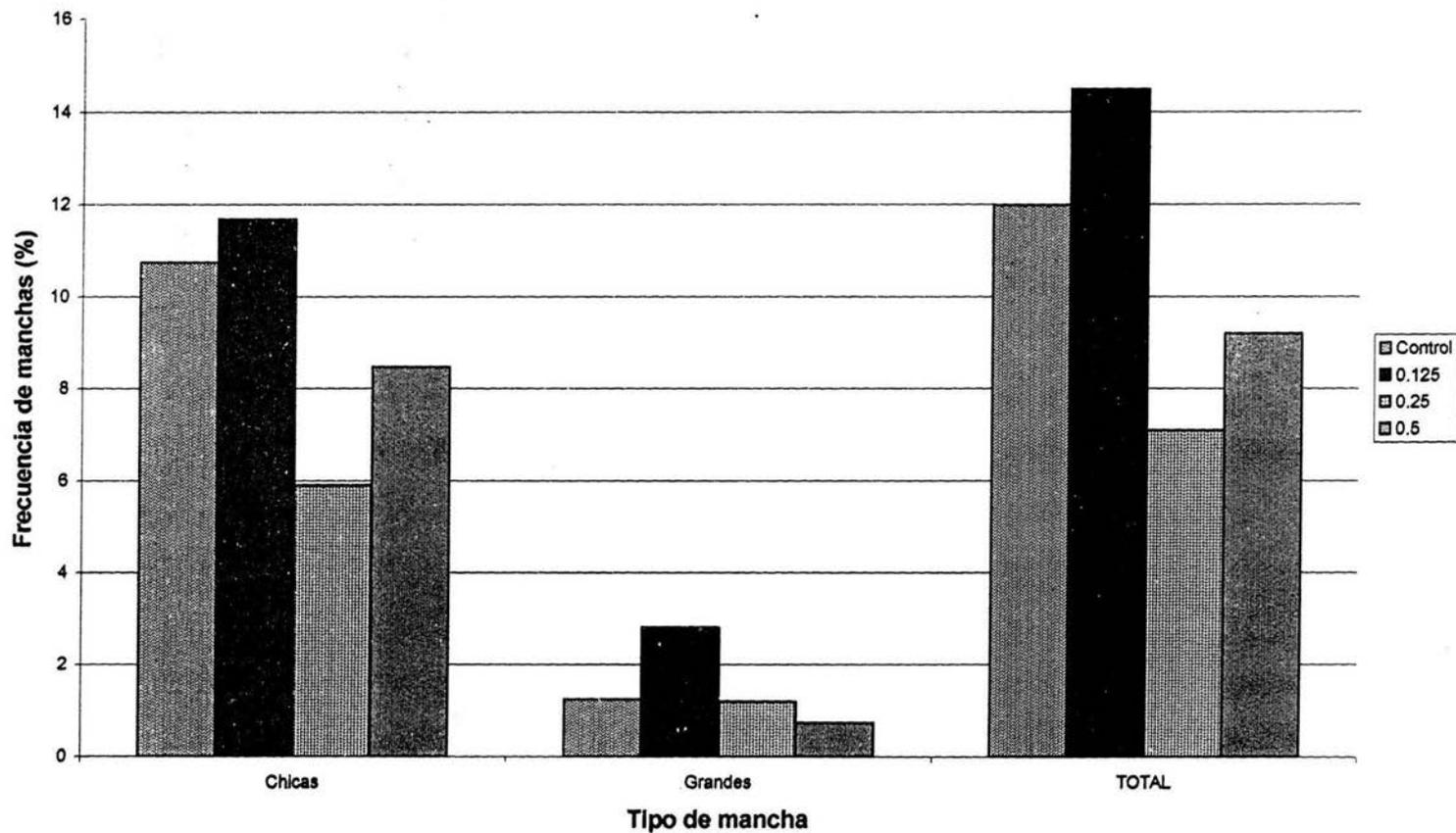
Gráfica 15. Manchas chicas, grandes y totales/100 ojos, inducidas por la emetina en el ensayo somático w/w+ de *Drosophila melanogaster*. Cruza 2 HG. Hembras ++ XX.



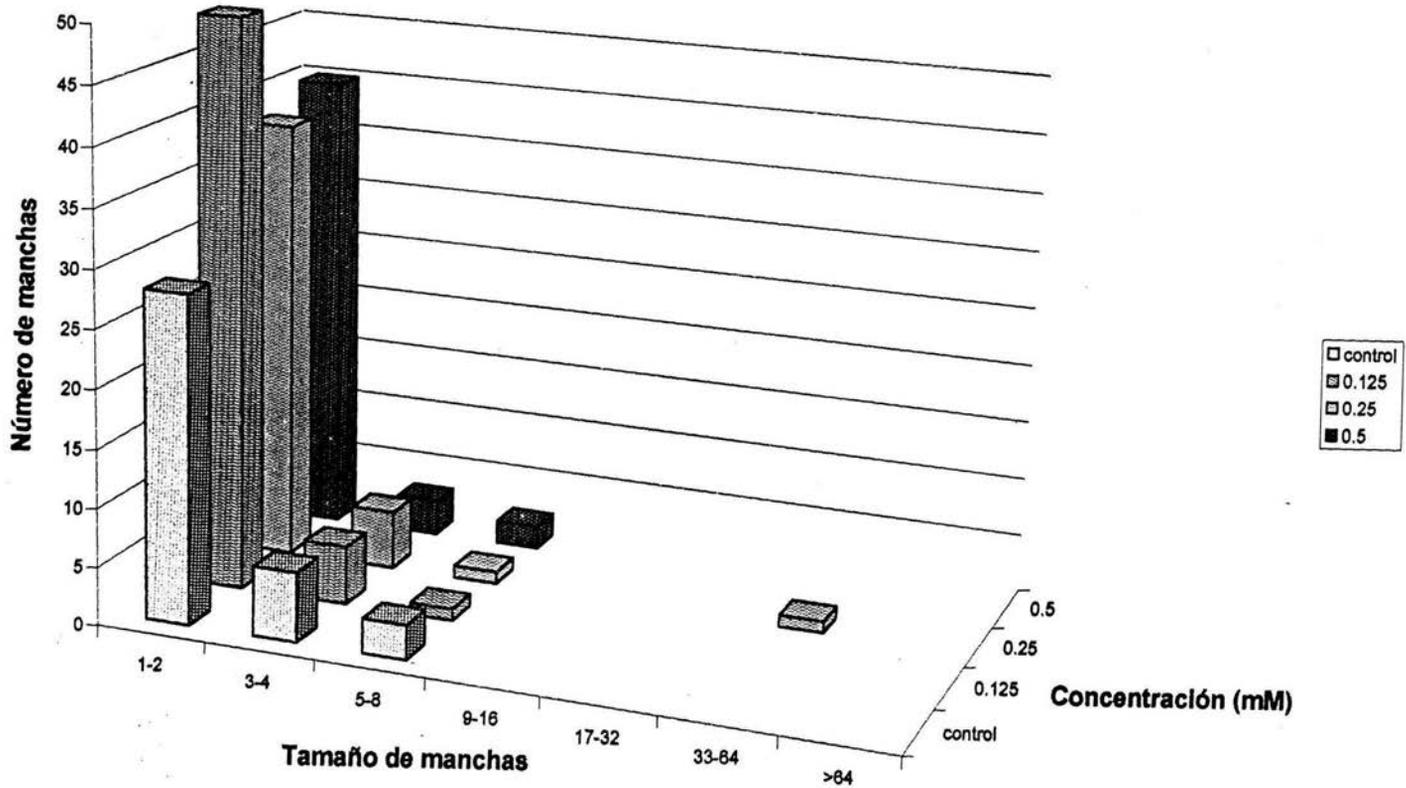
Gráfica 16. Distribución del tamaño de manchas inducida por emetina en el ensayo *w/w+* de *Drosophila melanogaster*. Cruza 2 HG. Hembras yf rXX.



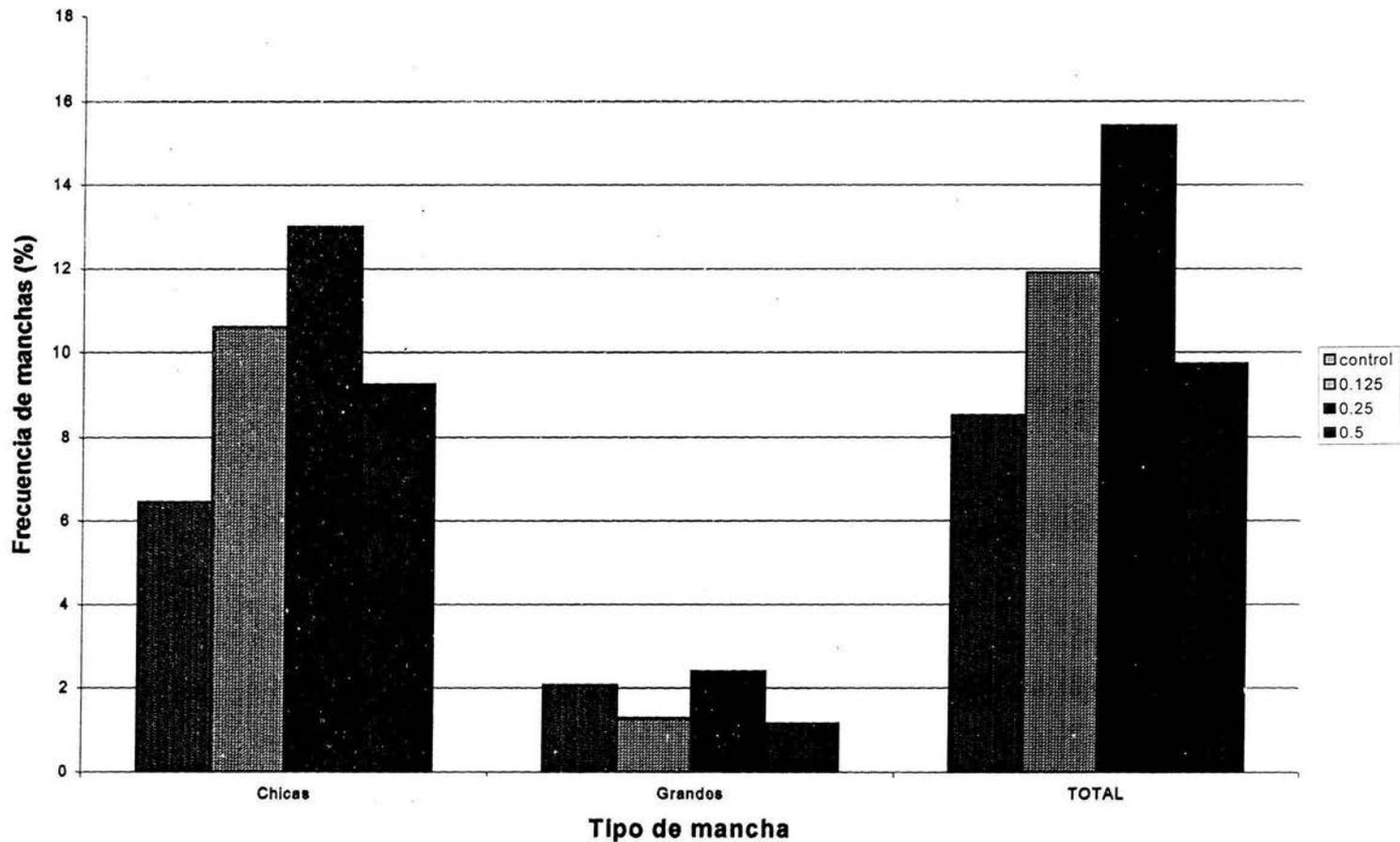
Gráfica 17. Manchas chicas, grandes, grandes y totales/100 ojos, inducidas por la emetina en el ensayo somático w/w+ de *Drosophila melanogaster*. Cruza 2 HG. Hembras yf rXX



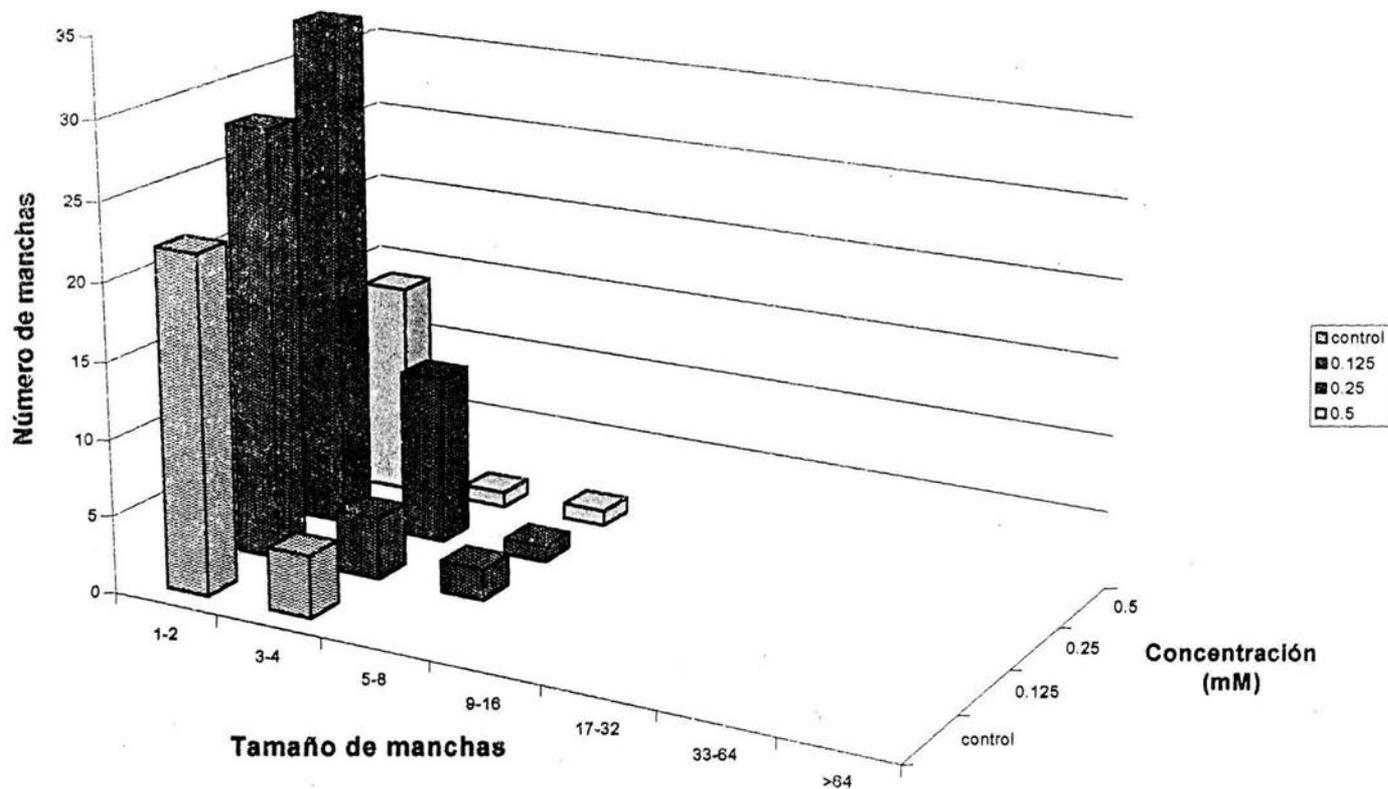
Gráfica 18. Distribución de manchas por tamaño inducida por emetina en el ensayo w/w+ en *Drosophila melanogaster*. Cruza 2 HG. Machos ++ XY



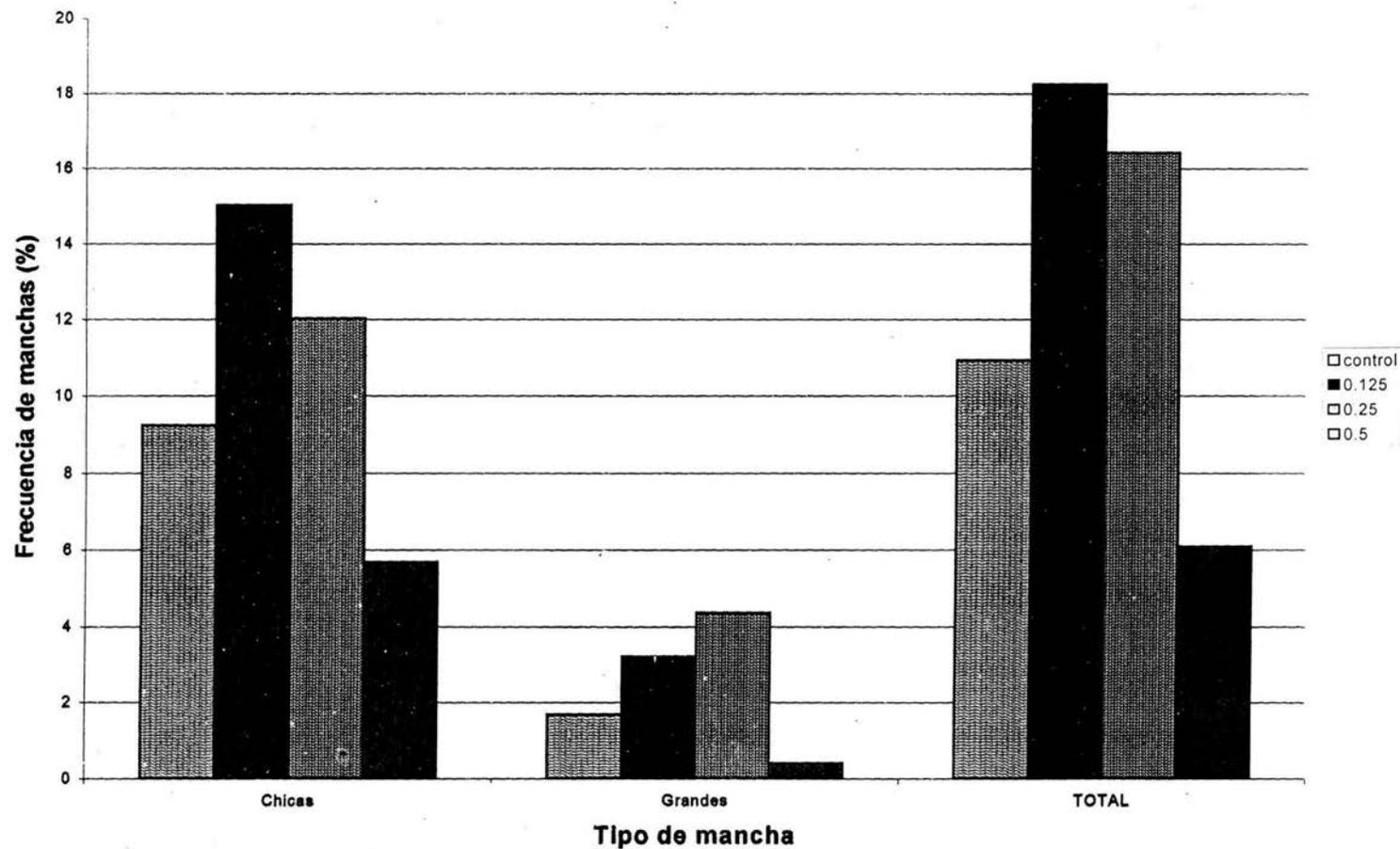
Gráfica 19. Manchas chicas, grandes y totales/100 ojos, inducidas por la emetina en el ensayo somático *w/w+* de *Drosophila melanogaster*. Cruza 2 HG. Machos ++ XY.



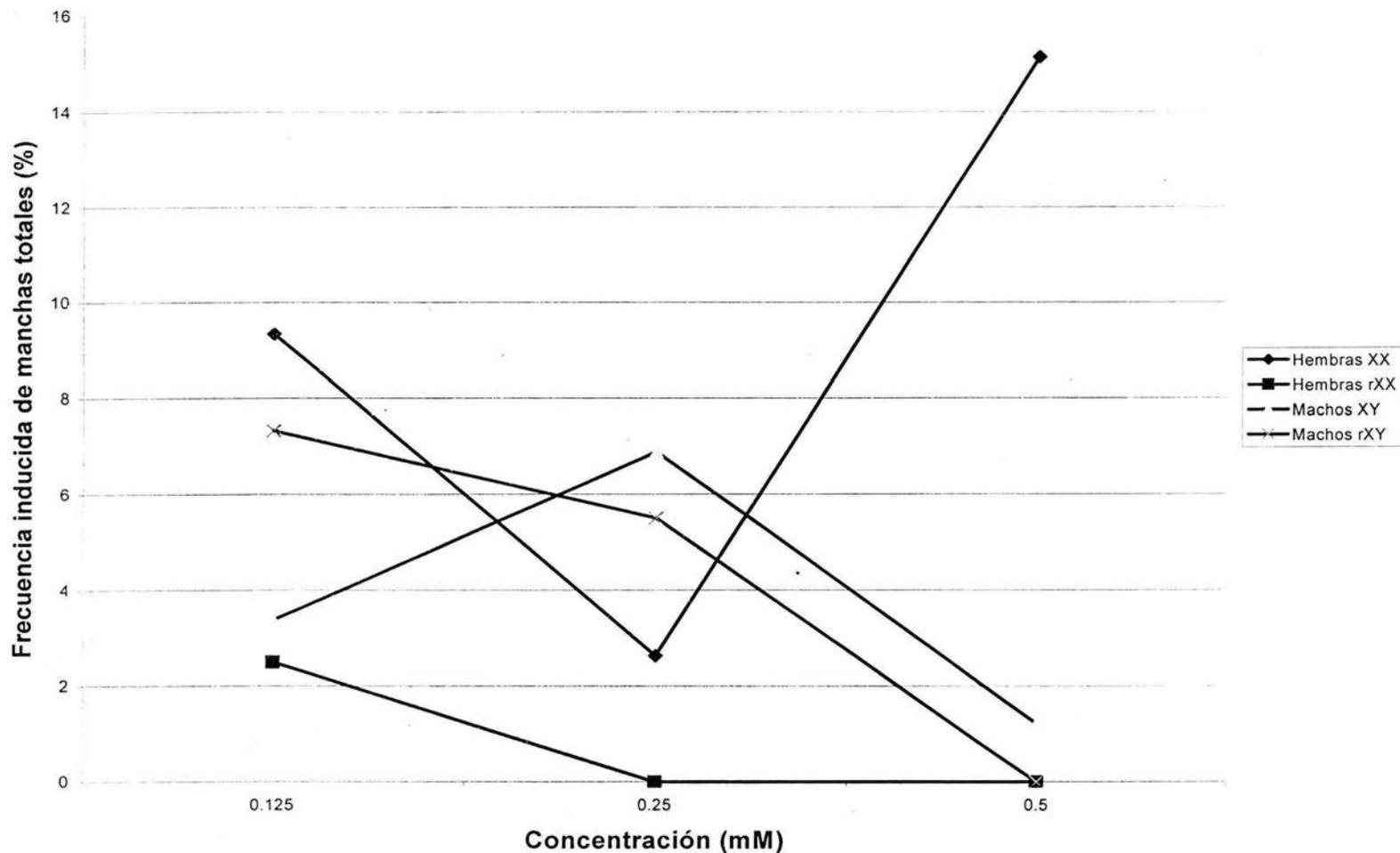
Gráfica 20. Distribución del tamaño de manchas inducida por la emetina en el ensayo w/w+ en *Drosophila melanogaster*. Cruza 2 HG. Machos yf rXY.



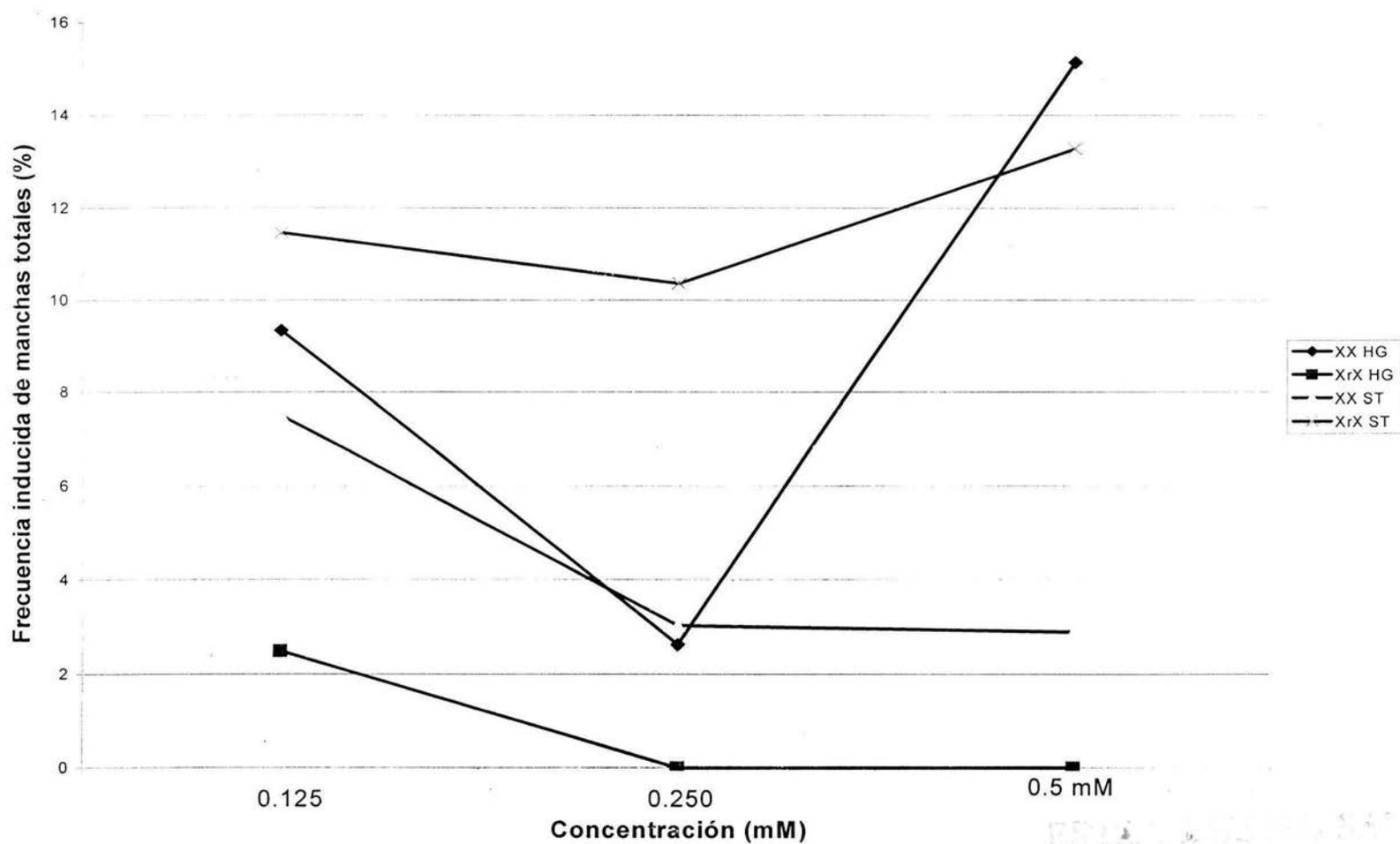
Gráfica 21. Manchas chicas, grandes y totales/100 ojos, inducidas por la emetina en el ensayo somático w/w^+ de *Drosophila melanogaster*. Cruza 2 HG. Machos yf XrY.



Gráfica 22. Frecuencia inducida de manchas totales por la emetina en el ensayo w/w+ de *Drosophila melanogaster*. Cruza 2 HG.



Gráfica 23. Frecuencia inducida de manchas totales por la emetina en el ensayo w/w+ de *Drosophila melanogaster*. Cruza 2. Hembras HG y ST.



Gráfica 24. Frecuencia inducida de manchas totales por la emetina en el ensayo w/w+ de *Drosophila melanogaster*. Cruza 2. Machos HG y ST.

