

47
2oj.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

LIBRO DE REGISTRO
DE TESIS
1988

FRECUENCIA DE MUTACIONES SOMATICAS Y RECOMBINACION INDUCIDAS POR RAYOS GAMMA EN DROSOPHILA MELANOGASTER

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE;
B I O L O G O
P R E S E N T A :

MARTHA PATRICIA CRUCES MARTINEZ



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 está 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.

INDICE

Introducción	1
Objetivo	20
Materiales y métodos	21
Resultados	32
Discusión y conclusiones	48
Bibliografía	62
Apéndice 1	68
Apéndice 2	69

INTRODUCCION

Hasta principios del siglo XVIII, la primera causa de muerte en el mundo la constituían las enfermedades de tipo infeccioso, debido en gran parte a los malos hábitos de higiene y al escaso conocimiento que hasta entonces se tenía sobre la transmisión y el tratamiento de dichas enfermedades.

En las sociedades actuales ha habido cambios dramáticos, las enfermedades infecciosas han dejado de ser la primera causa de muerte e incluso algunas de ellas han dejado de ser un problema grave de salud o bien han sido completamente erradicadas.

Sin embargo en la actualidad, el hombre está expuesto a numerosos agentes de tipo físico y químico que son el resultado de la industrialización de sus sociedades. La radiación es uno de esos agentes, el cual se ha incrementado notablemente en los últimos años.

La radiación es una forma de energía que ha existido siempre en la naturaleza y ha jugado un papel muy importante en los procesos biológicos y en la evolución de la vida en este planeta.

La luz visible, los rayos infrarrojos y los ultravioleta, son considerados como radiación no ionizante porque su energía es inferior a la necesaria para sacar de las órbitas periféricas a los electrones. La energía asociada a la radiación ionizante es suficientemente alta para ionizar átomos, dentro de este tipo de radiación se incluyen los rayos X, los rayos gamma y las partículas de alta velocidad emitidas a través del decaimiento radiactivo de ciertas reacciones nucleares, tal es el caso de las partículas alfa y beta.

Los rayos X fueron descubiertos en 1895 por Roentgen. En 1896 Becquerel descubrió la radioactividad, y al año siguiente Pierre y Marie Curie descubrieron los elementos radioactivos radio y polonio. (Kedar, 1984).

El desarrollo de la Radiobiología se inició inmediatamente después del descubrimiento de los rayos X. En términos generales puede definirse como el estudio de las interacciones de los organismos vivos con cualquier tipo de radiación (Arena, 1971). El objetivo específico de la Radiobiología es la descripción de los fenómenos observables que ocurren cuando la radiación interactúa con los sistemas biológicos y la elucidación de los principios básicos que llevan a la respuesta observada.

Con los descubrimientos de Müller en 1927 y Stadler en 1928 de los efectos mutagénicos de los rayos X en Drosophila, la genética entró en una nueva era, además esta fue la primera evidencia de que un agente ambiental puede inducir un cambio genético y que éste puede ser transmitido a los descendientes. En los años siguientes, diversas especies de plantas y animales fueron probados y se encontró que eran susceptibles a la acción mutagénica de la radiación ionizante (Sankaranarayanan, 1982).

La radiación ha contribuido al conocimiento de ciertos aspectos de la biología celular que difícilmente hubieran sido dilucidados por otros medios.

Para explicar los efectos biológicos de la radiación ionizante fueron introducidas numerosas ideas, entre ellas el concepto de la teoría blanco propuesta en 1922. En términos generales, esta teoría predice que la inactivación de las moléculas biológicas, se incrementa en forma exponencial con respecto a la dosis absorbida y el daño se produce por la interacción de la radiación ionizante

con las moléculas blanco; la probabilidad de la interacción aumenta a medida que aumenta el tamaño de las moléculas, por lo que los ácidos nucleicos son los más afectados por ser las moléculas más grandes que existen en los organismos.

Posteriormente se desarrolló el concepto de "efecto indirecto", de acuerdo al cual, las moléculas biológicas en solución son inactivadas por los radicales libres que se forman cuando la radiación interactúa con el agua.

El impresionante progreso en la genética durante las dos décadas siguientes a los descubrimientos de Müller y Stadler fué debido en gran parte, a la introducción, por parte del primero, de los conceptos de "frecuencia de mutación", "taza de mutación" y al diseño de la metodología genética en Drosophila para el estudio cuantitativo de las mutaciones. En la misma época, se desarrolló la dosimetría de las radiaciones y los conceptos de "dosis absorbida" y "dosis de exposición", que ayudaron a cuantificar los efectos genéticos de la radiación ionizante en los albores de la genética de la radiación.

A pesar de que fué poco tiempo después del descubrimiento de los rayos X cuando se presentaron los primeros efectos agudos causados por radiación, en ese momento, no se prestó mucha atención a la protección de los individuos que se encontraban expuestos.

Poco tiempo después de terminar la segunda guerra mundial, el interés por el riesgo genético para las poblaciones humanas se incrementó, sobre todo después de observar el daño causado a los sobrevivientes de la explosiones atómicas de Hiroshima y Nagasaki y a sus descendientes.

Durante los últimos años, la genética en general y la investigación en mutagénesis, en particular, han pasado por un periodo de gran actividad. El descubrimiento de los mutágenos químicos, el conocimiento de la estructura y función del ADN, la introducción de los microorganismos dentro de la investigación y el perfeccionamiento de las técnicas para el cultivo de las células de mamíferos, permitieron grandes avances en el conocimiento de las causas de la mutación y en los procesos involucrados en la reparación, además de propiciar el desarrollo de nuevas disciplinas, tales como la biología molecular y la citogenética humana y animal, por mencionar algunas.

Actualmente, la radiación juega un papel muy importante en la vida de todos los organismos que habitamos el planeta, ya que no sólo estamos expuestos a los efectos de la radiación proveniente de las fuentes naturales, como son: los rayos cósmicos, la radiación ultravioleta proveniente del sol y las emisiones de los radioisótopos que se encuentran en forma natural en la corteza terrestre. Los adelantos tecnológicos de la sociedad en que vivimos han traído como resultado, nuevas fuentes que producen emisiones radioactivas en forma artificial; entre estas encontramos los relojes con carátula luminosa, los hornos de microondas, las emisiones radioactivas de los aparatos usados en radioterapia y las plantas nucleoelectricas.

En vista de que la radiación artificial se ha convertido en un elemento cotidiano y hasta cierto punto, indispensable en nuestras vidas, tenemos que investigar los efectos que produce sobre los organismos y sus riesgos y tratar de minimizar la exposición.

EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LA RADIACION

El daño que la radiación puede producir a una célula, depende del tipo de radiación, de la razón de dosis, de la dosis absorbida, de las condiciones del medio y de la actividad reproductora de la célula.

En 1903 los biólogos franceses Bergonie y Tribondeau, establecieron una ley, según la cuál, la radiosensibilidad de una célula es directamente proporcional a su actividad reproductiva e inversamente proporcional a su grado de diferenciación (Arena, 1971).

De esta manera, las células menos diferenciadas y con una gran actividad reproductora son más radiosensibles que las células más diferenciadas.

El daño por radiación puede ser causado tanto por acción directa, como por la interacción de las moléculas con radicales libres.

Las radiaciones con una baja transferencia lineal de energía (LET), producen daño a través de la interacción de las moléculas con radicales libres, tal es el caso de los rayos X y gamma. Las partículas alfa y beta, que tiene alta transferencia lineal de energía, producen daño mediante acción directa.

Se mencionó anteriormente, que la sensibilidad de las células a la radiación depende de su actividad reproductora, por lo que la radiosensibilidad es diferente en las distintas fases del ciclo celular, existiendo una relación directa entre la cantidad de ADN nuclear y la radiosensibilidad de las células, siendo ésta mayor a medida que la cantidad de ADN aumenta, lo cual, está generalmente relacionado con el tamaño del núcleo. En la Tabla No. 1.

podemos observar la sensibilidad de la célula durante las diferentes etapas del ciclo celular (Kedar, 1984).

Tabla No. 1.- SENSIBILIDAD A LA RADIACION DE VARIAS FASES DEL CICLO CELULAR.

Criterio de radiosensibilidad	Fase más sensitiva
Muerte reproductiva	M
Daño cromosómico	G2
Retardo en la división	G2
Síntesis de ADN	S

La radiación cambia la estructura, la síntesis y la función de los ácidos nucleicos y las proteínas, entre las que se encuentra la ADN polimerasa, llegando a bloquear completamente la síntesis de ADN.

EFFECTOS DE LA RADIACION A NIVEL CELULAR

Los rayos X y gamma son capaces de inducir cambios intra e intergénicos. Los radicales libres causan errores en el apareamiento de las bases, lo que ocasiona mutaciones génicas y cromosómicas, e incluso, puede originar la aparición de aberraciones cromosómicas.

Entre las aberraciones cromosómicas producidas por la radiación, se encuentran las inversiones, las translocaciones y las alteraciones en el número cromosómico (Sankaranarayanan, 1982). Se sabe que los cambios en la estructura de un cromosoma (aberraciones estructurales) y las alteraciones al número cromosómico (aberraciones numéricas) se producen espontáneamente en las células

somáticas y germinales de plantas y animales y que esta frecuencia se incrementa por la exposición a agentes mutagénicos.

Las aberraciones estructurales pueden ser cromosómicas o cromatídicas (Goodenough, 1981); las cromatídicas se distinguen de las cromosómicas porque, en las primeras, se ve afectada una de las dos cromátidas que componen un cromosoma y en las segundas, la lesión ocurre en ambas.

Entre las aberraciones estructurales ocasionadas por la radiación ionizante, encontramos: deleciones terminales e intercalares, duplicaciones, inversiones paracéntricas y pericéntricas y anillos (Sankaranarayanan, 1982).

En los eucariontes, la irradiación de espermatoцитos puede llevar a la producción de aberraciones estructurales de tipo cromatídico.

Está bien establecido que los tipos predominantes de lesiones inducidas en el ADN por radiación ionizante se basan en la ruptura de una o las dos bandas de la molécula (Harisharan, et al., 1975).

Los resultados de los experimentos realizados en este campo, sugieren que las lesiones producidas por radiación ultravioleta y agentes alquilantes, dan como resultado aberraciones cromosómicas, debido a errores en la replicación y las lesiones originadas por radiación ionizante son generadas por errores en la reparación (Evans, 1977).

Además de las aberraciones cromosómicas, la radiación ionizante induce otro tipo de evento, conocido

como intercambio de cromátidas hermanas (ICH); éste afecta a ambas cromátidas. Existen algunas diferencias entre las aberraciones cromosómicas y los ICH, entre las que podemos mencionar que, mientras la radiación ionizante produce aberraciones cromosómicas en cualquier fase del ciclo celular, los intercambios sólo se producen en la fase S del ciclo celular.

Otra diferencia importante radica en el hecho de que las lesiones que producen las aberraciones "tienen una vida corta" dependiente de la viabilidad celular, mientras que las lesiones que causan los intercambios de cromátidas son persistentes y son compatibles con la viabilidad celular (Morales, et al., 1988).

Otras consecuencias del daño inducido por la radiación son las mutaciones letales dominantes, que específicamente incluye todos los cambios genéticos que, independientemente de su origen materno o paterno, causan la muerte de los huevos que los portan, poco tiempo después de la fertilización (Sankaranarayanan, 1982).

Existe una clara distinción entre los letales originados en las células germinales premeióticas y postmeióticas. A bajas dosis, el daño se expresa primordialmente, como pérdida de cromosomas debido a simples rupturas, si el fragmento terminal no se restituye, forma fragmentos acéntricos y cromosomas dicéntricos durante el desarrollo del cigoto, lo cual origina la muerte del mismo. A dosis altas, las rupturas múltiples pueden llevar a la muerte del cigoto.

En las células masculinas premeióticas muchas, sino todas las rupturas cromosómicas, producen cromosomas acéntricos y dicéntricos.

La recombinación se presenta como un fenómeno producido por la radiación ionizante. Muchos agentes mutagénicos producen mutaciones, rearrreglos cromosómicos y recombinación en diferentes proporciones. Esto sugiere que debe haber algunos pasos primarios en común entre estos eventos. La hipótesis de que los rearrreglos cromosómicos pueden originarse por recombinación ilegítima entre cromosomas no homólogos, ha sido probada en Drosophila con rayos X y mutágenos químicos y no se ha encontrado evidencia suficiente para sostenerla (Sankaranarayanan, 1982).

El primer estudio de la inducción de la recombinación por medio de radiación, fué realizado en Drosophila (Becker, 1976). La consecuencia genética de la recombinación, es la homocigosis de un gen.

Hay numerosos ejemplos de que la recombinación mitótica es causada por radiación ionizante en eucariontes inferiores, entre estos ha sido reportada, por ejemplo, en Aspergillus nidulans, Ustilago maydis y Saccaromices cerevisiae (Wügler, 1986).

EFFECTOS DE LA RADIACION EN Drosophila melanogaster.

En D. melanogaster, como en todos los eucariontes multicelulares, la radiación ionizante puede producir mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas. La evidencia que conduce a la naturaleza de la radiación como inductora de mutaciones, ha resultado del análisis de las mutaciones inducidas en una gran variedad de estados germinales (Sankaranarayanan y Sobels, 1975).

Los letales dominantes, que incluyen cualquier evento el cuál es incompatible con la supervivencia de la

célula, también pueden ser observados en D. melanogaster después de la irradiación (Wügler y Ramel, 1986). Los datos de la inducción de letales dominantes por medio de rayos X en diferentes estados de la espermatogénesis muestran que, como en el caso de los letales recesivos y las translocaciones, los estados más radiosensibles son las espermatidas y los espermatozoides.

Se considera a las aberraciones cromosómicas como eventos claves para el conocimiento del daño genético producido por radiación en las células somáticas; la pérdida de cromosomas posterior a las rupturas, juega un papel muy importante en la mortalidad producida por rayos X en larvas de Drosophila. En una serie de vastos experimentos, Ostertag, en 1963, obtuvo evidencia en D. melanogaster que sostiene que la ruptura de cromosomas, seguida por la pérdida de los mismos, es la principal causa del daño somático por radiación.

En cuanto a la recombinación, ya se mencionó que el primer estudio fué realizado con Drosophila; utilizando los marcadores genéticos apropiados se pudieron detectar clones en la cutícula de la mosca adulta. Se dedujo que esos clones fueron el resultado de un evento de recombinación recíproca entre los cromosomas homólogos en un estado temprano del desarrollo (Becker, 1976).

Pruebas para detectar mutágenos.

Además de la radiación ionizante, existe un gran número de agentes sobre todo de tipo químico que pueden inducir mutaciones. Estos agentes mutagénicos han incrementado la frecuencia de algunas enfermedades que hasta hace algunos años eran poco frecuentes. Estudios realizados con Salmonella thyphimurium y D. melanogaster han confirmado una fuerte correlación entre la carcinogenicidad y la mutagenicidad de tales agentes (Sobels y Vogel, 1975; WUgler y Ramel, 1986).

Actualmente se calcula que las enfermedades cardiovasculares causan 50 veces más muertes que las enfermedades infecciosas y el cáncer es considerado como la segunda causa de muerte en el mundo (Purchase, 1982).

Los estudios epidemiológicos de diferentes poblaciones de emigrantes en los Estados Unidos y Canadá han sugerido que el cáncer es causado por influencias ambientales, y que éstas están íntimamente relacionadas con el estilo de vida. Muchos mutágenos y carcinógenos se encuentran en embutidos, particularmente en los que son asados o ahumados. Los hábitos tales como: el tabaquismo, el alcoholismo y las dietas grasosas entre otros, contribuyen a incrementar la incidencia de cáncer (Reporte de contaminantes ambientales, Canadá, 1986).

Considerando lo anterior, una de las posibles medidas para la prevención de algunos tipos de enfermedades incluyendo el cáncer, sería la de detectar aquellos agentes que las pueden causar de entre los cientos a los que está expuesto el hombre y minimizar la exposición de la población a esos agentes.

Sin embargo la evaluación de estos agentes es

una tarea difícil, ya que por ejemplo para el caso de los agentes de tipo químico se tiene registrados 5,000,000, según el reporte publicado por la Agencia para la Protección del Ambiente de Canadá en 1986; de estos 70,000 son usados comúnmente en el mundo. Aún cuando la tarea parece difícil, se están llevando a cabo numerosos esfuerzos para realizarla; la comunidad científica internacional ha estimulado la rápida expansión de un nuevo campo al que se ha denominado "mutagénesis ambiental" ó "genética toxicológica", que ha dado como resultado el desarrollo de una amplia variedad de pruebas biológicas a corto plazo para detectar la habilidad de los agentes, ya sean físicos ó químicos para provocar cambios genéticos en microorganismos, plantas, insectos y mamíferos.

Desde 1980 la Agencia de Protección del Ambiente de los Estados Unidos creó un programa para evaluar las pruebas que se utilizan para detectar mutágenos. Los objetivos del programa fueron los siguientes:

- Determinar la habilidad de los bioensayos para detectar mutágenos.
- Evaluar la sensibilidad de cada bioensayo para responder a clases específicas de agentes.
- Formular protocolos generales y criterios para la interpretación de los datos.
- Proponer baterías especializadas de bioensayos para detectar con una alta probabilidad el daño genético inducido por diversos agentes (Green y Auletta, 1980).

Para la evaluación de los ensayos se utilizaron los siguientes criterios:

- a) Número y clases de compuestos químicos probados con el ensayo.
- b) Uniformidad del ensayo.
- c) Número de ensayos realizados por año y costos de los mismos (Brusik, et. al., 1985).

Como resultado de este programa, se seleccionaron 10 ensayos que fueron catalogados como rutinas, y que se encuentran enlistados en la tabla # 2.

TABLA No. 2
GRUPO DE PRUEBAS IDENTIFICADAS COMO RUTINAS.
(Brusik y Auletta, 1985)

BIOENSAYO	TIPO DE PRUEBA.
<u>Salmonella typhimurium</u> , microsoma	Bacteria.
Mutaciones reversas.	
<u>E. coli</u> . Mutación reversa	Bacteria.
<u>E. coli</u> . Reparacion de ADN.	Bacteria.
<u>Drosophila</u> . LRLS.	Insecto.
Análisis cromosómico	Cels. Mamifero.
ICH.	Cels. Mamifero.
Mutación V 79 HPRT.	Cels. Mamifero.
Análisis cromosómico en médula ósea.	Roedor.
Micronúcleos.	Roedor.
Letales Dominantes.	Roedor.

Drosophila COMO SISTEMA DE PRUEBA.

Uno de los ensayos clasificados como rutina por la Agencia de Protección del Ambiente de los Estados Unidos es realizado con la mosca de la fruta Drosophila melanogaster.

Drosophila melanogaster es un insecto holometábolo cuya genética ha sido intensivamente estudiada desde principios de este siglo; esto lo ha convertido en un buen candidato para realizar estudios de mutagenicidad (Wüglar, 1980).

Bajo condiciones normales de cultivo (25°C y 60% de humedad relativa), la duración aproximada de los diferentes estados de desarrollo es la siguiente:

Desarrollo embrionario	1 día.
Larva del 1° estadio	1 día.
Larva del 2° estadio	1 día.
Larva del 3° estadio	1 día.
Prepupa	2 días.
Pupa	4 días.
Estado adulto	40 días.

Drosophila como sistema de prueba presenta numerosas ventajas (Lee, et al., 1983; Wüglar, et al., 1984):

.Presenta un ciclo de vida corto, aprximadamente de 10 días en condiciones de laboratorio.

.Se pueden cultivar un número considerable de individuos en un espacio reducido a un bajo costo.

.Permite realizar ensayos "in vivo" con pruebas bien definidas para determinar un amplio espectro de eventos genéticos (mutaciones letales recesivas, lesiones,

translocaciones, pérdida de cromosomas y recombinación) (Wüglér, 1980; Graf, 1984).

Drosophila posee la capacidad metabólica para activar e inactivar promutágenos y procarcinógenos y sus metabolitos, siendo comparable con los tejidos extrahepáticos de los mamíferos. (Halletrom y Magnusom, 1982). El análisis bioquímico de las enzimas involucradas en su biotransformación indica la presencia de muchas de ellas en Drosophila (Vogel, 1987). Aunque los insectos no poseen un órgano específico como el hígado de los mamíferos para la desintoxicación, numerosos tejidos están involucrados en este proceso, entre éstos se encuentran los tubos de Malpigio, algunas partes del tracto digestivo y ciertas regiones del tejido gonadal (Cassida, 1969).

.Además ofrece la capacidad de determinar la frecuencia de mutaciones inducidas en las diferentes etapas del desarrollo de las células germinales. (Lee, et al., 1983; Sankaranarayanan y Sobels, 1975).

La prueba de letales recesivos ligados al sexo (LRLS) ha sido la más utilizada durante los últimos 27 años. (Lee, et al., 1983; Wüglér, 1983; Wüglér, et al., 1984). Esta prueba ofrece numerosas ventajas:

- 1) Desde el punto de vista genético, detecta mutaciones puntuales y pequeñas deleciones.
- 2) Es una prueba sensible, ya que involucra todo el cromosoma X, el cual representa el 20% del total del genoma; es decir entre 600 y 800 genes. (Wüglér, 1983).
- 3) La correlación entre la actividad carcinogénica y mutagénica es excelente, de los carcinógenos clásicos que

se han probado en Drosophila, entre el 83% y el 91% resultaron ser positivos (Graf, et al., 1984).

Hasta 1983, se habían probado con este ensayo 421 compuestos, de estos 198 fueron positivos, 48 negativos y 177 resultaron inconclusos, debido en gran parte a que se utilizó un criterio muy rígido para clasificarlos. (Lee, et al., 1983; Wüglér, et al., 1984; Vogel, 1987).

La principal desventaja que presentan los letales recesivos es la de ser una prueba larga y muy tediosa, ya que se realiza en dos generaciones; esto, hace que se convierta en una prueba costosa (Wüglér y Vogel, 1986). En un laboratorio especializado la prueba de letales recesivos puede tardar hasta dos meses, por esta razón en la práctica se aplica sólo a unos pocos agentes.

Por otra parte se debe considerar la posibilidad de que se eliminen células portadoras de una mutación letal en la llamada "selección germinal". Este término fue introducido por Müller en 1954 e indica la eliminación de células que carecen de un gen requerido para que se desarrolle un espermatozoide a partir de una espermatogonia, por lo que algunas de las mutaciones inducidas no se recuperan dando resultados parciales (Wüglér, et al., 1986).

LA PRUEBA DE MUTACIONES SOMATICAS Y RECOMBINACION

EN Drosophila

En vista de las limitaciones intrínsecas que presenta la prueba de LRLS, se ha propuesto el uso potencial de células somáticas de Drosophila, para detectar con mayor facilidad y rapidez la capacidad mutagénica de un gran número de compuestos (Vogel, 1985; Wüglér, et al., 1984;

Wüglér, et al. 1986).

Durante el desarrollo embrionario de Drosophila, en la etapa de blastodermo, las células se diferencian en una de dos direcciones generales. Algunas dan lugar al cuerpo de la larva, mientras que otras forman partes del cuerpo de la mosca adulta. A lo largo de las tres fases larvarias del ciclo de la mosca, algunas células se separan en forma de pequeños paquetes indiferenciados denominados: discos imagales. Las células del disco conservan su morfología indiferenciada, hasta el momento en que se exponen a la acción de la hormona ecdisona, que determina la formación de los tejidos de los adultos. (Goodenough, 1981).

Durante la metamorfosis, los discos imagales se evaginan y se convierten en los ojos, las antenas, las patas y las alas de la mosca adulta.

El ensayo de mutaciones somáticas y recombinación, consiste esencialmente en la exposición de una larva heteróciga para dos marcadores visibles en el adulto a un mutágeno (Graf, et al. 1984). Esta larva posee un grupo de células destinadas a dividirse en una configuración más o menos constante, de tal manera que una mutación inducida en algunas de las células expuestas, dará como resultado una alteración del fenotipo, que se expresará como una mancha reconocible en la cutícula del adulto.

En la actualidad existen tres ensayos en células somáticas que ya poseen un buen nivel de validación (Wüglér, et al. 1985; Wüglér, et al. 1986; Vogel, 1985; Fujikawa, et al. 1983):

A) La prueba de la mancha en el ala, basado en los marcadores mwh y flr.

B) La prueba de la mancha en el ojo, que utiliza los dos alelos del "locus white".

Los dos ensayos mencionados anteriormente detectan mutaciones somáticas y recombinación.

C) La prueba de la mancha en el ojo, utilizando el marcador inestable "white-zeste", detecta la inducción de eventos genéticos relacionados con la inserción de una secuencia en la región del gen "white" (Wügler y Vogel, 1986; Vogel, 1985b).

Las ventajas que presentan los ensayos somáticos son las siguientes:

- Es una prueba rápida ya que se realiza en una sola generación; por esta razón es una prueba barata sobre todo si la comparamos con la prueba de LRLS.
- Tanto en el ensayo del ala como en el del ojo, se cuenta con numerosas células blanco (800 omatidias en el caso del ojo y más de 30,000 células en el ensayo del ala).
- No sólo permite evaluar la mutagenicidad, sino también la actividad recombinogénica de los compuestos y ésta parece estar en relación directa con la carcinogenicidad (Wügler, 1986).
- Los ensayos son capaces de detectar mutágenos tales como agentes alquilantes, mono y polifuncionales, que con otras pruebas resultan difíciles de detectar.
- Detectan además de mutaciones génicas, aberraciones cromosómicas, recombinación mitótica y posiblemente conversión génica.

OBJETIVO

DETERMINAR LA FRECUENCIA DE MUTACIONES SOMATICAS Y RECOMBINACION INDUCIDAS EN Drosophila melanogaster POR RAYOS GAMMA, UTILIZANDO EL ENSAYO DEL ALA.

MATERIALES Y METODOS

Para realizar la prueba de la mancha en el ala, se realizaron dos cruza diferentes, para lo cual se utilizaron las siguientes cepas:

CRUZA No. 1

♀♀ yw/yw ; mwh se/mwh se ♂♂ +/Y ; se/se

CRUZA No. 2

♀♀ mwh/mwh ♂♂ flr³/TM3.Ser.

Las hembras yw/yw ; mwh se/mwh se, presentan el cuerpo amarillo y los ojos blancos, el marcador mwh ("multiple wing hair"), está localizado en el brazo izquierdo del cromosoma 3, en posición 3.0 muy cerca del centrómero (el centrómero está en posición 4.47) y determina que las células que lo portan presenten 3 ó más cerdas en lugar de una como en el tipo silvestre (Lindsley, 1968). El caracter mwh sólo se expresa en condición homóciga.

Los machos sepia (se), presentan el cuerpo silvestre y los ojos de color sepia, este marcador también se encuentra en el cromosoma 3 en posición 2.6 .

Las hembras mwh son fenotípicamente como el

tipo silvestre, pero presentan en las alas la mutación *mwh* antes descrita. Los machos $f1r^3/TM3, Ser$ también son fenotípicamente silvestres, tanto para el color de los ojos como el cuerpo. La mutación $f1r^3$, al igual que la *mwh*, afecta las cerdas de las células del ala. Esta mutación se encuentra en condición heterociga, ya que en condición homociga es letal y está balanceada por el marcador $TM3$.

Cuando la mutación $f1r^3$ se expresa, produce cerdas deformadas que presentan la apariencia de flamas. Este marcador se encuentra también en el cromosoma 3 en posición 3.9. El marcador *Serratia* (*Ser*) modifica los bordes de las alas haciéndolos discontinuos.

El protocolo que se siguió fué el siguiente:

Se aislaron hembras vírgenes de 0 a 12 horas de edad de las cepas $yw/yw ; mwh se/mwh se$ y mwh/mwh . Se dejaron madurar por espacio de 8 días al cabo de los cuales se dejaron cruzar las hembras $yw/yw ; mwh se/mwh se$, fueron cruzadas por los machos $+Y ; se/se$ y las hembras $mwh/mwh se$ cruzaron por los machos $f1r^3/TM3, Ser$.

La cruce se realizó en frascos lecheros de 0.25 l. de capacidad. Las parejas se dejaron cruzar durante dos días en un cuarto de cultivo a 25°C.

COLECTA DE HUEVOS

Para coleccionar los huevos, las moscas se colocaron en frascos lecheros, limpios y sin alimento; se cubrieron con cajas de Petri de 5 cm. de altura, las cuales contenían medio fresco.

Se permitió a las moscas ovipositar solamente

durante una hora con la finalidad de homogenizar al máximo la edad de los huevos; transcurrida la hora, se cambió la caja de Petri por una nueva para coleccionar huevos por otra hora, este procedimiento se repitió hasta obtener la muestra deseada.

Los huevos fueron cubiertos con la tapa de la caja de Petri y fueron mantenidos en un cuarto de cultivo hasta que completaron su desarrollo.

Cuando las larvas alcanzaron el segundo estadio, es decir a las 48 horas, fueron irradiadas en un irradiador experimental Vick-rad. (Vick-rad 2000, Vicker Radiation Division England.). Las dosis que se utilizaron fueron las siguientes: 0, 2.5, 5.0 y 10 Gy.

Después de la irradiación, las larvas fueron transferidas a tubos homeopáticos que contenían medio de cultivo. Se colocaron 25 larvas en cada tubo y se dejaron incubar en el cuarto de cultivo hasta que emergieron los adultos 8 días después.

PREPARACION DE LAS ALAS

Cuando los adultos emergieron, se procedió a separar las alas utilizando pinzas de relojero del No. 5 y agujas de disección. En el caso de la cruce No. 2 se descartó la progenie que presentaba el marcador serratia.

Una vez separadas las alas se procedió a montarlas de la siguiente manera:

Se extendió una gota de solución de Faure (ver fórmula en el apéndice 1) sobre un portaobjetos y se colocaron las alas extendiéndolas perfectamente con la ayuda de un pincel del No. 1; estas preparaciones se dejaron secar

por 24 horas en una atmósfera libre de polvo, posteriormente se puso una gota de solución de Faure y se cubrió con un cubreobjeto ,dejándose secar nuevamente en una atmósfera libre de polvo.

Cuando las preparaciones se secaron, se procedió a su análisis en un microscopio óptico a 400 X.

Para facilitar la observación Graf, et al., 1984 dividieron el ala en 7 regiones en relación con las venas (Fig. No.1). En hojas de conteo especiales, (apéndice No. 2) se anotó el número de células afectadas para cada ala y en cada región. Se analizaron 25 alas para cada dosis en cada cruz y se realizaron tres repeticiones.

CLASIFICACION DE LAS MANCHAS

A) TAMAÑO DE LAS MANCHAS.

Según Wüglar y Vogel, 1986, las manchas pueden ser clasificadas de acuerdo con su tamaño en dos categorías:

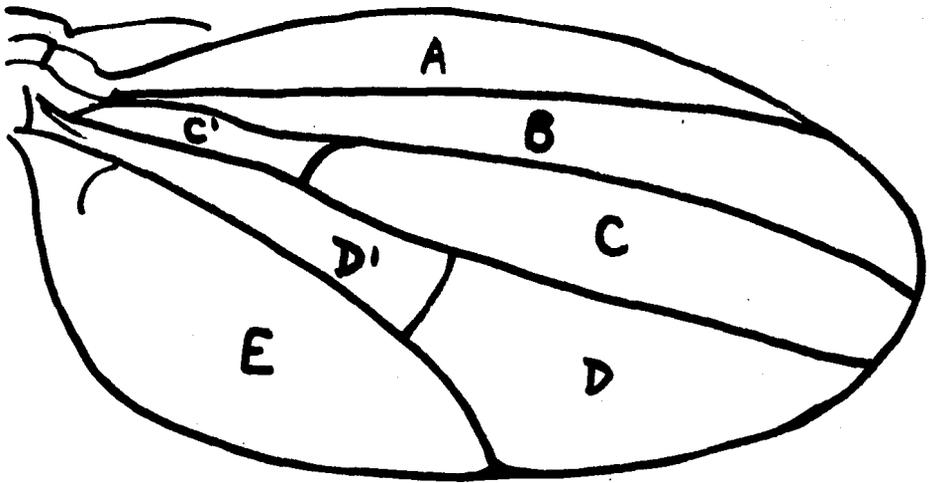
- Manchas chicas: Aquellas que tienen 1 ó 2 células (fotografía No. 1).
- Manchas grandes: Las que tienen más de 3 células (fotografía No. 2).

B) TIPOS DE MANCHAS.

De acuerdo con el tipo de células involucradas en la mancha, éstas pueden ser:

- Manchas sencillas: Las que involucran un solo tipo de células ya sea mwh o flr². (Fotografías 3 y 4).

FIGURA No. 1
REGIONES EN QUE HA SIDO DIVIDIDA EL ALA PARA SU ANALISIS.
(Graf, et al., 1984)



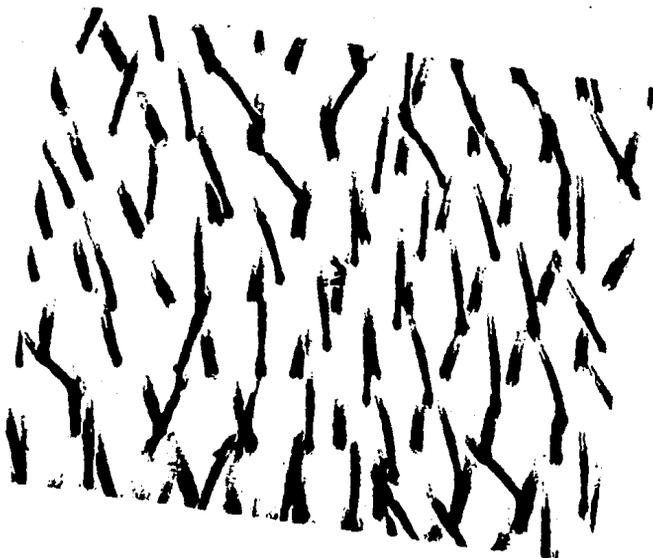
-- Manchas gemelas: Las que presentan los dos tipos de células, mwh y flr² (Fotografía No. 5).

Ya que la cruce No. 1 sólo presenta el marcador mwh, Únicamente se pudieron analizar manchas sencillas, ya fueran chicas ó grandes.

CRITERIOS UTILIZADOS PARA EL ANALISIS DE LAS MANCHAS

1. Para que una célula sea considerada como mwh, ésta debe presentar 3 ó más cerdas.
2. Una célula que presenta menos de 3 cerdas, puede ser considerada como mwh, si presenta al menos 2 cerdas y se encuentra rodeada de 3 ó más células que presenten 3 cerdas.
3. Si existen más de 3 hileras de células normales separando hileras de células que presenten la mutación mwh o flr², éstas serán consideradas como dos manchas, en caso contrario se considerará como una sola mancha.

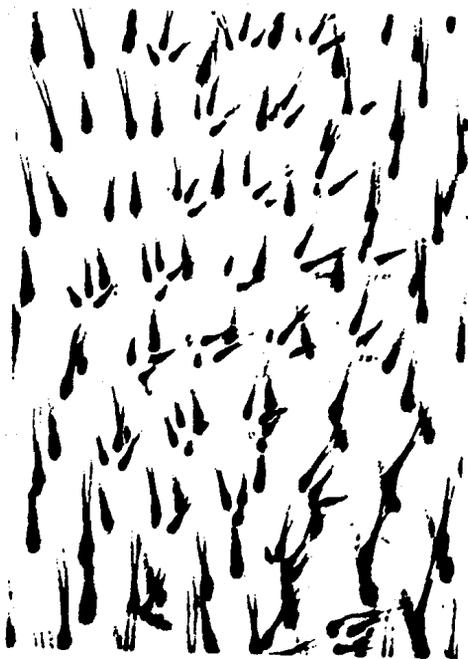
FOTOGRAFIA No. 1 MANCHA CHICA MWH.



FOTOGRAFIA No.2 MANCHA GRANDE MWH.



FOTOGRAFIA No.3 MANCHA SIMPLE MWH.





FOTOGRAFIA No.4.MANCHA SIMPLE FLR³.



FOTOGRAFIA No. 5 MANCHA GEMELA.

RESULTADOS

Los resultados para la frecuencia de mutaciones somáticas inducidas por 2.5, 5.0, y 10.0 Gy en los descendientes de la cruce yw/yw ; mwh se/ mwh se * $+/Y$, son presentados en la tabla No. 1.

En esta cruce sólo existe la posibilidad de observar manchas simples (chicas ó grandes) ya que únicamente presenta el marcador mwh . En la tabla No. 1 aparece el número total de manchas chicas y grandes encontrado para los tres experimentos realizados. En esta tabla podemos observar que para las manchas chicas, no se encontraron diferencias significativas para la dosis de 2.5 Gy cuando se aplicó la prueba de χ^2 . Al observar la tabla, podemos notar que el número de manchas chicas inducidas para esa dosis, fué menor a la del testigo. Para las dosis de 5.0 y 10.0 Gy se encontraron diferencias significativas al 0.05.

En el caso de las manchas grandes, todas las dosis indujeron un número mayor con respecto al testigo; al aplicar la prueba estadística, resultaron ser altamente significativas ($p < 0.001$).

En la tabla No. 2 se presentan los resultados obtenidos para la cruce No. 2. En esta cruce, se analizaron las manchas simples, chicas ó grandes, pero al presentar los dos marcadores utilizados en el ensayo del ala (mwh y fir^3), se pudieron analizar también las manchas gemelas, consistentes en una región mwh y otra fir^3 . En la tabla No. 2 aparecen el número total de manchas chicas, grandes y gemelas.

En cuanto al número de manchas chicas, sólo la dosis de 2.5 Gy resultó ser altamente significativa ($p < 0.001$). Para las manchas grandes, sólo las dosis de 5.0 y

10.0 Gy resultaron ser altamente significativas. Con respecto a las manchas gemelas, ninguna de las dosis elevó significativamente el número de estas manchas.

En la tabla No. 3 aparece el tamaño promedio de las manchas, el cuál se obtuvo dividiendo el número de células involucradas en cada mancha entre el número total de manchas existentes.

Para las manchas chicas, podemos observar que no se registró una variación importante para ninguna de las dosis con respecto al testigo. En cuanto a las manchas grandes, éstas se incrementaron de manera lineal con respecto a la dosis de radiación.

En la tabla No. 4 podemos observar el tamaño promedio para las manchas chicas, grandes y gemelas en la cruz No. 2. En esta tabla como en la anterior, podemos observar que el tamaño promedio de las manchas chicas, no difiere significativamente. En cuanto a las manchas grandes, no se encontró ninguna de estas manchas para el grupo testigo pero el tamaño promedio de éstas se incrementó de manera lineal con la dosis de radiación; esto mismo ocurrió con las manchas gemelas cuyo tamaño aumentó tanto para la parte mwh como para la fir³. Se puede notar en esta tabla que aunque el mayor número de manchas grandes y gemelas fué obtenido con la dosis de 10.0 Gy, el tamaño promedio mayor, se obtuvo con la dosis de 5.0 Gy y no con la más alta como era de esperarse.

En la tabla No. 5 se muestra el número de células promedio obtenidas en los tres experimentos, que presentaron la mutación mwh en la cruz No. 1. Este número se obtuvo al sumar todas las células involucradas tanto en las manchas chicas como en las manchas grandes. Para todas las dosis resultó ser altamente significativo con respecto

al testigo ($p < 0.001$).

En la tabla No. 6 se muestran los resultados de los promedios obtenidos para el número de células que presentaron las mutaciones mwh y flr³ en la cruz No. 2. Este número se obtuvo sumando todas las células involucradas en las manchas chicas, grandes y gemelas y dividiendo este número entre los experimentos realizados. Como en la cruz No. 1 todas las dosis dieron resultados altamente significativos con respecto al testigo.

Con los resultados obtenidos en las tablas 5 y 6, se construyó la grafica No. 1 para poder comparar el comportamiento de las dos cruces.

Para determinar la distribución del tamaño de las manchas en relación con la dosis de radiación, las manchas fueron incluidas en los siguientes intervalos: 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, -32, -64, -128, -256. Estos intervalos han sido utilizados en trabajos anteriores (Graf, *et al.*, 1984; Wüglar y Vogel, 1986).

Una vez incluidas las manchas en los intervalos, se calculó el porcentaje en que se presentaba cada uno y con estos datos se construyeron las tablas 7 y 8. Estos resultados se graficaron posteriormente para las 4 dosis de las dos cruces.

TABLA No. 1
 FRECUENCIA DE MUTACIONES SOMATICAS Y RECOMBINACION
 INDUCIDAS EN D. melanogaster POR RAYOS GAMMA.
 (Cruza No. 1)

TRATA- MIENTO (Gy)	No. DE ALAS ANALIZADAS	No. TOTAL DE MANCHAS CHICAS	No. TOTAL DE MANCHAS GRANDES
0	75	25 (0.33)	3 (0.04)
2.5	75	21 (0.28)	19*** (0.25)
5.0	75	42* (0.56)	24*** (0.32)
10.0	75	41* (0.54)	42*** (0.56)

* significativo para $p < 0.05$

*** significativo para $p < 0.001$

TABLA No. 2
 FRECUENCIA DE MUTACIONES SOMATICAS Y RECOMBINACION
 INDUCIDAS EN *D. melanogaster* POR RAYOS GAMMA.
 (Cruza No. 2)

TRATA- MIENTO (Gy)	No. DE ALAS ANALIZADAS	No. TOTAL DE MANCHAS CHICAS	No. TOTAL DE MANCHAS GRANDES	No. TOTAL DE MANCHAS GEMELAS
0	75	13 (0.17)	0 0	1 (0.013)
2.5	75	36***(0.48)	2 (0.026)	1 (0.013)
5.0	75	15 (0.20)	15*** (0.20)	2 (0.026)
10.0	75	23 (0.30)	34****(0.45)	3 (0.04)

* significativo para $p < 0.05$

*** significativo para $p < 0.001$

TABLA No. 3
TAMAÑO PROMEDIO DE LAS MANCHAS ANALIZADAS
(Cruza No. 1)

TRATA- MIENTO (Gy)	No. DE ALAS ANALIZADAS	TAMAÑO PROMEDIO DE LAS MANCHAS CHICAS	TAMAÑO PROMEDIO DE LAS MANCHAS GRANDES
0	75	1.2	4.3
2.5	75	1.1	23.7
5.0	75	1.2	58.0
10.0	75	1.3	69.5

TABLA No. 4
TAMAÑO PROMEDIO DE LAS MANCHAS ANALIZADAS
 (Cruza No. 2)

TRATA- MIENTO (Gy)	No. DE ALAS ANALIZADAS	TAMAÑO PROMEDIO DE LAS MANCHAS CHICAS	TAMAÑO PROMEDIO DE LAS MANCHAS GRANDES	TAMAÑO PROMEDIO DE LAS MANCHAS GEMELAS
0	75	1.2	0	1.33/.66
2.5	75	1.1	51.5	2.6/1.33
5.0	75	1.5	65.1	16.3/14.6
10.0	75	1.0	57.0	8.3/5.0

TABLA No. 5
PROMEDIO DE CELULAS QUE PRESENTARON
LA MUTACION MWH

CRUZA No. 1.

Tratamiento (Gy)	No. de Células.
0	14.0
2.5	167.0
5.0	438.0
10.0	632.0

TABLA No. 6
PROMEDIO DE CELULAS QUE PRESENTARON LAS MUTACIONES
MWH O FLP²

CRUZA No. 2

Tratamiento (Gy)	No. de Células.
0	7.3
2.5	67.7
5.0	360.5
10.0	661.5

PRONEDIO DE CELULAS QUE PRESENTARON LA MUTACION MWH O FLR²
EN LAS CRUZAS 1 Y 2

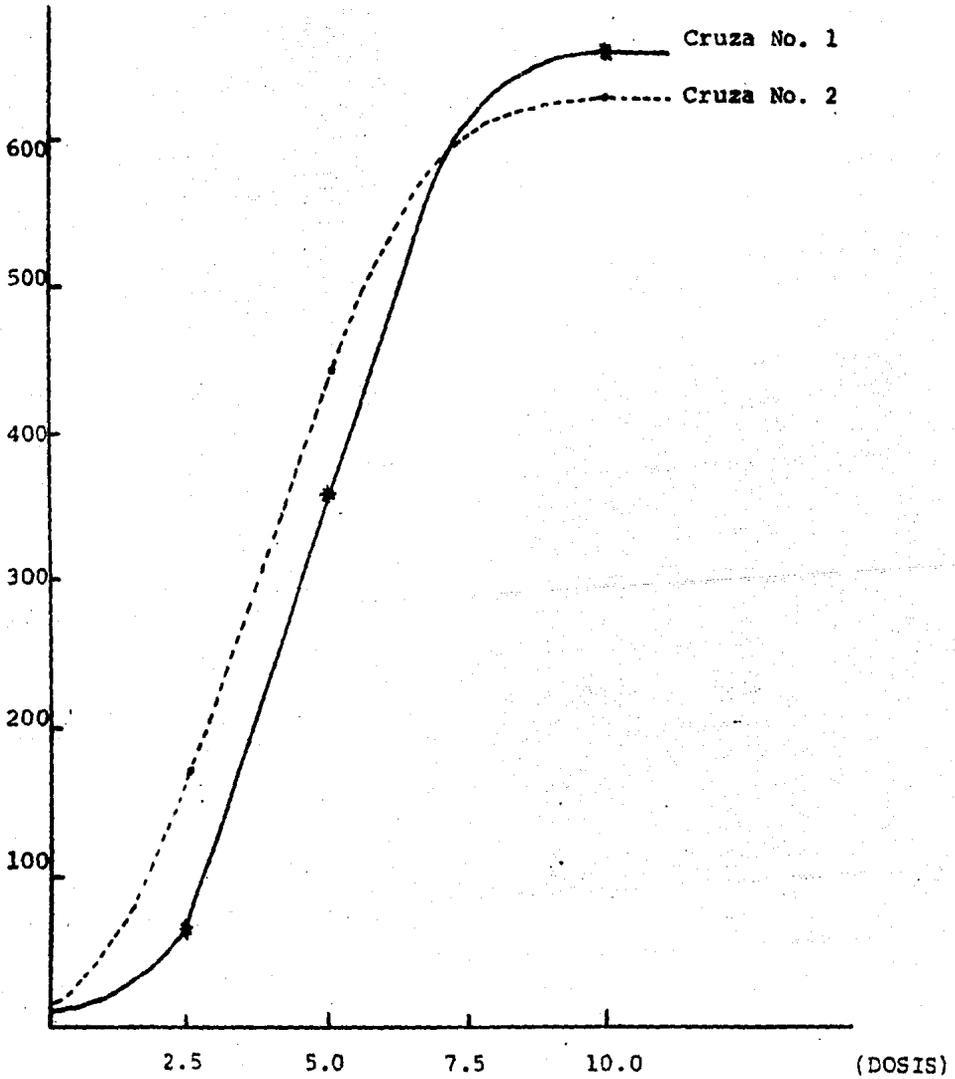


TABLA No. 7
 PORCENTAJES OBTENIDOS PARA LA DISTRIBUCION DEL TAMANO
 DE MANCHAS (Cruza No. 1)

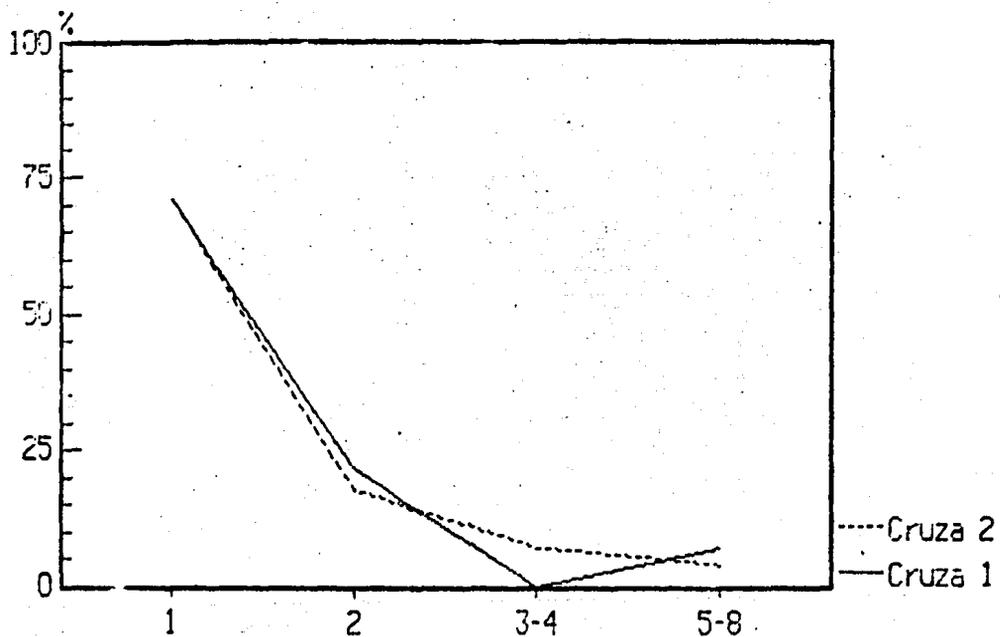
Tratamiento	Clase	Porcentaje.
Testigo	1	71
	2	18
	3-4	7
	5-8	4
2.5 Gy.	1	43.0
	2	10.0
	3-4	2.5
	5-8	2.5
	9-16	22.0
	-32	7.5
	-64	10.0
	-128	2.5
5.0 Gy.	1	45.0
	2	18.0
	3-4	3.0
	5-8	1.5
	9-16	7.5
	-32	6.0
	-64	7.5
	-128	6.0
	-256	4.5
	10.0 Gy.	1
2		9.8
3-4		2.4
5-8		8.5
9-16		9.8
-32		12.0
-64		6.0
-128		8.9
-256		3.6

TABLA No. 8
 PORCENTAJES OBTENIDOS PARA LA DISTRIBUCION DEL TAMAÑO
 DE LAS MANCHAS (Cruza No. 2)

Tratamiento	Clase	Porcentaje.
testigo	1	71.0
	2	22.0
	3-4	0.0
	5-8	7.0
2.5 Gy.	1	78.3
	2	13.5
	3-4	0.0
	5-8	2.7
	9-16	0.0
	-32	0.0
	-64	0.0
-128	5.5	
5.0 Gy	1	25.0
	2	25.0
	3-4	3.0
	5-8	3.0
	9-16	12.5
	-32	9.4
	-64	12.5
-128	6.6	
10.0 Gy.	1	39.2
	2	5.8
	3-4	1.9
	5-8	3.9
	9-16	11.7
	-32	5.8
	-64	17.6
	-128	9.8
-256	4.3	

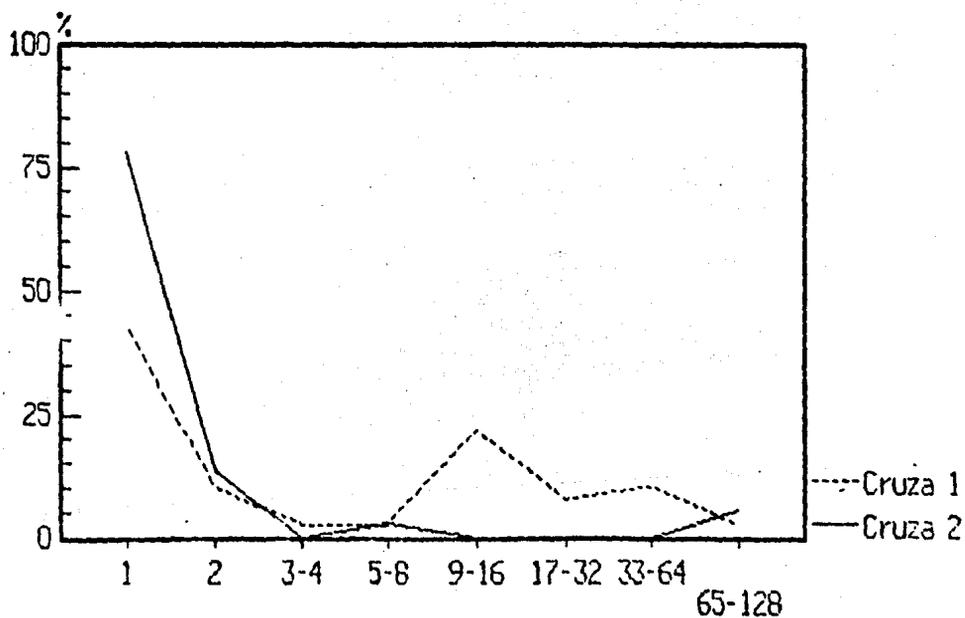
GRAFICA No.2 DISTRIBUCION DEL TAMAÑO DE LAS MANCHAS

TESTIGO



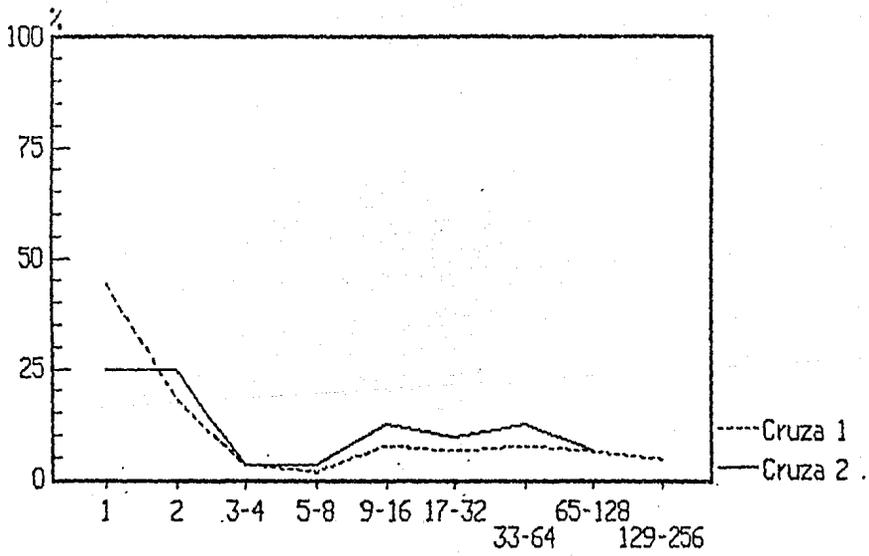
GRAFICA No.3 DISTRIBUCION DEL TAMANO DE LAS MANCHAS.

2.5 Gy.

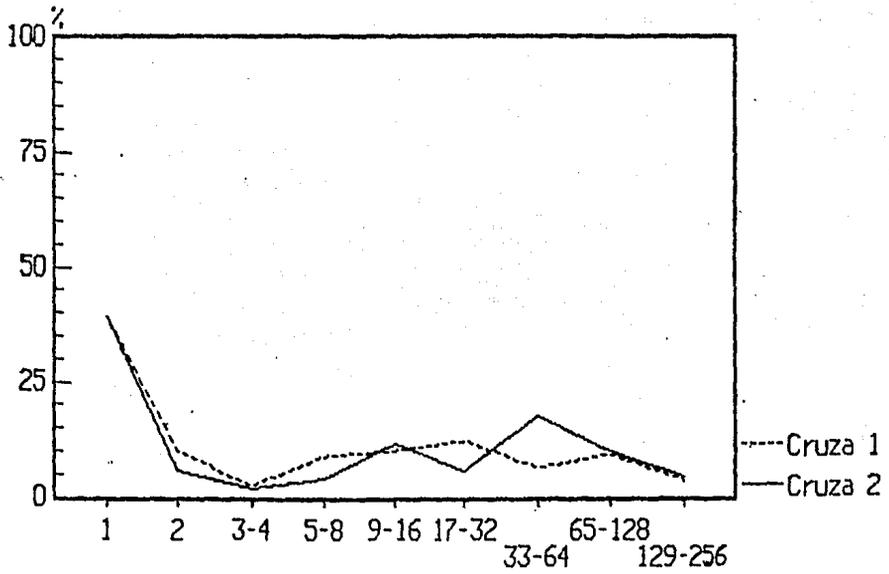


GRAFICA No. 4 DISTRIBUCION DEL TAMAÑO DE LAS MANCHAS.

5.0 Gy.



GRAFICA No. 5 DISTRIBUCION DEL TAMANO DE LAS MANCHAS
10.0 Gy.



DISCUSION Y CONCLUSIONES

El ensayo de la mancha en el ala, consiste esencialmente en exponer poblaciones celulares a un mutágeno. Estas poblaciones están destinadas a dividirse en una configuración determinada, de tal manera que si se induce una mutación en una de las células expuestas, ésta dará lugar a una mancha fácilmente identificable en la cutícula de la mosca adulta (Graf, *et al.*, 1984). En este experimento se utilizó el ensayo de la mancha en el ala. Se expusieron las células de los discos imagales que darán origen a las alas de la mosca adulta, a diferentes dosis de rayos gamma.

Para realizar este ensayo, se utilizaron los marcadores *mwh* y *flr*², que producen cerdas deformadas en las células que los portan (Lindsley, 1968).

La diferencia entre las dos cruzas que se utilizaron para realizar esta investigación reside en el hecho de que la craza No. 1 sólo presenta el marcador *mwh*, por lo tanto permite detectar únicamente manchas sencillas; con esta craza sin embargo, se pueden detectar mutaciones somáticas y recombinación en el ojo utilizando los marcadores *w* (blanco) y *se* (sepia).

Sin embargo, cuando se realizó este experimento no se pudieron detectar las manchas en el ojo, esto fue debido tal vez al hecho de que la inducción de las manchas en el ojo y en el ala, se producen en etapas diferentes del desarrollo de la larva (Wügler, *et al.*, 1986).

Szabad, *et al.*, en 1983, reportaron la dificultad para detectar las manchas en el ojo, sobre todo las chicas debido a que cada omatidia contiene numerosas

células pigmentosas, algunas de estas están divididas por omatidias adyacentes, y los bordes de las células y las omatidias coinciden muy raramente; por esta razón las manchas inducidas en el ojo (sobre todo las de 1 ó 2 células) son más difíciles de observar que las de las alas.

Los mecanismos genéticos involucrados en el ensayo, están esquematizados en las figuras 2 y 3. La recombinación entre cromosomas homólogos, tiene consecuencias comparables a las del entrecruzamiento en células germinales (Sankaranarayanan, 1982). En el ensayo del ala, la recombinación en la región del cromosoma entre *mwh* y *fir*³, da como resultado la homocigocidad del marcador más distal y da origen a manchas simples *mwh* (Wugler, *et al.*, 1985). La recombinación entre *fir*³ y el centrómero, conduce a manchas gemelas como resultado de la proliferación de dos células hijas, una homóciga para *fir*³ y la otra para *mwh* (Graf, *et al.*, 1984).

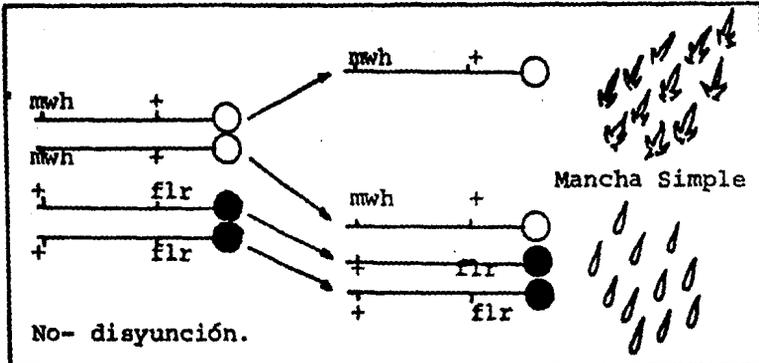
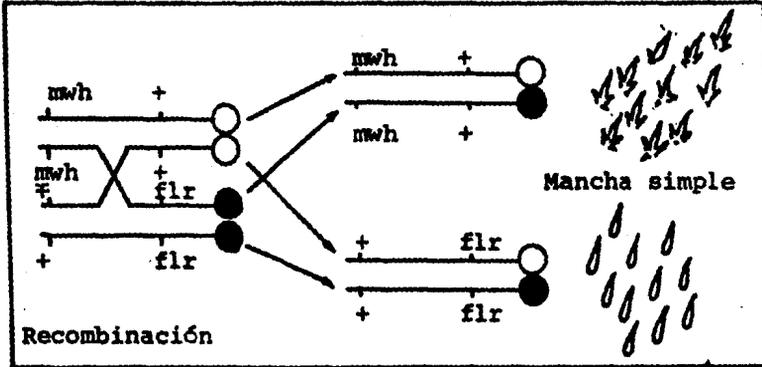
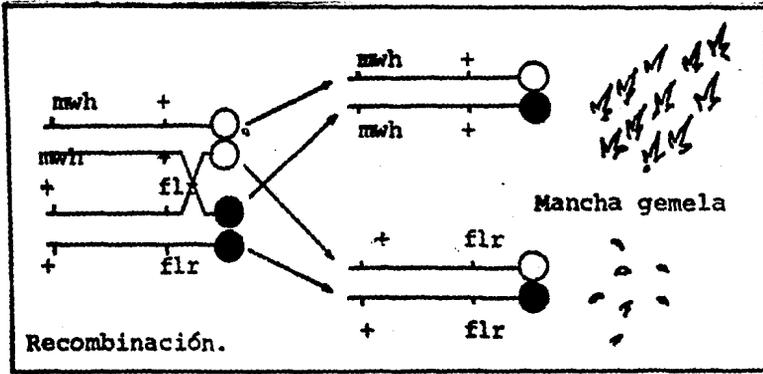
Una mutación génica en el "locus" marcado, podría dar como resultado una mancha simple. Las manchas gemelas pueden originarse, teóricamente, si ocurren dos mutaciones génicas simultáneamente en los dos alelos usados en el sistema (Wugler y Vogel, 1986). Haendel en 1971, utilizando el ensayo del ojo demostró que la frecuencia espontánea de esas dobles mutaciones, es cerca de 10,000 veces más pequeña que las originadas por recombinación. De esta manera las mutaciones génicas se consideran irrelevantes como inductoras de manchas gemelas.

En las células somáticas las radiaciones y otros agentes mutagénicos, pueden originar cambios de diversos tipos, que pueden afectar unos pocos nucleótidos hasta lesiones muy grandes. En el caso del ensayo del ala, el marcador *mwh* puede hacerse evidente por una lesión terminal (Wugler y Vogel, 1986).

FIGURA No. 3

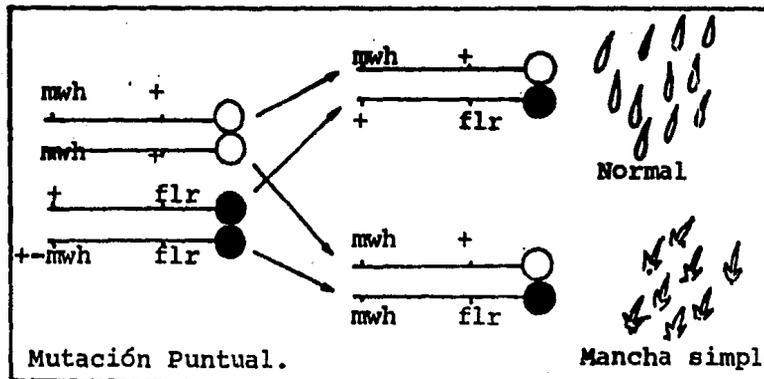
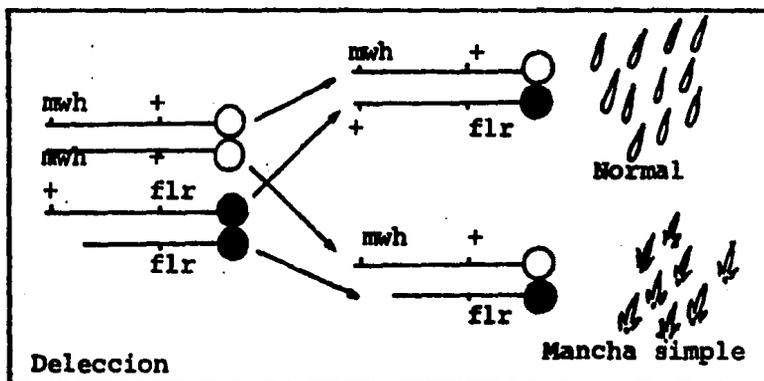
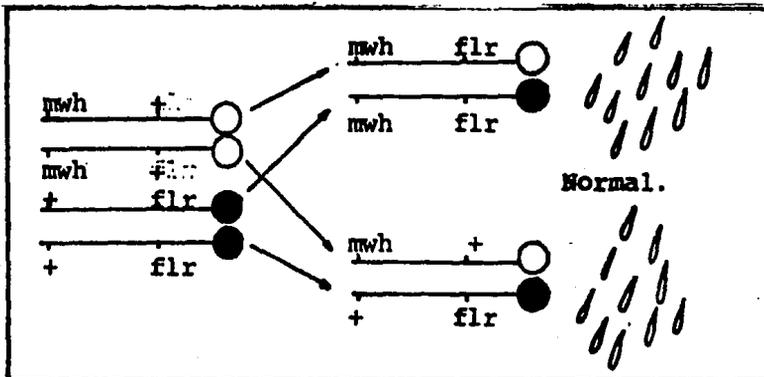
MECANISMOS GENETICOS INVOLUCRADOS EN LA FORMACION DE LAS MANCHAS.

1 Célula Mitosis 2 Células Resultado.



MECANISMOS GENETICOS INVOLUCRADOS EN LA FORMACION DE LAS MANCHAS.

1 Célula Mitosis 2 Células Resultado.



La conversión génica permanece como una posibilidad teórica para la formación de manchas simples, pero no se cuenta con la evidencia necesaria para apoyar esta hipótesis (Wüglar, et al, 1985). Sin embargo se ha demostrado que la conversión génica es un fenómeno que ocurre en la línea germinal de D. melanogaster. (Finnerty, 1976).

Un error en la segregación de los autosomas, como consecuencia de la no disyunción, conduce a la formación de dos células hijas, una trisómica y la otra monosómica para el autosome involucrado; en este ensayo sólo la línea monosómica puede expresar fenotípicamente el marcador que porta y da lugar a una mancha simple (Vogel, 1985a). Una mancha gemela, puede ser formada si la línea monosómica persiste y en la línea trisómica los dos cromosomas no disyuncionales se mantiene juntos en la siguiente división celular. Otra posibilidad para originar una mancha gemela es que ocurra una no disyunción doble, de tal manera que una célula hereda los dos cromosomas *flr* y la otra los dos cromosomas que llevan el marcador *mwh*. Sin embargo las no disyunciones dobles ocurren muy raramente.

La pérdida de cromosomas, puede dar como resultado una mancha simple. El daño al uso acromático producido por la radiación, es una de las principales causas de la no disyunción. (Sankaranarayanan y Sobels, 1975).

Se mencionó antes que en la cruce No. 1 sólo se pudieron observar manchas simples, y éstas fueron divididas en chicas (aquellas que tenían una ó dos células) y manchas grandes (de más de 3 células). En la cruce No. 2 se pudieron observar manchas simples y manchas gemelas. En los tres experimentos que se realizaron con esta cruce, las manchas más frecuentes fueron las manchas simples *mwh*, seguidas por las manchas gemelas; las manchas menos

frecuentes fueron las manchas simples fir^3 . Esta frecuencia en la aparición de las manchas, concuerda con lo reportado por Graf, et al., en 1984.

La baja viabilidad de las manchas simples fir^3 puede ser debida al mismo efecto letal que conduce a la muerte de los organismos que los portan en forma homóciga (Szabad, et al., 1983). Una muy rara doble recombinación, una entre mwh y fir^3 la otra entre fir^3 y el centrómero, da como resultado una mancha simple fir^3 (Wügler, et al., 1985).

En 1984 Graf, et al., reportaron los resultados obtenidos para el número de manchas chicas por ala, en diferentes experimentos para el grupo testigo. El valor más bajo fué de 0.04 y el más alto de 0.37 obteniéndose un promedio de 0.33. En esta investigación se obtuvo un valor promedio de 0.33 para la crusa No. 1 y de 0.17 para la crusa No. 2.

La crusa $mwh-fir^3$ presenta la ventaja de producir valores basales más bajos que otras cruas (Wügler y Vogel, 1986). En esta investigación la crusa No. 2 presentó valores basales más bajos que la crusa No. 1.

El marcador fir se puede presentar en tres alelos: fir , fir^2 y fir^3 (Lindsley, 1968). Szabad, et al., en 1983 trabajando con el alelo fir , encontró que éste no se expresa en manchas más pequeñas de 4 células. El alelo fir^3 es más útil porque permite la detección de manchas de una y dos células (García-Bellido y Dapena, 1974).

En el experimento No. 1 observamos que la dosis de 2.5 Gy, no indujo un número significativo de manchas chicas, cuando se le comparó con el grupo testigo y las dosis de 5.0 y 10.0 sí.

En la cruz 2 la dosis menor indujo un número significativo de manchas chicas ($p < 0.001$), mientras que las dosis de 5.0 y 10.0 Gy no elevaron este número significativamente.

Para tratar de explicar el comportamiento de las manchas chicas, es necesario revisar brevemente los efectos de la radiación sobre la división celular.

De acuerdo con la ley postulada por Tribondeau y Bergonie en 1903 (citado por Arena: 1971), las células que presentan una actividad reproductiva más alta, son más radiosensibles. Cuando las células que se están reproduciendo son irradiadas, se puede observar algunos de los siguientes efectos:

- 1) La célula muere durante la irradiación.
- 2) La muerte de la célula ocurre algún tiempo después de la irradiación, cuando se han llevado a cabo una ó dos divisiones celulares.
- 3) La célula sobrevive pero la mitosis se inhibe permanentemente.
- 4) La célula sobrevive y se divide, pero la primera mitosis o las mitosis posteriores a la irradiación se retrasan (Arena, 1971).

La muerte celular es un evento regular en el desarrollo de los discos imagales: ha sido detectada en algunos mutantes de Drosophila y aún en el tipo silvestre (Haynie y Bryant, 1976). A determinadas concentraciones algunos genotóxicos pueden actuar preferentemente sobre las células que se están dividiendo en el disco imagal.

Es un hecho que la radiación produce la muerte de una parte del disco imagal. Haynie y Bryant en 1977 encontraron evidencia directa de la muerte de los discos imagales inducida en D. melanogaster por rayos X; sin

embargo ya que el disco imagal va a dar origen a una estructura de la mosca adulta y ésta no puede quedar inconclusa, las células que sobreviven en el disco, deben restaurar el número total de células.

En el experimento No. 1, la dosis menor, no incrementó el número de manchas chicas, pero indujo un número altamente significativo de manchas grandes. Graf, et al., en 1984 reportaron un mínimo de 0 manchas grandes por ala para el grupo testigo y un máximo de 0.05 para dar un promedio de 0.02; en esta investigación se obtuvo un promedio de 0.04 para la cruce No. 1 y de 0.0 para la cruce No. 2.

En el experimento No. 1 la radiación pudo haber originado un porcentaje considerable de muerte celular en algunas células, además de inducir mutaciones en algunas otras. Las células que sobrevivieron, (aún las que presentaban por ejemplo aberraciones cromosómicas) tuvieron que suplir el daño y de esta manera se incrementó el número de manchas grandes.

Para las dosis de 5.0 y 10.0 Gy, se incrementó tanto el número de manchas chicas como el de grandes, estas últimas con frecuencias significativas. Las manchas chicas pudieron ser originadas porque la radiación causó una mutación en la célula pero el daño produjo la muerte de la célula después de una división celular, lo que daría lugar a una mancha chica de dos células, ó bien que una de las células hijas, sobreviva pero la mitosis se inhiba permanentemente y la otra célula hija muera, dando como resultado una mancha chica de una sola célula.

Frei y Wüglar en 1988, han sugerido que las manchas chicas sean consideradas separadamente; las dos últimas divisiones celulares tienen lugar en la pupa, cuando

los individuos ya no ingieren alimento. En los tratamientos crónicos con sustancias químicas, este hecho es muy útil para distinguir las manchas inducidas en la pupa (las chicas) de las inducidas cuando la larva estuvo expuesta. Por otra parte es muy probable que las deficiencias genéticas debidas a aberraciones cromosómicas, las cuales ponen de manifiesto la mutación *mwh*, conducen en la mayoría de los casos a manchas chicas (Haynie y Bryant, 1977; Graf, *et al.*, 1984). Independientemente del tiempo de su iniciación esas manchas permanecen chicas.

En el experimento No. 2 la dosis de 2.5 Gy indujo un número altamente significativo de manchas chicas, no así las dosis de 5.0 y 10.0 Gy; este resultado no concuerda con lo esperado y se sugiere repetir esta dosis. En este experimento las dosis de 5.0 y 10.0 Gy indujeron un número altamente significativo de manchas grandes, debido a que también produjeron un alto porcentaje de muerte celular.

Si observamos las tablas 3 y 4, notaremos que en ambas cruzas el tamaño promedio de las manchas chicas no difiere en forma significativa entre el testigo y los grupos tratados. Este resultado ya se esperaba, ya que en las manchas chicas sólo se incluyeron las que tenían 1 ó 2 células, y el tamaño promedio de las manchas se hubiera incrementado si el número de las manchas de 2 células se hubiese elevado significativamente en las dosis más altas, pero esto no ocurrió.

Con respecto a las manchas grandes, en la cruz No. 1 el tamaño de la mancha se incrementó en relación directa con la dosis de radiación. En la cruz No. 2 para las dosis de 2.5 y 5.0 Gy también se observó un incremento en el tamaño promedio; sin embargo tanto para las manchas grandes como las gemelas la dosis de 5.0 Gy indujo manchas más grandes que las de 10.0 Gy. Esto pudo ser el resultado

del retardo en la división celular producido para las dosis de 10.0 Gy, que aún cuando produjo el mayor número de manchas grandes y gemelas, afectó la capacidad reproductiva, y las manchas inducidas por 5.0 Gy, aún cuando fueron menos numerosas, se reprodujeron más activamente porque presentaban un daño menor.

En cuanto al tamaño de la mancha, Patterson en 1929, postuló que el tamaño de ésta depende principalmente de la edad de la larva en el momento de la irradiación, más que de la dosis; de esta manera, las larvas irradiadas en una etapa temprana del desarrollo, producirían manchas grandes porque sus células se dividirían muchas veces, y las mutaciones causadas en las etapas finales del desarrollo de la larva dan lugar a manchas chicas porque les restan unas pocas divisiones celulares.

Los huevos se colectaron solamente durante una hora con la finalidad de homogenizar al máximo la edad de las larvas; considerando lo anterior, y si las larvas tenían más o menos la misma edad, en el momento de la irradiación, las dosis utilizadas fueron decisivas para la inducción del tamaño de la mancha.

Shweizer en 1972 (citado por Wüglér y Vogel en 1986) encontró que existe una relación directa entre el tamaño de las manchas originadas en los discos imagales de D. melanogaster y los rayos X como inductores de muerte celular. El aumento en el tamaño de la mancha indica que en la restitución del número celular, están involucradas todas las células que sobrevivieron en el disco, tanto las normales como las que han sufrido alguna mutación.

La restitución del número celular está acompañado de una regulación del patrón normal de determinación (Wüglér y Vogel, 1986).

La tasa de división celular durante el crecimiento extra, no debe de incrementarse notablemente, puesto que originaría un retraso en la pupación de los individuos irradiados. En este experimento los adultos emergieron al octavo día después de la irradiación, lo que indica que no se retrasó el desarrollo de los individuos.

Después de la irradiación, no se registraron adultos con estructuras alteradas (ojos ó alas). El fenómeno más común fué la muerte de las larvas. Después de la irradiación con 10.0 Gy, murieron aproximadamente el 50% de las larvas. Esta dosis corresponde a la LD 50 reportado por Arena en 1971 para las larvas de Drosophila melanogaster.

En cuanto a las manchas gemelas inducidas en la cruz No.2, ninguna de las dosis indujo un número de esta manchas significativamente más alta que el grupo testigo; sin embargo, el tamaño de la mancha, se incrementó proporcionalmente con la exposición a la radiación.

El hecho de que ninguna de las dosis haya incrementado significativamente el número de manchas gemelas, no indica que no haya ocurrido recombinación, ya que este evento se presenta en Drosophila después de la irradiación con rayos X ó gamma (Beker, 1976). Bajo las condiciones de este experimento, no se obtuvo un número significativo de manchas gemelas. La frecuencia de recombinación somática inducida en el brazo izquierdo del cromosoma 3, depende de la edad de la larva. Esta frecuencia se incrementa de 1 en 500 células en larvas del segundo estadio a 1 en 250 en las del tercer estadio (García-Bellido y Merriam, 1971). No se sabe aún si esto está relacionado con cambios regulares en la sensibilidad dentro del ciclo celular. En este experimento se irradió a las larvas cuando éstas estaban en el segundo estadio.

Por otra parte tenemos que considerar que las manchas gemelas no son el único indicador de que haya ocurrido recombinación, ya que la recombinación entre los marcadores *mwh* y *flr*³ conduce a la formación de manchas simples, las cuales no se pueden distinguir de las que fueron originadas por eventos no recombinacionales.

En la cruce No. 2 se descartaron a las alas que presentaban el marcador *serraticornis*, el cual está asociado con el balanceador *TM3*, (Lindsley, 1968). Al analizar estas alas se pueden observar manchas simples originadas por eventos no recombinacionales, ya que la recombinación entre *mwh* y *TM3*, produce células no viables. (Szabad, *et al.*, 1983).

Otra razón para no detectar manchas gemelas, es que haya ocurrido selección en contra de una de las líneas celulares en una mancha gemela, dando como resultado la extinción de esa línea y la proliferación de la otra, lo que daría lugar a una mancha simple.

Se mencionó anteriormente que las células *flr*³ presentan una muy baja viabilidad, por lo que es muy probable que en una mancha gemela, esas células murieran dando como resultado la proliferación de las manchas *mwh*. Esta baja viabilidad la podemos observar en la tabla No.4 en la que en ninguna de las dosis, las manchas *flr*³, fueron mayores que las *mwh*, además de que las manchas simples *flr*³, fueron las menos frecuentes en el experimento No.2.

Para realizar este experimento, se utilizaron tanto las alas de los machos como las de las hembras. Gatti en 1971, demostró que las larvas de *Drosophila melanogaster* de diferente sexo pueden diferir en su sensibilidad a diferentes mutágenos y reportó que el MMS, produce tres veces más aberraciones cromosómicas en el ganglio neural de

las hembras en los machos.

De todos los compuestos que se han probado hasta la fecha en el ensayo del ala, se ha podido concluir que no existen diferencias en la inducción de las manchas de las hembras y los machos. Por otra parte Beker en 1976, demostró que la inducción de recombinación mitótica en el brazo izquierdo del cromosoma 3 de Drosophila no difiere entre hembras y machos.

En la gráfica No. 1 podemos observar que el comportamiento de las dos cruzas con respecto al número de células que presentaron la mutación mwh ó flr^2 , fué muy semejante. Para la parte de la curva entre 0 y 2.5 Gy, el resultado es inconcluso y debe ser complementado con más datos. Entre las dosis de 2.5 y 5.0 Gy, la gráfica se comporta como una recta, lo que nos indica que el número de células que sufrieron una mutación está en relación directa con la dosis. En ambas cruzas llega un momento en que el número de células alcanza un máximo y luego tiende a mantenerse constante, esto ocurre a la dosis de 10.0 Gy, la cuál corresponde a la LD 50.

Las gráficas de la distribución del tamaño de las manchas, nos indican que las dosis más altas originan manchas más grandes, como ya se había puesto de manifiesto.

De los resultados obtenidos con esta investigación podemos concluir que se logró el objetivo, habiéndose observado que los rayos gamma inducen mutaciones somáticas y recombinación en las células del ala de Drosophila melanogaster.

La cruz a No. 1 presentó una mayor sensibilidad que la cruz a No. 2, aunque con ésta no se pueda discriminar las mutaciones somáticas de la recombinación, ya que no se

obtuvieron manchas gemelas.

El estudio de las mutaciones somáticas ha cobrado gran interés por su posible relación con la carcinogénesis (Purchase, 1982; Wügler, 1983), así como los ensayos que son capaces de detectar la actividad recombinogénica de los agentes.

Los estudios comparativos entre la inducción de daño genético en células germinales y en células somáticas han puesto de manifiesto que estas últimas son más sensibles (Vogel, 1984; Vogel y Zijlastra, 1987). Este hecho debe ser considerado en estudios posteriores (Vogel, 1987).

Se recomienda complementar los resultados obtenidos en esta investigación con dosis más bajas para determinar el comportamiento de la curva de radiosensibilidad.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Arena, V. 1971. Ionizing Radiation and life. The C.V. Mosby Company. Saint-Louis.
- 2) Beker, H.J. 1976. Mitotic Recombination in Genetic and Biology of Drosophila. (M. Ashburner and E. Novitski, Eds.) pp. 1020-1087. Academic Press. New York.
- 3) Brusik, D. 1985. Developmental status of bioassays in Genetic Toxicology. Mut. Res. 53 pp. 1-10.
- 4) Cassida, J.E. 1969. Insects Microsomes and Insecticide in Microsomes and Drugs Oxidations. pp. 517-531. Academic Press. New York.
- 5) Evans, H.J. 1971. Molecular Mechanisms in the Induction of Chromosome Aberrations in Drosophila. Progress in Genetic Toxicology. Elsevier North-Holland Biomedical pp. 57-74.
- 6) Finnerty, V. 1971. Gene Conversion in Drosophila, in the Genetics and Biology of Drosophila (M. Ashburner, and E. Novitski, Eds.) pp. 331-349. Academic Press. New York.
- 7) Frei, H. and Wüglar, F. 1988. Statistical Methods to decide wether mutagenicity test data from Drosophila assays indicate a positive, negative or inconclusive result. In press.
- 8) Fujikawa, K. Inagaki, E. and Uchibori, E. Comparative Induction of Somatic eye color mutations and Sex-Linked Recessive Lethals in Drosophila melanogaster by tryptophan pyrrolisates. Mut Res. 122 pp. 117-130.
- 9) García-Bellido, A. and Dapena, J. 1971.. Induction,

Detection, and Characterization of cell differentiation mutants in Drosophila. Mol. Gen. Genet. 128. pp. 117-130.

- 10) García-Bellido, A. and Merriam, J. 1971. Parameters of the wing imaginal disc development of Drosophila melanogaster. Dev. Biol. 26 pp. 265-274.
- 11) Gatti, M. 1971. Chemical induction of Chromosome Aberrations in Somatic Cells of Drosophila melanogaster. Mut Res. 33 pp. 201-212.
- 12) Goodenough, 1981. Genética. Ed. Omega. Barcelona, España.
- 13) Graf, U. Wüglar, F. Katz, A.J. Frei, H. Juon, H. Hall, C. and Kale, P. 1984. Somatic Mutation and Recombination Test in Drosophila melanogaster. Environmental Mutagenesis 6 pp. 153-159.
- 14) Graf, U. 1984. Drosophila as a Model for Genetic Toxicology In Immunology and Hematology Research. Monograph No. 3 pp. 203-206.
- 15) Green, S. and Auletta, A. 1980. Editorial Introductions to the Reports of the Gen. Tox. Program. An evaluation of bioassays in genetic toxicology. Mut. Res. pp. 165-168.
- 16) Guidelines on the use of Mutagenicity tests in the toxicological evaluation of Chemicals. 1986. A report of the DNH & W DOE Environmental Contaminants Advisory on Mutagenesis. Ottawa, Canada.
- 17) Hallstrom, J. and Magnuson, J. 1982. Relation Between the Somatic toxicity of methylnitrosamine and a genetically determined variation in the level and

- induction of cytochrome P-450 in Drosophila. Mut. Res. 92. pp. 161-168.
- 18) Hendel, J. 1971. Roentgeninduziert mitotische rekombination bei Drosophila melanogaster. Mol. Gen Genet. 113 pp. 114-131.
- 19) Hariharan, P. Rensen, J. and Cerutti, P.A. 1975. Excision repair of gamma-ray damaged thymine in bacterial and mammalian systems. Molecular Mechanisms of DNA repair. Plenum New York.
- 20) Hayne, J. and Bryant, P. 1976. Intercalary regeneration in imaginal wing disc of Drosophila melanogaster. Wilhelm Roux Arch. 183 pp. 88-100.
- 21) Hayne, J. and Bryant, P. 1977. The effects of X-rays on the proliferation dynamics in the imaginal wing disc of Drosophila melanogaster. Wilhelm Roux Arch. 183 pp. 88-100.
- 22) Kedar, N. 1984. Handbook of Radiobiology. CRC Press. In J. Boca Florida.
- 23) Lindsley, D. L. 1968. Genetic variations of Drosophila melanogaster. Carnegie Inst. Wash. Publ.
- 24) Lee, W. R. Abrahamson, S. Valencia, E. Wügler, F. and Zimmering, S. The sex linked recessive lethal for mutagenesis in D. melanogaster. Mut. Res. 123 pp. 183-270.
- 25) Morales, P. Vallarino, T. and Rodriguez R. 1988. Occurrence in Vivo of sister chromatid exchanges at the same locus in successive cells division caused by nonreparable lesions induced by Gamma rays. Environmental

and Molecular Mutagenesis. 11. 183 pp. 183-193.

- 26) Ostertag, 1963. The genetic basis of somatic damage produced by radiation in third instar larvae of Drosophila melanogaster. Z. indukt. Abstamm. Vererblehre. 94 pp. 143-182.
- 27) Patterson, J.T. 1929. The production of mutation in somatic cells of Drosophila melanogaster by means of X-rays J. Exp. Zool. 53. pp. 327-372.
- 28) Purchase, I. F. H. 1982. An appraisal of predictive tests for carcinogenicity. Mut. Res. 53 pp. 53-71.
- 29) Sankaranarayanan, K. and Sobels F. H. 1975. Radiation Genetics. In Genetics and Biology of Drosophila (Ashburner and Novitski Eds). Academic Press. New York.
- 30) Sankaranarayanan, K. 1982. Genetic Effects of Ionizing Radiation in multicellular eukaryotes and the assessment of genetic radiation hazards in man. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam.
- 31) Sobels, H. and Vogel, W. 1976. Assaying potential carcinogenesis with Drosophila. Environmental Health Perspectives. 15. pp. 41-46.
- 32) Szabad, J. Soós, I. Polgár, G. and Hójjá, G. 1983. Testing the mutagenicity of malondialdehyde by the Drosophila mosaic and the sex-linked recessive lethal test. Mut. Res. 113. pp. 117-133.
- 33) Vogel, W. 1984. A comparison of genetic activity in somatic tissue and in germ cells of Drosophila melanogaster. Mutation Cancer and Malformation Research.

- 34) Vogel, W. 1985a. Summary Report on the performance of the Drosophila assays. Progress in Mutation Research. 5. pp. 47-57.
- 35) Vogel, W. 1985b. The Drosophila Somatic Recombination and Mutation Assay (SRMD) using the white-coral eye system. Progress in Mutation Research. 5. pp. 313-317.
- 36) Vogel, W. and Zijlastra, J.A. 1987 Somatic Cell Mutagenicity in Drosophila melanogaster in comparison with genetic damage in early germ-cell stages. Mut. Res. 180. pp. 189-200.
- 37) Vogel, W. 1987. Discussion Forum. Evaluation of potential mammalian genotoxins using Drosophila. The need for a change in test strategy. Mutagenesis. 2. pp 161-167.
- 38) Wügler, F. 1980. Mutagenicity testing with Drosophila. Arch. Toxicol. 45. pp. 77-87.
- 39) Wügler, F. 1983. The sex-linked recessive lethal assay with Drosophila melanogaster. Trends in Pharmacological Sciences. 4. pp. 492-494.
- 40) Wügler, F. Graf, U. Frei, H. and Juon, H. 1983. Genotoxic activity of the anti-cancer drug methotrexate in somatic cells of Drosophila melanogaster. Mut Res. 122. 321-328.
- 41) Wügler, F. Sobels, F. and Vogel, E. 1984. Drosophila as an assay system for detecting changes. Handbook of mutagenicity test procedures. Elsevier Science Publishers.
- 42) Wügler, F. Graf, U. and Frei, H. 1985. Somatic Mutation

and recombination test in wings of Drosophila melanogaster. Progress in Mutation Research. 5 pp. 328-340.

- 43) Wügler, F. and Ramel, C. 1986. Assays for genetic activity in Drosophila melanogaster. Long term and short term assays for carcinogenesis. Reports of an ad-hoc working group. Lyon .
- 44) Wügler, F. 1986. Mutagenicity assays detecting recombination. Genetic Toxicology of Environmental Chemicals. Genetic Effects and Applied Mutagenesis. pp.85-90.
- 45) Wügler, F. and Vogel, E. 1986. In vivo mutagenicity testing using somatic cells of Drosophila melanogaster. Chemical Mutagen. 10. pp. 1-70.

APENDICE 1

SOLUCION DE FAURE

Goma arábica	30 g.
Glicerol	20 ml.
Hidrato de cloral	50 g.
Agua Destilada	285 ml.

