

44
20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

Facultad de Ciencias

DAÑO GENETICO INDUCIDO POR MUTAGENOS POSITIVOS
EN CELULAS DEL ALA DE Drosophila melanogaster.

T E S I S
Que para obtener el Título de
B I O L O G O
p r e s e n t a
ALFREDO DELGADO RODRIGUEZ

Asesor: M en C. PATRICIA RAMOS M.

México, D. F.

FALLA DE ORIGEN

1990



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

RESUMEN	ii
I. INTRODUCCION	1
II. MATERIAL Y METODO	17
III. RESULTADOS	24
IV. DISCUSION	27
V. CONCLUSIONES	36
VI. REFERENCIAS	37
Figuras	46
Tablas	72

RESUMEN

Con el propósito de calibrar el bioensayo que detecta actividad mutagénica y recombinogénica en células somáticas Drosophila melanogaster se realizaron diversos experimentos empleando los mutágenos de referencia N-Nitrosodimetilamina (DMN), N-Nitrosodietilamina, Metilmetanosulfonato (MMS), Beta propiolactona (β -PL) y Azida de Sodio. La inducción de mutaciones puntuales, deleciones, no disyunción o recombinación mitótica se evaluó en las células del ala. Para ello se alimentaron durante 6 hrs larvas de 72 ± 4 hrs. de edad, con los compuestos de referencia durante 6 hrs. Los marcadores empleados están localizados en el brazo derecho del cromosoma tres y son "multiple wing hair" (mwh) y "flare" (flr³). Se emplearon diversas concentraciones de cada agente. Los resultados se valoraron mediante la prueba de " χ^2 " para proporciones y con el programa de cómputo SMART-Würgler y Frei ($P < 0.05$). La inducción de mutación puntual, deleción o no disyunción se detecta en la superficie del ala como una mancha simple (mwh o flr); mientras que la inducción de recombinación mitótica entre flr³ y el centrómero, se denota como una mancha doble (mwh/flr). De los carcinógenos que requieren activación metabólica, el DMN indujo tanto manchas sencillas como dobles en todas las concentraciones utilizadas mostrando una clara relación dosis-respuesta, mientras que el DEN produjo respuesta significativa en las dos concentraciones más altas. Los carcinógenos de acción directa son MMS y β -PL. El MMS indujo alteraciones genéticas en todas las concentraciones, pero su actividad recombinogénica fue positiva únicamente en las dos más altas. La β -PL mostró respuesta inconcluyente para recombinación y positiva sólo para manchas simples grandes. El promutágeno Azida de Sodio no mostro un efecto definido. El orden de respuesta de éstos agentes en SMART es DMN>MMS>DEN> β -PL>Azida de Sodio.

INTRODUCCION

En la actualidad la sociedad depende para su desarrollo de una gran cantidad de compuestos químicos, los cuales tienen un papel importante en la producción de bienes y servicios. Se emplean en la conservación de alimentos enlatados, en las ciencias de la salud, en el hogar, etcétera. Aunque algunos de éstos compuestos son de origen natural, un gran porcentaje ha sido sintetizado en laboratorios, por lo que actualmente el hombre está expuesto a sustancias a las que nunca antes lo había estado. Así, muchas de estas, además de ser benéficas, pueden originar problemas de salud, tanto por los efectos provocados en el ambiente en general, como por la exposición a que está sujeto el hombre en su ambiente de trabajo (Sorsa et al., 1982). Esta exposición a sustancias tóxicas se incrementa día a día, debido al aumento en cantidad y variedad de las mismas.

Se conocen más de seis millones de compuestos químicos, de los cuales de 60,000 a 70,000 son de uso común y no sólo eso, sino que cada año salen al mercado numerosos compuestos tóxicos y/o mutagénicos o cancerígenos y probablemente el número aumentará en forma importante en los próximos años debido al acelerado desarrollo científico y tecnológico de nuestro siglo.

El hombre se ha preocupado por conocer los efectos

que podrían resultar de la exposición a algunas de estas sustancias, no sólo con el fin de poder curar los daños provocados, sino para prevenir y controlar la exposición, regulando el tiempo y la cantidad del agente al que se puede encontrar expuesto un individuo sin resultar dañado, mediante el empleo de medidas de seguridad adecuadas en el manejo de estos compuestos. El campo al que se hace referencia es el de la Toxicología, que de manera general se encarga del estudio de los efectos provocados por contaminantes, ya sean químicos ó físicos en los sistemas vivos, con el fin de determinar las condiciones bajo las cuales un agente químico no provocará daño; dicho de otra manera, un químico puede ser peligroso si su empleo no se realiza bajo ciertas medidas de seguridad. Para llegar a este conocimiento se hace uso de los bioensayos animales, a través de los cuales la Toxicología ha obtenido durante los últimos veinte años datos importantes en lo referente al daño ocasionado a la salud del hombre por la exposición a compuestos químicos, lo cual de otra manera sólo hubiera sido posible por la exposición accidental a estas sustancias (Casarett 1975, Brusick 1987 y 1988).

Los bioensayos se basan en el uso de organismos cuya respuesta podría ser similar a la que se presentaría en el hombre bajo condiciones parecidas de exposición (Casarett 1975 Sorsa et al. 1982, Brusick 1987). Estos bioensayos deben ser evaluados en base a su capacidad de respuesta,

de tal forma que sólo aquellos que resulten sensibles y capaces de discriminar entre los diferentes tipos de daño, son aceptados y puestos en práctica. Los modelos animales que se emplean van desde procariontes hasta sistemas complejos como los artrópodos y los mamíferos.

Ya que los efectos que una sustancia puede causar en un organismo son muy variados y a diferentes niveles, el perfil toxicológico de un compuesto debe obtenerse por la interacción de varias disciplinas como son: la Farmacocinética, la Teratología, la Inmunotoxicología, la Toxicología del Desarrollo, etc.. Cada disciplina o rama de la Toxicología cubre algún punto de interés para el hombre, siendo uno de estos campos el de la Genética Toxicológica, la cual se encarga específicamente del estudio del daño que se puede provocar en el material hereditario, ya que esto puede tener repercusiones no sólo en los individuos afectados sino también en las siguientes generaciones derivadas de los primeros, ya que al estar dañado el ADN de las células sexuales, la descendencia estaría portando cambios que de una u otra forma podrían ser deletéreos a nivel poblacional.

La Genética Toxicológica se desarrolló a partir de los estudios realizados por Müller en 1927 sobre la inducción de mutaciones génicas con radiación y desde entonces a la fecha se ha desarrollado como una disciplina, cuyo reconocimiento fue impulsado por la

formación de la Environmental Mutagen Society en 1969 bajo el auspicio de Alexander Hollander y otros investigadores interesados en determinar el impacto genético de los compuestos químicos arrojados al ambiente. Uno de los objetivos primordiales de ésta sociedad fue el de constituir un foro para los científicos involucrados de una u otra forma en la detección de mutágenos y la cuantificación del riesgo genético que estas sustancias podrían causar al hombre (Brusick 1988).

Se considera como agente genotóxico aquel que tenga la capacidad de inducir cambios heredables en el genotipo celular (Wright 1980). En la actualidad la Genética Toxicológica tiene dos enfoques principales. El primero de ellos es el estudio del impacto que una sustancia provoca en las gametas. El segundo se refiere al estudio de los efectos provocados sobre las células somáticas, así como los mecanismos que pueden estar implicados en la formación de procesos cancerosos. Cada objetivo forma un área de trabajo dentro de la Genética Toxicológica (Brusick 1987 y 1988).

Debido a las características propias de cada sistema de prueba, la evaluación del daño que un químico puede causar al material hereditario no debe basarse en los resultados obtenidos en un sólo tipo de bioensayo, lo anterior conduce al planteamiento de estrategias que involucran el empleo de distintos organismos. Así la

evaluación del riesgo genético se da por una serie de etapas y además cubriendo un amplio espectro de tipos de daño genético. La selección de los bioensayos que formarán parte del conjunto de pruebas debe de ser hecha con mucho cuidado (Würgler et al. 1984, Brusick 1987 y 1988, Vogel 1987).

El hombre puede estar expuesto a agentes químicos de forma accidental, laboral y/o voluntaria. (Sorsa et al. 1982).

Una sustancia es absorbida, distribuida y excretada por el organismo con relación a las condiciones en las que se realizó el contacto, las características fisicoquímicas de la sustancia y las propias de cada individuo, como son: edad, sexo, tipo de alimentación, forma de vida, actividad laboral, etc. (Klaassen 1975 , Sorsa et al. 1982). Las rutas de entrada de los agentes químicos pueden ser: ingestión, inhalación, absorción, contacto dérmico, vía intramuscular, intravenosa, intraperitoneal y subcutánea. Así, el daño que los agentes contaminantes pueden causar está ligado con la vía de entrada y depende del grado de absorción, metabolización y excreción, como se muestra en la figura 1 (Klaassen 1975 y Norton 1975).

Una vez que la sustancia ha penetrado al cuerpo y llega al torrente sanguíneo, la siguiente barrera que se presenta es la membrana celular, misma que será superada

por la sustancia dependiendo de las características fisicoquímicas de esta última. Esto es, solubilidad, afinidad por las proteínas, características de disociación, tamaño de la molécula y concentración, entre otras. (Casarett 1975).

Una vez que el agente se encuentra en el interior de la célula, este puede dañar directamente al ADN (agentes de acción directa) o bien, ser metabolizado y alguno(s) de sus metabolitos afectar al ADN (en éste caso se denomina agente indirecto). Los agentes indirectos pueden ser de naturaleza muy variada (Fig. 2). Los agentes directos son generalmente compuestos alquilantes y sustancias fuertemente electrofílicas (Wright 1980). La forma en que una molécula interactúa con el ADN se presenta en la Fig. 3. El tipo de daño producido depende del mecanismo por el cual la sustancia interactúa con la molécula blanco, este puede ser por sustitución de una base o bien, por la formación de aductos con el ADN llevando en ambos casos a la pérdida del marco de lectura. La intercalación de la molécula entre los pares de bases de la doble hélice impide que la replicación y la transcripción se lleven al cabo normalmente, además de originar aberraciones cromosómicas debido al rompimiento de la molécula durante la replicación en el sitio de intercalamiento (Brusick 1987).

Para la valoración del riesgo genotóxico se debe

realizar la evaluación constante de los bioensayos y de las perspectivas que presentan los protocolos en desarrollo. Esto se puede llevar a cabo con la ayuda de compuestos de referencia, agentes cuyos efectos son conocidos y que se han clasificado como mutágenos o cancerígenos. Simultáneamente es necesario que en cada experimento se disponga de testigos negativos contra los cuales se compara el efecto provocado por el agente en cuestión. Para los testigos negativos se emplean sustancias inocuas cuyo fin es someter a los organismos a la misma manipulación a la que se someten los grupos tratados (Valencia et al. 1984, Woodruff et al. 1984, Vogel 1987).

Para dar validez a los protocolos se emplean ambos tipos de testigos, tanto para conocer la frecuencia basal o espontánea de la alteración que se pretende analizar, como para la evaluación de la sensibilidad y especificidad que presenta el sistema (Brusick 1987).

Uno de los organismos que se emplea en la Genética Toxicológica es la mosca de la fruta Drosophila melanogaster o mosca del vinagre, usada durante muchos años en estudios de genética básica. Entre las ventajas de este organismo como sistema de prueba, se encuentran la de tener gran cantidad de individuos en un espacio muy pequeño y la fácil y económica elaboración del medio de cultivo, su ciclo de vida es relativamente corto (Fig. 4),

aproximadamente 10 días a 25°C± 1. El espectro de valoración de riesgo genético que puede ser detectado con el uso de este insecto es muy amplio (Abrahamson y Lewis 1971). Es un sistema eucarionte que permite verificar la presencia de daño genético in vivo en un periodo de tiempo corto. Se pueden detectar compuestos que actúan como promutágenos y/o procarcinógenos debido a que posee un complejo microsómico denominado P-450, cuya acción es muy similar a la que presenta el complejo enzimático S9 del hígado de los mamíferos. Estos complejos llevan a cabo la inactivación o activación de las sustancias extrañas que llegan a entrar al organismo (Baars et al. 1980, Clark 1982, Hällström 1987).

El uso que se ha dado a Drosophila melanogaster como organismo de bioensayo se apoya en el conocimiento de su gametogénesis (Chandley y Bateman 1962) por lo que se pueden llevar a cabo valoraciones del posible daño que un químico causa al ADN en los diferentes estadios de las células germinales (Lee et al. 1983, Valencia 1984).

En el Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la UNAM, se utiliza la prueba de Inducción de Mutaciones Letales Recesivas Ligadas al Sexo (SLRLT) y la prueba de Pérdida cromosómica y No Disyunción (SCLT). Sin embargo, en la actualidad se está analizando un novedoso sistema de prueba conocido como Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART). A continuación se analizan

cada una de éstas.

Las siglas que se utilizan para la prueba de Letales Recesivos Ligados al Sexo, SLRLT, son debidas al inglés Sex-Linked Recessive Lethal Test. Se emplea desde 1927 cuando Müller la usa con éxito para detectar el efecto mutagénico de los rayos X. Desde entonces, se han probado gran cantidad de compuestos químicos en este sistema, se considera que es la prueba más sensible de Drosophila melanogaster y está aceptada dentro de los protocolos de la Environmental Protection Agency (Environmental Mutagen Society 1976). Como se observa en la figura 5, en la que se esquematiza el sistema de cruzas, la evaluación de la inducción de letales recesivos se hace hasta la segunda o tercera generación. La cantidad de material que se requiere es considerable, así como el número de personas adiestradas. (Lee et al. 1983).

Una mutación letal recesiva ligada al sexo en Drosophila melanogaster puede ser el resultado de mutación génica, deleciones, o aberraciones cromosómicas. (Lee et al. 1983). El tamaño de muestra recomendado es de 7000 cromosomas analizados tanto en el grupo testigo como en las series tratadas (Lee et al. 1983). El total de loci estimados por Abrahamson y colaboradores es de 600-800 en el cromosoma X de Drosophila melanogaster, es decir aproximadamente una quinta parte del genoma total de la mosca (Lee et al. 1983).

La prueba de Pérdida Cromosómica y No Disyunción de Cromosomas Sexuales (SCLT por sus siglas en inglés: Sex Chromosome Loss Test), se basa en la expresión fenotípica de modificaciones heredables en los cromosomas sexuales (Valencia et al. 1984 y Zimmering et al. 1986). Esta prueba detecta: delección, mutación génica y pérdida o ganancia de cromosomas completos de los cromosomas sexuales. En la figura 6 se muestra un ejemplo del sistema de cruce empleado.

El tiempo requerido para la elaboración de esta prueba es de una generación y el tipo de cruce es masivo, es decir, varios machos tratados son cruzados con hembras vírgenes homocigóticas para mutaciones recesivas ligadas al cromosoma X en proporción de un macho por tres hembras. La forma en la que se detectan fenotípicamente los eventos mencionados anteriormente se representa en el esquema de la figura 6.

Cabe mencionar que la importancia de esta prueba estriba en la posibilidad de emplear líneas o cepas proficientes y deficientes en algunos mecanismos de reparación (Fig. 7), con lo cual se puede analizar la forma de acción de los compuestos en relación con los mismos (Valencia et al. 1984).

En la actualidad se está llevando a cabo la valoración de otra prueba en Drosophila melanogaster, con la que se determina la inducción de Mutación y

Recombinación en Células Somáticas (SMART por sus siglas en inglés, Somatic Mutation and Recombination Test) (Graf et al. 1983 y Ramos et al. 1989a).

Ya desde 1945 Auerbach y posteriormente Becker en 1957, habían detectado la aparición de mosaicos o manchas (clones) en la cutícula de los adultos cuando se expone a larvas heterocigóticas para marcadores fenotípicos a diferentes mutágenos (Auerbach 1945, Becker 1975 y 1976). Basándose en estas observaciones, Mollet y Würgler en 1974 y después Mollet y Szabad en 1978, proponen un nuevo método para la detección de probables mutágenos empleando organismos heterocigóticos para mutaciones recesivas de células somáticas. La importancia de lo anterior radica en la asociación que hay entre la actividad recombinogénica y la inducción de tumores cancerosos, de tal forma que no sólo la actividad mutagénica sino también la actividad recombinogénica de los compuestos puede estar relacionada con la incidencia de cáncer (Fahmy y Fahmy 1970 Cairns 1981, Graf et al. 1984, Würgler et al. 1984).

La formación de clones en células somáticas puede deberse a mutación, delección o recombinación (Graf et al. 1983). El tiempo necesario para la realización de esta prueba es de una generación de Drosophila melanogaster ya que cuando se obtienen las larvas se les trata con el agente químico de interés y al emerger los adultos, se analiza la presencia de manchas. En la figura 8 se muestra

un cronograma general de la metodología de esta prueba.

Las estructuras que se emplean en la detección de este tipo de daño son los discos imagales, estos discos se presentan en la larva como pequeños sacos y más adelante las células imagales de estos sacos formarán prácticamente todas las estructuras externas del adulto y también parte de las estructuras internas (Wilkins 1985). Una diferencia entre las células larvales y las células de los discos imagales es que estas últimas no se diferenciarán sino hasta que el organismo entra en metamorfosis (Fig. 9). Mientras esto pasa, los discos imagales crecerán por divisiones mitóticas a lo largo de los tres estadios por los que debe pasar la larva hasta que alcanza la condición de prepupa, en este momento se dan las últimas divisiones mitóticas. En algunos discos como el mesotorácico dorsal se da la última división alrededor de 21 h después de formado el pupario, el siguiente paso es la diferenciación celular (metamorfosis) que dará origen a las estructuras del imago o adulto (García-Bellido y Merriam 1971). Si durante este proceso ocurre una alteración heredable en cualquiera de las células imagales, ésta dará origen a una estirpe celular con la misma característica alterada originando así un clon que será observado como una mancha en la estructura imagal correspondiente si se emplean los marcadores fenotípicos adecuados (Fig. 10).

Se han desarrollado por lo menos tres protocolos que emplean dos tipos de discos imagales y que se mencionan a continuación.

Manchas en ojo usando los marcadores white-zeste, sistema desarrollado por Rasmuson et al. en 1978, se basa en la inducción de mutaciones somáticas en el locus white-inestable, originando áreas rojas en un contexto amarillo. La inestabilidad se debe a la inserción de un elemento transponible en la zona de regulación del locus "white". Se han hecho pruebas con una gran serie de compuestos mutagénicos, incluyendo tanto agentes de acción directa como agentes de acción indirecta y procarcinógenos obteniendo resultados positivos en un 33% de ellos. (Nylander et al. 1979, Fahmy y Fahmy 1980).

Los ojos de los adultos que se obtienen de estos cultivos son analizados para la aparición de sectores rojos que van desde 4 hasta 80 omatidias. El número total de sectores rojos encontrados entre el total de ojos de los machos analizados arroja la frecuencia de mutaciones somáticas inducidas por el agente químico. Una sustancia será considerada como positiva si produce un incremento significativo en la frecuencia de mutación del grupo tratado sobre el grupo testigo con $P < 0.05$.

Otro sistema desarrollado bajo estos principios es el que detecta manchas inducidas en los discos imagales de los ojos usando los marcadores white/white coral (Becker

1966). Este sistema se basa en la aparición de manchas dobles (w^{CO}/w) en los ojos del adulto debido a la inducción de recombinación somática mientras que la inducción de mutaciones o deleciones puede provocar la aparición de manchas simples.

Es importante mencionar que un compuesto se considerará negativo si al menos se han probado 2000 ojos y el resultado es negativo en por lo menos tres experimentos diferentes, lo que significa que se deben tratar aproximadamente de 40 000 a 400 000 células primordiales pigmentadas. El análisis estadístico que se emplea tanto para el protocolo anterior como para éste es el de la prueba exacta de Fisher (Vogel et al. 1985).

Recientemente se ha desarrollado una variación al protocolo anterior que se realiza usando larvas obtenidas de la cruce de hembras vírgenes "y" con machos "w", el análisis estadístico que se emplea en esta variante es de " χ^2 " para proporciones y para tomar la decisión de si el compuesto es positivo o negativo se usa el procedimiento estadístico de Selby-Olson (Selby y Olson 1981).

El tercer sistema de prueba desarrollado con el empleo de células somáticas en Drosophila melanogaster es el que usa los discos imagales mesotorácicos dorsales, estos discos imagales darán origen al mesonotum del segundo segmento torácico incluyendo el ala, es importante mencionar que el ala no se considera como un apéndice sino

como una estructura cuticular. Las alas están formadas por dos monocapas celulares de tejido epitelial: superficies dorsal y ventral, cada una de ellas se desarrolla independientemente de la otra por lo que se debe analizar cada una de ellas. Estas estructuras van a presentar tanto cetas como tricomas, los tricomas son procesos unicelulares (Demereck 1965) mientras que las cetas o cerdas son originadas por cuatro células de las cuales dos son de carácter nervioso y por lo tanto se les considera como orgánulos (Wilkins 1985). Debido a que se han detectado y caracterizado mutaciones en Drosophila melanogaster que alteran la diferenciación final de las células que darán origen a los tricomas, es posible utilizarlas como marcadores fenotípicos (García-Bellido y Dapena 1974, Graf et al. 1983).

Los marcadores que se emplean son mwh y flr^3 , ambos se encuentran ubicados en el brazo derecho del cromosoma tres y se emplean para detectar actividad recombinogénica (Vogel et al. 1985, Würzler et al. 1985). Los organismos a tratar se obtienen de la cruce de hembras vírgenes mwh con machos de la línea $flr^3/TM_3, Ser$. Sólo se analizan las larvas transheterocigóticas, es decir aquellas en las que los marcadores " mwh " y " flr^3 " sobre el par de cromosomas número tres se encuentran en forma alternada, uno de los cromosomas homólogos porta el alelo silvestre para " mwh " y el alelo recesivo " flr^3 ", mientras que el otro homólogo

porta el alelo mutante "mwh" y el alelo silvestre para "flr³". De tal forma que la inducción de mutación puntual o delección del locus silvestre para cualquiera de los dos marcadores, se registrará como manchas simples de fenotipo mwh o flr³ según sea el caso, en un contexto de células con fenotipo silvestre. La inducción de recombinación entre el marcador flr³ y el centrómero, llevará a la formación de manchas dobles mwh//flr³ mientras que la inducción de recombinación entre los marcadores producirá manchas mwh, Fig. 11, (Szabad et al. 1983, Graf et al. 1984, Würgler 1984).

Se emplea la prueba de "x²" de proporciones para comparar la frecuencia de manchas por ala y la prueba de Kolmogorof-Smirnof para comparar la distribución de manchas por tamaño de clase por ala. El diagnóstico de si el efecto de un compuesto es negativo(-), positivo (+) o si no es posible tomar una decisión (i) se lleva a cabo según el procedimiento de Selby y Olson (1981), todas las pruebas se analizan en un nivel de significación del 5% (Würgler et al. 1985, Frei y Würgler 1988).

Dentro de las características de este sistema se encuentra la versatilidad de elección de protocolos en cuanto al tipo de administración y a la edad de las larvas al momento de la exposición. Esto permite dar los tratamientos con base en las características de los compuestos a probar, como se muestra en la Fig. 12 (Graf

et al. 1984).

En el presente trabajo se analizan los resultados obtenidos en el sistema que emplea los discos imágales de las alas, al tratar larvas de 72 ± 4 h durante 6h con los siguientes mutágenos de referencia: N-nitrosodimetilamina (DMN), N-nitrosodietilamina (DEN), Metil Metano Sulfonato (MMS), y β -Propiolactona (β PL); y Azida de Sodio (NaN_3).

MATERIAL Y METODO

Agentes Químicos

N-Nitrosodimetilamina (DMN), Sigma; N-Nitrosodietilamina (DEN), Radian Corporation; Metil-Metano Sulfonato (MMS), Aldrich Chemical Company Inc.; β -Propiolactona (β -PL), Radian Corporation; Azida de sodio (NaN_3), Merck; Sacarosa, Merck; Celulosa Microcristalina, Merck.

Las características generales de los compuestos empleados, se presentan en la tabla I.

+ N-Nitrosodimetilamina: procarcinógeno que provoca severas lesiones en hígado, riñones y pulmón; se han encontrado pequeñas cantidades de DMN en el humo del cigarro y en el pescado de mar; se le conoce como agente alquilante indirecto y su fórmula aparece en la figura

13. (Index Merck 1989).

+ N-Nitrosodietilamina: procarcinógeno que produce lesiones en hígado, pulmones y esófago de roedores; se ha encontrado en pequeñas cantidades en humo de cigarro condensado y en algunos alimentos procesados; se emplea como antioxidante y como aditivo de gasolina y lubricantes; es un agente alquilante indirecto, su fórmula está en la Fig. 13. (Index Merck 1989).

+ Metil-Metano Sulfonato: es un metil éster del ácido metanosulfónico; soluble en agua y ligeramente soluble en solventes no polares; se usa como catalizador en reacciones de polimerización, alquilación y esterificación, también como disolvente; produce fuerte irritación al contacto con la piel; se le conoce como carcinógeno de acción directa; su fórmula se presenta en la Fig. 13. (Index Merck 1989).

+ β -Propiolactona: es carcinogénico; se le emplea como un intermediario en síntesis orgánicas y se usa como desinfectante en terapia; es un agente cancerígeno directo, y su fórmula se encuentra en la Fig. 13. (Index Merck 1989).

+ Azida de Sodio: se le considera un cancerígeno aunque aún se requiere más evidencia experimental, debido a que su respuesta en los bioensayos no está claramente definida; se usa en la preparación de ácido hidrazoico, azida de plomo y sodio puro. En terapia se emplea como

antihipertensivo, su fórmula aparece en la Fig. 13 (Index Merck 1989).

Lineas de *Drosophila*

Se emplearon dos líneas progenitoras para la realización de la prueba: mwh/mwh y $flr^3/TM_3, Ser$, de las que se obtuvieron hembras y machos respectivamente. La descripción de los marcadores se da a continuación:

mwh : "multiple wing hairs", se encuentra en el cromosoma 3 a 0.0 unidades de mapa, se distingue fenotípicamente como una alteración en la cantidad de tricomas por célula en las alas del adulto presentándose de 2 a 5 tricomas por célula en lugar de uno como ocurre en el fenotipo silvestre, Fig. 14 (Lindsley y Grell 1968).

$flr^3/TM_3, Ser$: flr^3 se encuentra a 39 unidades de mapa sobre el cromosoma 3, se distingue fenotípicamente por la presencia de tricomas de forma irregular en tórax y abdomen (García-Bellido y Dapena 1974 y Lindsley y Zimm 1985). En condición homocigótica, es letal pero cuando ocurre esa situación en algunas células del organismo si se expresa (Fig. 14). Para el mantenimiento de esta línea se requiere de la presencia de un cromosoma balanceador. Este cromosoma balanceador es TM_3, Ser , el cual presenta una inversión pericéntrica que abarca gran parte del cromosoma 3, porta el marcador "Serrata" (Ser), que por ser dominante permite reconocer a los individuos que

portan la inversión, ya que éstos muestran fenotípicamente las alas con bordes discontinuos. El marcador "Serrata" es una mutación letal en condición homocigótica, por lo que sólo se recobran en cada generación individuos heterocigóticos tanto para flr^3 como para Serrata (Fig. 15).

Es interesante el hecho de que un clon inducido es más grande cuando se induce en larvas jóvenes y más pequeño cuando se tratan larvas de mayor edad; y el número de células blanco en el disco imagal será mayor mientras más avanzada sea la edad de la larva (García-Bellido y Merriam 1971, Szabad et al. 1983). Debido a esto se decidió trabajar con larvas de 72 h de edad total (Fig. 16).

Para la obtención de las larvas que se trataron, se realizó la cruce progenitora con hembras vírgenes $mwh +/mwh +$ de no más de 72 horas de edad y machos $+ flr^3/TM_3$, Ser de no más de 48 horas de edad. 72 horas después de la cruce, se procedió a colectar los huevos, colocando a los progenitores en frascos con medio fresco durante 8 horas, a las 72 ± 4 horas se recuperaron las larvas empleando el método de Nöthiger (1970). Este procedimiento se basa en la formación de un gradiente de densidad que hace que las larvas que se encuentren en el frasco floten separándolas del medio de cultivo, se enjuagan con agua corriente, se colocan en un tubo homeopático de 10 ml de capacidad, al cual se le ha fijado

en un extremo una gasa de nylon y un tapón de hule espuma en el otro; posteriormente se introduce éste en un vaso de precipitados de 10 ml conteniendo 0.06 g de celulosa en polvo y 0.3 ml de la solución con el mutágeno.

El protocolo seleccionado consiste en la alimentación de las larvas de 72±4h durante 6 h (Fig. 17) por lo que después de este tiempo son enjuagadas con agua corriente para eliminar la sustancia bajo estudio y posteriormente se colocan en frascos con medio fresco para permitir el desarrollo de los organismos tratados hasta la etapa adulta. Las moscas trans-heterocigas se conservaron en alcohol al 70%. La elaboración de preparaciones permanentes se realizó según Graf et al. (1984).

Las alas se analizaron con un microscopio óptico, a un aumento de 40X. Se registró cada mancha de acuerdo a la sección del ala en la que se encontró, el número de células que la formaba y el fenotipo de ésta, el cual puede ser: mwh, flr o ambos (mwh/flr). El fenotipo de las manchas puede deberse a los eventos ilustrados en la fig 11. (Baker et al. 1978 y Graf et al. 1984).

Para el conteo de las manchas inducidas, se tomó en cuenta únicamente la región distal del ala, misma que se subdivide en siete secciones: a, b, c, c', d, d' y e de acuerdo con García Bellido y Merriam (1971) y Graf et al. (1984) (Fig. 18).

El análisis estadístico se realizó según Frei y

Würgler (1988), mediante la prueba de χ^2 de proporciones con la corrección de Yates, a la par, los datos se manejaron con el programa de cómputo SMART versión P.C. (Würgler y Frei 1989, sin publicar). Debido a que las frecuencias observadas en los grupos testigos para manchas simples menores de tres células son muy altas en relación a las manchas con tres células o más, se tomó la decisión de dividir las en tres tipos, que son; manchas simples pequeñas (1 a 2 células), manchas simples grandes (3 o más células) y manchas dobles (con campos mwh y flr). Las frecuencias de estos tres tipos de manchas son evaluadas separadamente empleando el procedimiento de decisión múltiple de Selby y Olson (1981), para concluir cuando un compuesto es positivo, débil positivo, negativo o los datos no permiten llegar a una conclusión. Este procedimiento se realiza probando las frecuencias observadas en los grupos tratados con respecto a los testigos a través de una hipótesis nula que dice que las frecuencias en el grupo tratado no son mayores que las observadas en el grupo control, y una hipótesis alternativa que dice, la frecuencia inducida en el grupo tratado es "m" veces más alta que la observada en el grupo testigo. De esta forma se puede llegar a las siguientes conclusiones; si se acepta la hipótesis nula y se rechaza la alternativa, el resultado es negativo; si se acepta la nula y se acepta también la alternativa, no se puede tomar

una decisión ya que esto no puede ser posible; si se rechaza la nula y se acepta la alternativa, la decisión es positiva; y si se rechaza la nula y la alternativa al mismo tiempo, entonces se considera que el compuesto es un débil positivo.

La "m" se da en base a la frecuencia basal para cada tipo de mancha, siendo 2 para las manchas simples pequeñas que son las más frecuentes y por lo tanto se requiere de una mayor inducción de daño para doblar la basal y siendo menos frecuentes las manchas simples grandes y las dobles, se ha considerado un aumento de 5 ($m=5$) veces la frecuencia basal para considerarlo positivo (Frei y Würgler 1988).

En algunas ocasiones surgen células con dos tricomas, estas pueden deberse a alteraciones en la diferenciación celular que no corresponden a expresiones típicas mwh por lo que para evitar errores en la clasificación de las manchas, se consideran como expresiones mwh sólo aquellas que se encuentran dentro o en la periferia de una mancha mwh (con más de tres pelos) (Graf et al. 1984). Los criterios para el reconocimiento de los marcadores fenotípicos se observan en la figura 14.

Los clones grandes generalmente tienen una forma elongada en la dirección del eje longitudinal del ala y pueden presentar forma de Z. Aunque la mayoría de los clones son continuos, algunos se pueden presentar

interrumpidos, debido a la separación parcial de las células del clon durante el desarrollo por presiones tisulares o movimientos celulares independientes (García Bellido y Merriam 1971). Para la valoración de éste tipo de clones, se ha tomado la decisión de acuerdo a lo publicado por Graf et al. (1984) de contar como clones independientes a aquellos que se encuentren separados por tres o más hileras de tricomas normales.

RESULTADOS

Por cada experimento se realizó una repetición y el testigo negativo para todos los casos fue sacarosa al 5%. No se observaron diferencias significativas entre las repeticiones y los controles con sacarosa ($P < 0.05$), por lo cual fue posible sumar los resultados de las dos repeticiones.

Al analizar los datos con ayuda del programa de cómputo SMART versión P.C. (Würgler y Frei 1989, sin publicar), en comparación con el análisis por χ^2 de proporciones, no se encontraron diferencias en cuanto a la decisión tomada.

En la tabla II se presentan las frecuencias basales observadas en este trabajo y las reportadas por Graf y colaboradores (1984) y Würgler y Vogel (1986). En la figura 19 se presenta la distribución del tamaño de las

manchas para los diferentes laboratorios, la gráfica se construye con el porcentaje de manchas por tamaño de clase, mismo que está dado por la cantidad de divisiones (n) que deben ocurrir para que una célula genere un clon de un tamaño determinado, este número se estima con 2^n y se toma como el límite superior de cada tamaño de clase. Se puede observar que los resultados obtenidos y las frecuencias por tamaño de clase concuerdan con las frecuencias basales reportadas por estos laboratorios.

En la tabla III se presentan los datos obtenidos en el presente trabajo para la inducción de manchas por los mutágenos de referencia. A continuación se presenta lo observado para cada compuesto.

N-Nitrosodimetilamina

Es de acción indirecta y actúa como alquilante. La respuesta es claramente positiva para todos los tipos de manchas y en todas las concentraciones empleadas. El efecto observado es el más claro de todas las sustancias y responde a una curva de concentración-respuesta para los tres tipos de mancha.

N-Nitrosodietilamina

Compuesto alquilante de acción indirecta, se obtuvieron resultados positivos para los tres tipos de manchas en 10 y 20 mM, pero no para 1 mM cuyos resultados son negativos para manchas simples y no se toma una

conclusión para dobles; en 5 mM se obtuvo respuesta negativa para manchas simples pequeñas, positiva para manchas simples grandes y sin conclusión para manchas dobles.

Metil-Metano Sulfonato

Compuesto conocido como mutágeno directo, pertenece al grupo de los sulfonatos y actúa como agente alquilante. Los resultados obtenidos con este fueron positivos para manchas simples chicas y grandes y para manchas dobles en las dos concentraciones más altas (1.00 y 0.50 mM), en 0.10 mM sólo se observaron diferencias significativas para las frecuencias de manchas simples, tanto chicas como grandes ($P < 0.05$).

β -propiolactona

Este compuesto tiene una vida media de 3.5 h aproximadamente en solución acuosa. Sólo se observaron resultados positivos para manchas simples grandes con las concentraciones 50 y 100 mM.

Azida de Sodio

Es un probable mutágeno con formas de uso variadas. No se obtuvo una respuesta clara y no se encontró relación definida con las concentraciones empleadas. Sin embargo, en la concentración más alta (14.7mM) se observa que la respuesta es débil positiva para manchas simples grandes mientras que para dobles y simples pequeñas es negativa. En 9.8 mM se encontró que el resultado es

positivo para manchas simples pequeñas, y negativo para grandes y dobles. En 7.3 mM no se pudo tomar una decisión para simples pequeñas y fue negativo para manchas simples grandes y dobles. No hay una respuesta clara en cuanto a su capacidad mutagénica y actividad recombinogénica.

DISCUSION

La evaluación de la actividad genotóxica está dada por la comparación entre la frecuencia de manchas en las series tratadas y la observada en la testigo. Esta frecuencia está en relación con el número de células expuestas al mutágeno y que dieron origen a un clon (Szabad et al. 1983, Graf et al. 1989). Para estimar la cantidad de células al momento del tratamiento se debe considerar la edad de la larva y el número final de células en el órgano del adulto, de acuerdo con García-Bellido y Merriam (1971) existen 30,800 células en la superficie total del ala, sin embargo, la cantidad de células en la que se basa el protocolo es de 24,400 aproximadamente, ya que se excluye del análisis la zona proximal del ala debido al alto grado de compactación de las células lo que hace difícil el registro de las manchas (García-Bellido y Merriam 1971, Szabad et al. 1983, Würigler y Vogel 1986, Graf et al. 1989).

En 1984, Graf y colaboradores publican una revisión de los resultados de diferentes laboratorios tanto para

las frecuencias basales como para las inducidas con algunos compuestos de referencia, las larvas transheterocigóticas que se tratan son *mwh +/+ flr* y se obtienen de la crua esquematizada en la figura 20. En la tabla II se comparan las frecuencias basales por tipo de mancha reportadas por Graf y colaboradores (1984), con las del presente trabajo. Aunque la crua empleada es diferente, las basales de los testigos negativos son similares. Se puede observar que a pesar de las diferencias, los datos de los cinco laboratorios se encuentran dentro de los mismos rangos. Esto es más claro en la figura 21 en la cual se comparan las medias para la frecuencia de las manchas simples pequeñas.

En la misma tabla II se han incluido las frecuencias basales reportadas por Würgler y colaboradores (1986), para la crua empleada en el presente trabajo, se puede observar que las frecuencias son prácticamente iguales.

Se compara la distribución por tamaño de clase de las manchas simples para los testigos de los cuatro laboratorios reportados por Graf et al. (1984), con la curva para los datos observados del presente trabajo (Fig.19); esta gráfica se construye según Baker et al. (1978). La frecuencia de las manchas simples por tamaño de clase es similar con respecto al comportamiento observado para la distribución del tamaño de mancha en los otros laboratorios, es importante aclarar que la crua empleada

es distinta (Fig. 20).

Estudios experimentales han demostrado que la capacidad metabólica en las larvas de Drosophila melanogaster es mayor que en el adulto (Baars et al. 1980, Clark 1982, Hälstrom 1987). Cuando se probaron los procarcinógenos DMN y DEN se obtuvo una respuesta positiva en cuanto a su mutagenicidad y se encontró también respuesta positiva en su acción recombinogénica.

En la Fig. 22a se presenta la distribución por tamaño de clase de las manchas simples inducidas con los tratamientos con DMN, la cual tiende a adoptar una distribución normal al aumentar la concentración, esto indica que el DMN tiene gran afinidad por el ADN y el daño que provoca es mayor que el DEN y su efecto se expresa más pronto. En la Fig. 22b se muestra su capacidad como agente recombinogénico ($P < 0.05$).

En el caso de DEN para manchas simples, se observa en la Fig. 23a que el tipo modal de manchas equivale a las manchas pequeñas lo que indica que el daño que el compuesto produce se expresa al final del desarrollo del disco imagal del ala, además al aumentar la concentración se incrementa ligeramente el tamaño promedio de mancha, la respuesta fue significativa en cuanto a la actividad recombinogénica (manchas dobles) y está de acuerdo con su acción procarcinogénica (Fig. 23b).

Para probar si una sustancia es genotóxica al momento

en que entra en contacto con el material hereditario y el sistema de SMART lo detecta, se empleó el MMS, agente alquilante de acción directa, clasificado como se mencionó en la tabla I como cancerígeno. Los resultados muestran su acción directa (Figs. 24a y 24b), se puede observar en la figura 24a. que se inducen manchas simples grandes de acuerdo con lo esperado en la Fig. 16, aunque la cantidad de manchas simples grandes de las clases de 17-32 y 33-64 es moderada. El incremento que se observa en las primeras clases se puede deber a que la alteración del MMS sobre las células es principalmente citotóxica o bien a que la concentración más alta produce muerte celular en los clones inducidos tempranamente, probablemente por saturación del ambiente con el compuesto, lo cual da origen a clones más pequeños de los esperados para la edad de tratamiento. En la figura 24b se observa que el MMS induce una gran cantidad de manchas dobles del tamaño esperado según García-Bellido y Merriam (1971) y se hace evidente además su acción recombinogénica como agente carcinogénico ($P < 0.05$).

De los compuestos de referencia empleados, la β -Propiolactona es el más adecuado para evaluar un esquema de tratamiento agudo debido a su vida media en solución acuosa (3.5 h) y a que es un potente inductor de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo, cuando se inyecta a machos adultos de 48 h de edad (Kortselius

1979); en las Figs. 25a y 25b, se observa que induce manchas simples pequeñas pero los resultados no llegan a ser significativos, que la proporción de manchas por ala con relación al tamaño de clase toma la forma de una distribución con dos picos modales, presentando predominio de manchas con 3-4 células cuando la concentración aumenta $P < 0.05$. Esto indica actividad mutagénica del compuesto. Sin embargo la frecuencia de manchas dobles no se incrementó significativamente en ninguna concentración ($P < 0.05$).

Se determinaron las actividades mutagénica y recombinogénica de la Azida de Sodio en Drosophila melanogaster con la prueba de SMART, aunque ya se ha descrito como mutágeno fuerte en algunas plantas y en bacterias (Arenaz et al. 1989), en pruebas con células de mamíferos ha demostrado ser un mutágeno débil (Arenaz et al. 1989). Por otra parte, su mutagenicidad en Salmonella se asocia a un metabolito, azidoalanina. Aparentemente en mamíferos existen las enzimas necesarias para convertir el azida de sodio en azidoalanina, sin embargo, la cantidad que se produce de este compuesto no llega a ser suficiente para producir un daño considerable al ADN (Arenaz et al. 1989). En el presente trabajo, se intentó obtener algún índice de toxicidad tratando machos adultos de la línea Canton-S, sin embargo no fué posible establecer una LD₅₀ debido a que cuando se inyectó a las moscas, estas

reaccionaron con visibles muestras de irritabilidad por el agente y se recuperaron en un tiempo muy prolongado, además la toxicidad producida por el compuesto no fue consistente con la concentración empleada, los tratamientos por alimentación de larvas con esta sustancia produjeron un alto índice de pupación temprana lo cual indica un efecto tóxico marcado, de ahí que la cantidad de individuos recobrados para el análisis de sus alas fue pequeña, por lo que se decidió trabajar con las concentraciones en las cuales se obtuvieron tamaños de muestra adecuados. Otro aspecto interesante de la acción de este compuesto es la forma de la respuesta (Figs. 26a y 26b), se observa que es mutagénico aunque en algunas de las concentraciones empleadas no alcanza a doblar la frecuencia del testigo ($m=2$). Al revisar en la tabla III los valores para la frecuencia de inducción de la azida de sodio con respecto a la espontanea, se nota una posible acción citotóxica (Tomlinson 1980), por lo que los clones producidos tempranamente no llegan a desarrollarse debido a la muerte de las células alteradas. Otra posibilidad es que estas células no mueran por la acción citotóxica del compuesto y reparen parte del daño, la parte residual no reparada podría conducir a mutaciones puntuales (transiciones y transversiones). Esto apoyado en que la azida de sodio es altamente mutagénica en Salmonella, cuando se prueba en líneas revertrantes (Owais et al.

1978). Con respecto a su toxicidad en los adultos, probablemente interacciona con las características genéticas que cada individuo y célula presentan. Se propone que la azida de sodio actúa en la regulación génica produciendo alteraciones, esto está apoyado en el alto índice de pupación temprana cuando las larvas entran en contacto con la sustancia. Se considera que la azida de sodio es más efectiva como mutágeno que como carcinógeno (Arenaz *et al.* 1989), razón por la cual en la figura 26b no hay incremento en la inducción de manchas gemelas con respecto a los valores basales observados.

Se encuentran muchas perspectivas para probar la azida de sodio con el sistema de prueba de Drosophila melanogaster por las siguientes razones: 1) es posible determinar su capacidad para inducir mutaciones letales recesivas ligadas al sexo, 2) realizar experimentos con la prueba de pérdida cromosómica empleando tanto líneas proficientes como deficientes en mecanismos de reparación y 3) de ser posible, llevar al cabo experimentos en el sistema de SMART con el metabolito azidoalanina ya que podría ser el causante de la actividad mutagénica y no la azida de sodio por sí misma.

Las características importantes de los nuevos bioensayos de corto-plazo son: su versatilidad para detectar una gran variedad de daño genético, su costo que puede variar de moderado a bajo, que sea reproducible, que

utilice tamaños de muestra satisfactorios y que detecte agentes químicos que requieren de activación metabólica, entre otras.

Hasta la fecha se ha manejado a Drosophila melanogaster como un sistema eucarionte in vivo, empleando la prueba de letales recesivos ligados al sexo, que ha demostrado poseer gran sensibilidad y especificidad ya que es posible usar el sistema de camadas, que permite analizar todas las etapas de la gametogénesis y determinar así si el agente sujeto a prueba actúa por sí mismo o requiere de activación metabólica. Sin embargo, esta prueba consume una gran cantidad de tiempo para su desarrollo así como tiempo/hombre y costo de material.

Por su parte el sistema que se evalúa en el presente trabajo ha demostrado mayor versatilidad en cuanto al rango de compuestos que detecta ya que se trata a larvas, el número de células blanco por individuo es considerable y el rango de alteraciones genéticas es mayor que el de SRLT (Vogel 1987, Ramos et.al 1989b). En cuanto a su costo, es bajo, su realización es relativamente sencilla y más rápida, una generación y es de importancia el hecho de que sigue siendo un sistema eucarionte in vivo con la capacidad de detectar probables carcinógenos.

El nivel de repetibilidad entre diferentes laboratorios en las series testigo es adecuado, los valores para las frecuencias basales obtenidas en el

presente trabajo son muy similares a las reportadas. Por lo tanto los resultados encontrados en el laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la UNAM pueden ser comparados con los descritos en la literatura para los compuestos de referencia, ya que la validez interna y externa de los resultados obtenidos fue ampliamente demostrada para el protocolo experimental valorado.

Los objetivos del presente trabajo en este sentido son dos; ubicar la prueba SMART dentro del contexto de pruebas que se emplean en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la UNAM y dar validez interna y externa en lo que respecta a la realización de SMART en México.

En la tabla IV se presenta una comparación general de los resultados obtenidos en el trabajo con los presentados por Würgler et al. (1985). Esta tabla tiene un doble objetivo pues se presentan también las decisiones tomadas para la prueba de letales recesivos ligados al sexo (SLRLT), con el fin de comparar la sensibilidad de SMART en cuanto a las concentraciones empleadas con la de la prueba de letales recesivos ligados al sexo. De aquí se concluye que la sensibilidad de ambas pruebas es muy semejante. De tal forma que la decisión en cuanto a la acción de los compuestos fue prácticamente la misma en las concentraciones empleadas.

CONCLUSIONES

Los valores observados en el presente trabajo demuestran tanto la validéz interna como externa de la realización de SMART en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias.

A lo largo del trabajo se demostró la versatilidad de SMART al probar diferentes clases de compuestos y a diversas concentraciones.

SMART es una prueba de corto-término que se puede emplear como sistema de primera entrada en la detección de compuestos mutagénicos o bien como un sistema de respaldo a los resultados de SLRLT, debido a que la realización de esta prueba es sencilla, rápida, relativamente barata y tan sensible como SLRLT.

Se ha demostrado que la prueba SMART es capaz de detectar la actividad de gran variedad de compuestos químicos, sin embargo como ocurre para todos los sistemas de prueba, los resultados de esta deben ser siempre confirmados, o acompañados de resultados obtenidos en otros sistemas para poder definir adecuadamente el perfil genotóxico de los compuestos.

REFERENCIAS

- +Abrahamson, S. y Lewis, E.B(1971) The detection of mutations in Drosophila melanogaster. En: Hollander A. (Ed), Chemical mutagens, Principles and methods for their detection. Plenum, Press, Nueva York, 461-487 pp.
- +Arenaz, P., L. Hallberg, F. Mancillas, G. Gutierrez y S. Garcia(1989) Sodium azide mutagenesis in mammals: inability of mammalian cells to convert azide to a mutagenic intermediate. Mutation Res., 227, 63-67.
- +Auerbach, C.(1945) The problem of chromosome rearrangments in somatic cells of Drosophila melanogaster. Proc. R. Soc. Edinburgo, B62,120-127.
- +Baars, A.J., G.H. Blijleven, G.R. Mohn, A.T. Natarajan y D.D. Breimer. (1980) Preliminary studies on the ability of Drosophila microsomal preparations to activate mutagens and carcinogens. Mutation Res., 72, 257-264.
- +Baker, B.S., A.T.C. Carpenter, P. Ropoll(1978) The utilization during mitotic cell division of loci controlling meiotic recombination and disjunction in Drosophila melanogaster. Genetics,90,531-578.
- +Becker, H.J(1957) Ueber röntgenmosaikflecken und defektmutationen am auge von Drosophila und die entwicklungsphysiologie des auges. Z. Vererbungslehre, 88, 333-373.
- +Becker, H.J(1966) Genetic and variegation mosaics in the eye of Drosophila. Curr. Topics Develop. Biol.,1,155-171.

- +Becker, H.J(1975) X-ray and TEM-induced mitotic recombination in Drosophila melanogaster: Unequal and sister strand recombination. Molec. Gen. Genet., 138, 11-24.
- +Becker, H.J(1976) Mitotic recombination. En: M. Ashburner y E. Novitski (Eds.) The genetics and biology of Drosophila, Londres, Nueva York, San Francisco. Academic Press, Vol 1c, pp. 1019-1087.
- +Brusick, D., V.F. Simmon, H.S. Rosenkranz, V.A. Ragy y R.S. Sttaford(1980) An evaluation of the Escherichia coli WP₂ and WP₂ uvrA reverse mutation assay. Mutation Res., 76, 169-190.
- +Brusick, D(1987) Principles of genetic toxicology. Plenum Press. Nueva York, U.S.A., 284 pp.
- +Brusick, D(1988) Evolution of testing strategies for genetic toxicity. Mutation Res., 205, 69-78.
- +Cairns, J(1981) The origin of human cancers. Nature, 289, 353-357.
- +Casaret, L.J(1975) Origin and scope of Toxicology. En: L.J. Casaret y J. Doull (Eds.) Toxicology, the basic science of poisons, Nueva York. Macmillan Pub Co. pp.3-10.
- +Chandley, A.C. y A.J. Bateman. (1962) Timing of spermatogenesis in Drosophila melanogaster using tritiated thymidine. Nature, 20, 299-300.
- +Clark, A.M(1982) The use of larval stages of Drosophila in screening for some naturally occurring mutagens. Mutation Res., 2, 89-97.

- +Denereck, M (1965) Biology of Drosophila. Hafner Publishing Co. Nueva York. 633 pp.
- +Environmental Mutagen Society(1976) Environmental mutagen hazards. Science, 187, 503-514.
- +Fahmy, O.G. y M.J. Fahmy(1970) Gene elimination in carcinogenesis: reinterpretation of the somatic mutation theory. Cancer Research, 30, 195-205.
- +Fahmy, M.J. y O.G. Fahmy(1980) Altered control of gene activity in the soma by carcinogens. Mutation Res.,72, 165-172.
- +Frei, H. y F.E. Würzler(1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from Drosophila assays indicate a positive, negative or inconclusive result. Mutation Res., 203, 297-308.
- +García-Bellido, A. y J. Dapena(1974) Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in Drosophila. Mol. Gen. Genet., 128, 117-130.
- +García-Bellido, A., J.R. Merriam(1971) Parameters of the wing imaginal disc development of Drosophila melanogaster. Dev. Biol., 24, 61-87.
- +Graf, U., H. Juon, A.J. Katz, H.J. Frei y F.E. Würzler(1983) A pilot study on a new Drosophila spot test. Mutation Res., 120, 233-239.
- +Graf, U., F.E. Würzler, A.J. Katz, H. Frei, H. Juon, C.B. Hall y P.G. Kale(1984) Somatic mutation and recombination test in Drosophila melanogaster. Environ.

Mutagen., 5, 153-188.

- +Graf, U., H. Frei, A. Kägi, A.J. Katz y F.E. Würzler(1989) Thirty compounds tested in the Drosophila wing spot test. Mutation Res., 222, 359-373.
- +Griesemer, R.A. y Cueto, C.Jr(1980) Toward a classification cheme for degrees of experimental evidence for the carcinogenicity of chemicals. En: Montesano, R., Bartsch, H. y Tomatis, L. (Eds) Molecular and cellular aspects of carcinogen screening tests. IARC Science Publishers, 27, 259-281.
- +Hällström, I(1987) Genetic variation in cytochrome P-450 dependent demethylation in Drosophila melanogaster. Biochem. Pharmacol., 36, 2279-2282.
- +Index Merck(1989) Encyclopedy of chemical and drugs. Publish by Merck and Co., Inc. Rahway, N.J., U.S.A. 11 ed. 1606 p.
- +Klaassen, C.D(1975) Absorption, distribution and excretion of toxicants. En: L.J. Casarett y J. Doull (Eds.) Toxicology, the basic science of poisons, Nueva York. Macmillan Pub. Co. pp. 26-44.
- +Kortselius, M.J.H(1979) Induction of sex-linked recessive lethals and autosomal translocations by β -Propiolactona in Drosophila: Influence of the route of administration on mutagenic activity. Mutation Res., 66, 55-63.
- +Lee, W.R., S. Abrahamson, R. Valencia, E.S. von Halle, F.E. Würzler y S. Zimmering(1983) The sex-linked recessive

- lethal test for mutagenesis in Drosophila melanogaster, Gene-Tox report. Mutation Res., 123, 183-279.
- +Lindsley, D.L. y E.H. Grell. (1968) Genetic variations of Drosophila melanogaster. Carnegie Institution, Publ. No 627, Washington DC.
- +Lindsley, D.L. y G. Zimm(1985) The genome of Drosophila melanogaster, Part I: genes A-K, Drosophila Inform. Serv., 62, 1-277.
- +Mollet, P. y F.E. Würzler(1974) Detection of somatic recombination and mutation in Drosophila. A method for testing genetic activity of chemical compounds. Mutation Res., 25, 421-424.
- +Mollet, P. y J. Szabad(1978) Induction and detection of mosaicism by MMS in the eye disc and female germ line of Drosophila, Mutation Res., 51, 293-296.
- +Norton, T. R. (1975) Metabolism of toxic substances. En: L.J. Casaret y J. Doull (Eds.) Toxicology, the basic science of poisons, Nueva York. Macmillan Pub. Co. pp. 45-132.
- +Nöthiger, R.(1970) Sucrose density separation: A method for collecting large number of Drosophila larvae. Dros. Inf. Serv., 45, 177.
- +Nylander, P.O., H. Olofsson y B. Rasmuson(1979) The use of Drosophila melanogaster as a test system for indirect mutagens. Mutation Res., 64, 122-123.
- +Owais, W.M., M.A. Gunovich, A.L. Hodgdon, A. Kleinhofs y

- R.A. Nilan(1978) A mutagenic in vivo metabolite of sodium azide, *Mutation Res.*, 53, 355-358.
- +Ramos, M.P., A.R. Delgado, R.M. Ortiz y R. Rodríguez-Arnaiz(1989a) Protocolo de la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en Drosophila melanogaster. En. Memorias de la I reunión Nacional de investigación de la Sociedad Mexicana de Genética, La Trinidad Tlaxcala.México.
- +Ramos, M.P., A.R. Delgado y R. Rodríguez-Arnaiz(1989b) Valoración preliminar de la prueba de mutación somática y recombinación en Drosophila melanogaster empleando diferentes concentraciones de N-nitrosodimetilamina. En. Memorias de la I reunión Nacional de investigación de la Sociedad Mexicana de Genética, La Trinidad Tlaxcala.México.
- +Rasmuson, B., H. Svahlin, A. Rasmuson, I. Montell y H. Olofsson(1978) The use of a Mutationally unstable X-Chromosome in Drosophila melanogaster for mutagenicity testing. *Mutation Res.*, 54, 33-38.
- +Selby, P.B., W.H. Olson(1981) Methods and criteria for deciding whether specific-locus mutation-rate data in mice indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutation Res.*, 83, 403-418.
- +Sorsa, M., K. Hemminki, y H. Vainio(1982) Biologic monitoring of exposure to chemical mutagens in the occupational environment. *Teratog. Carcinog. Mutag.*, 2,

137-150.

- +Szabad, J., I. Soos, G. Polgar y G. Hejja(1983) Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the Drosophila mosaic and the sex-linked recessive lethal tests. Mutation Res., 113, 117-133.
- +Tomlinson, C.R. (1980) Effects of pH on the mutagenicity of sodium azide in Neurospora crassa and Salmonella typhimurium. Mutation Res., 70, 179-191.
- +Valencia, R., S. Abrahamson, W.R. Lee, E.S. von Halle, R.C. Woodruff, F.E. Würigler y S. Zimmering(1984) Chromosome mutation test for mutagenesis in Drosophila melanogaster. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 134, 61-88.
- +Vogel, E.W.(1987) Evaluation of potential mammalian genotoxins using Drosophila: the need for a change in test strategy. Mutagenesis, 2, 161-171.
- +Vogel, E.W. y A.T. Natarajan(1979) The relation between reaction kinetics and mutagenic action of mono-functional alkylating agents in higher eukaryotic systems.I: Recessive lethal mutations and translocations in Drosophila. Mutation Res., 62, 51-100.
- +Vogel, E.W., A. Schalet, W.R. Lee y F.E. Würigler(1981) Mutagenicity of selected chemicals in Drosophila, En: F.J. de Serres y M.D. Shelby (Eds.), Comparative Chemical Mutagenesis, Environmental Science Research, Vol. 24, Plenum Press, Nueva York, pp. 175-255.

- +Vogel, E.W., H. Frei, K. Fujikawa, U. Graf., S. Kondo, H. Ryo y F.E. Würgler(1985) Summary Report on the performance of the Drosophila assays, En: J.Ashby, F.J. de Serres, M. Draper y M Ishidate (Eds.), Collaborative study of Short-term tests for carcinogens, Progress in Mutation Research, Vol. 5, Elsevier/North Holland, Amsterdam, pp. 47-57.
- +Wilkins, A.S(1985) Genetic analysis of animal development. John Wiley and Sons (Eds) Nueva York, U.S.A., 1500 p.
- +Woodruff, R.C. (1984) Chemical mutagenesis testing in Drosophila Environ. Mutagen., 6, 189-202.
- +Wright, A.S(1980) The role of metabolism in chemical mutagenesis and chemical carcinogenesis. Mutation Res., 75, 215-241.
- +Würgler, F.E., F.H. Sobels y E. Vogel(1984) Drosophila as an assay system for detecting genetic changes, En: B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols y C. Ramel (Eds.), Handbook of mutagenicity test porcedures. 2da Ed. Elsevier/North Holland, Amsterdam, pp. 555-601.
- +Würgler, F.E., U. Graf y H. Frei(1985) Somatic mutation and recombination test in wings of Drosophila melanogaster. En: F.J. de Serres (Eds.), Progress in Mutation Research, Amsterdam, Elsevier, Vol. 5, pp. 325-340.
- +Würgler, F.E. y E.W. Vogel(1986) In vivo mutagenicity

testing using somatic cells of Drosophila melanogaster,
en: F.J. de Serres (Ed.), Chemical mutagens, Principles
and methods for their detection, Vol 10, Plenum Press,
Nueva York, pp. 1-72.

+Zimmering, S., J.M. Mason y C. Osgood(1986) Current
Status of aneuploidy testing in Drosophila. Mutation Res.,
167, 71-87.

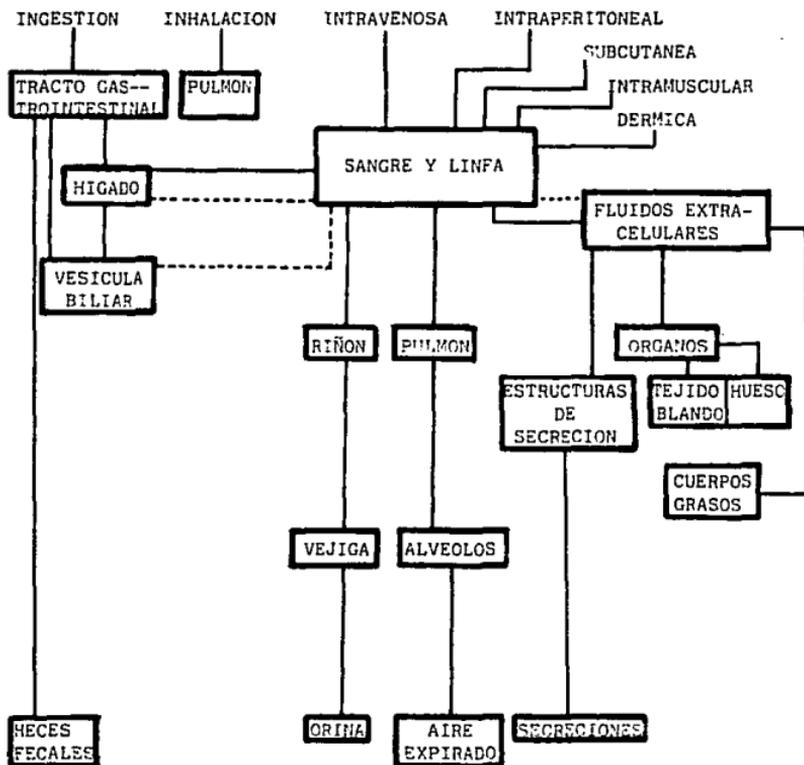


Figura 1. Rutas de adsorción, distribución y excreción de compuestos tóxicos en el cuerpo (Modificado de Casarett 1975).

**Precusores de algunos agentes genotóxicos
(Procarcinógenos, promutágenos).**

Compuestos polinucleares e hidrocarburos heterocíclicos.

Aminas primarias, secundarias y terciarias.

Aminas aromáticas y heterocíclicas.

Nitrosaminas y nitrosocarbamatos.

Alquiltriacinas y dialquilhidracinas.

Acetamidas, tioamidas y carbamatos.

Algunos hidrocarburos clorados como el monómero
cloruro de vinilo.

Venenos naturales como las micotoxinas.

**Figura 2. Principales clases de promutágenos y/o procarcinógenos
(Tomado de Wright 1980).**

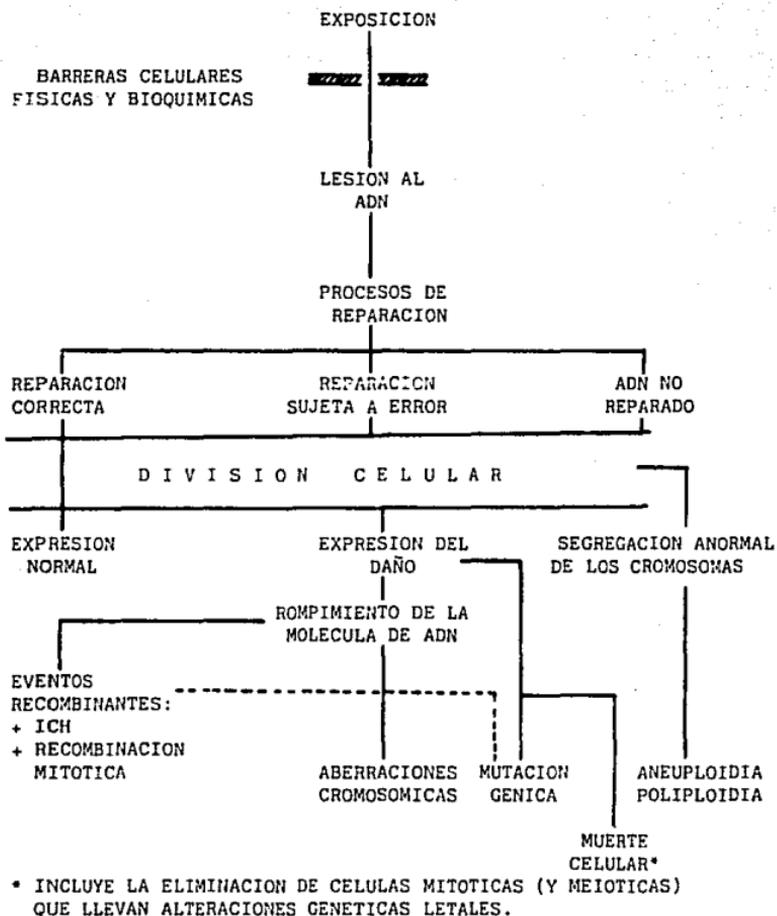


Figura 3. Interacción hipotética entre un compuesto químico y el ADN (Modificado de Brusick 1987).

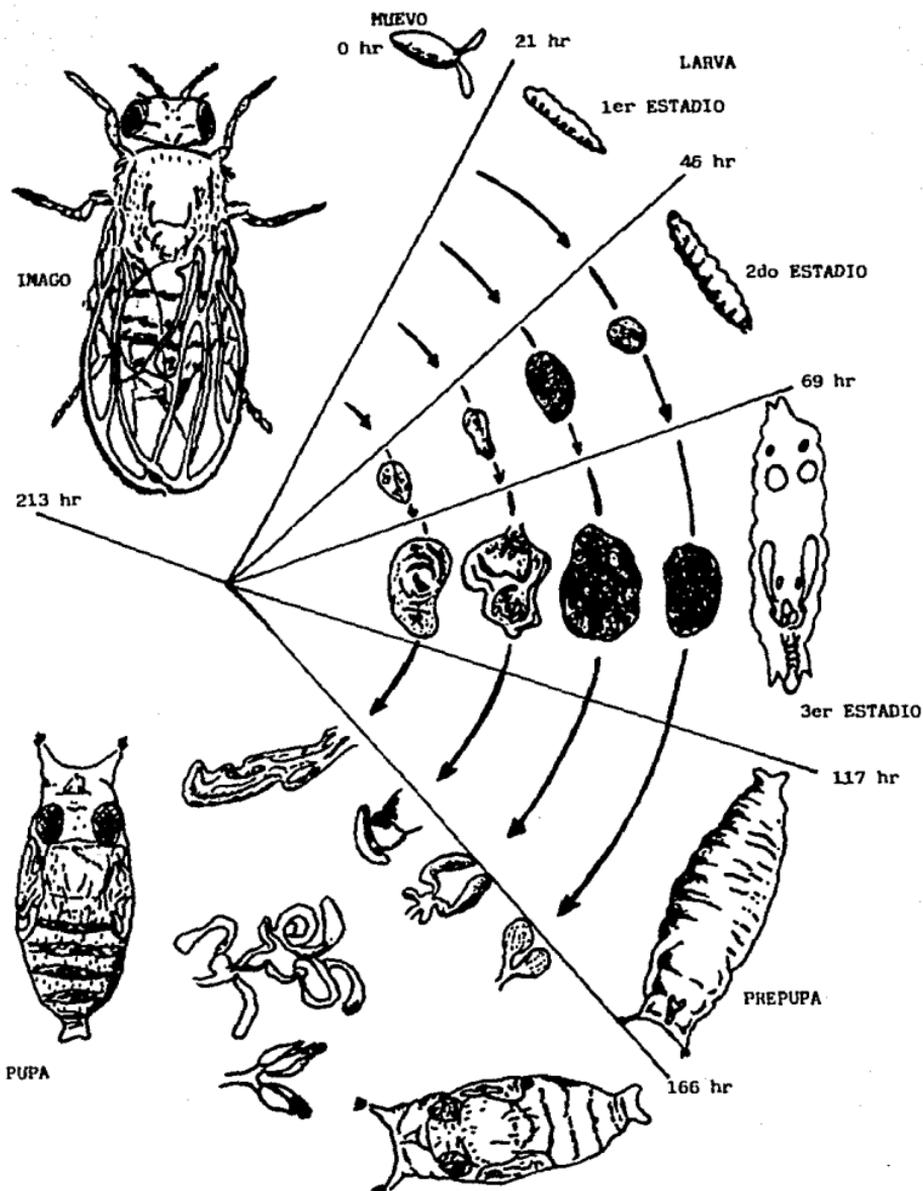
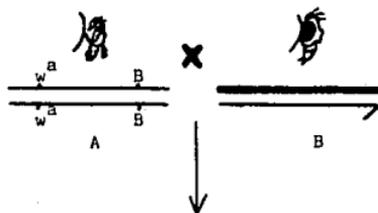
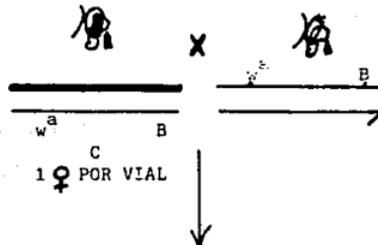
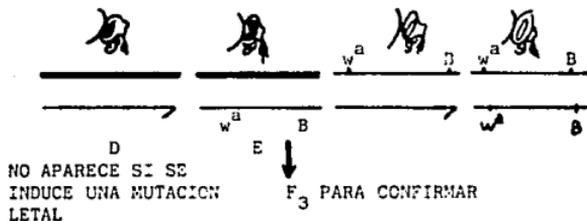


Figura 4. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (Modificado de Baker 1965).

TRATADO

CRUZA PARENTAL

F₁F₂

FORMA DEL OJO: B o B/B /; B/+D; +O
 COLOR DEL OJO:  Apricot  Silvestre

Figura 5. PRUEBA DE LETALES RECESIVOS LIGADOS AL SEXO. Los machos silvestres tratados (B) son cruzados individualmente con hembras vírgenes Basc (A). Las hembras de la F₁ (C) se colocan individualmente en viales con machos Basc. Se revisa la F₂ para la presencia o ausencia de machos de tipo silvestre (D). Los posibles letales se comprueban en F₃ cruzando las hembras (E) con machos Basc. (Tomado de Lee et al. 1983).

CRUZA PROGENITORA Y PROGENIE, REGULAR

P	y^{2w^a} / y^{2w^a}	X	$y / B^S Y y^+$
	Cuerpo amarillo Ojos color durazno		Ojos en Barra
F ₁	y^{2w^a} / y		$y^{2w^a} / B^S Y y^+$
	Cuerpo amarillo		Ojos en Barra color durazno

EVENTOS GENETICOS RECOBRADOS POR PERDIDA

<u>EVEN TO GENETICO</u>	<u>GENOTIPO</u>	<u>SEXO</u>	<u>FENOTIPO</u>
Pérdida del brazo largo del Y.	$y^{2w^a} / Y y^+$	♂	w^a . Ojos color durazno.
Pérdida del brazo corto del Y.	$y^{2w^a} / B^S Y$	♂	y^{2w^a} / B^S . Cuerpo amarillo ojos en Barra color durazno.
Pérdida de los marcadores del Y.	y^{2w^a} / Y	♂	y^{2w^a} . Cuerpo amarillo con pelos y cerdas negros, ojos color durazno.
No disyunción en machos.	$y^{2w^a} / y / B^S Y y^+$	♀	B^S . Ojos en Barra.
	$y^{2w^a} / 0$	♂	y^{2w^a} . Cuerpo amarillo con pelos y cerdas negros, ojos color durazno.

Figura 6. Eventos recobrados en la prueba de pérdida cromosómica (Tomado de Abrahamson y Lewis 1971).

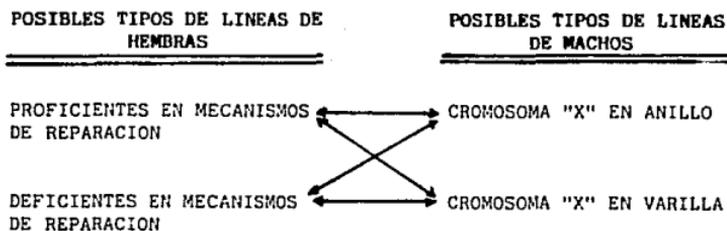
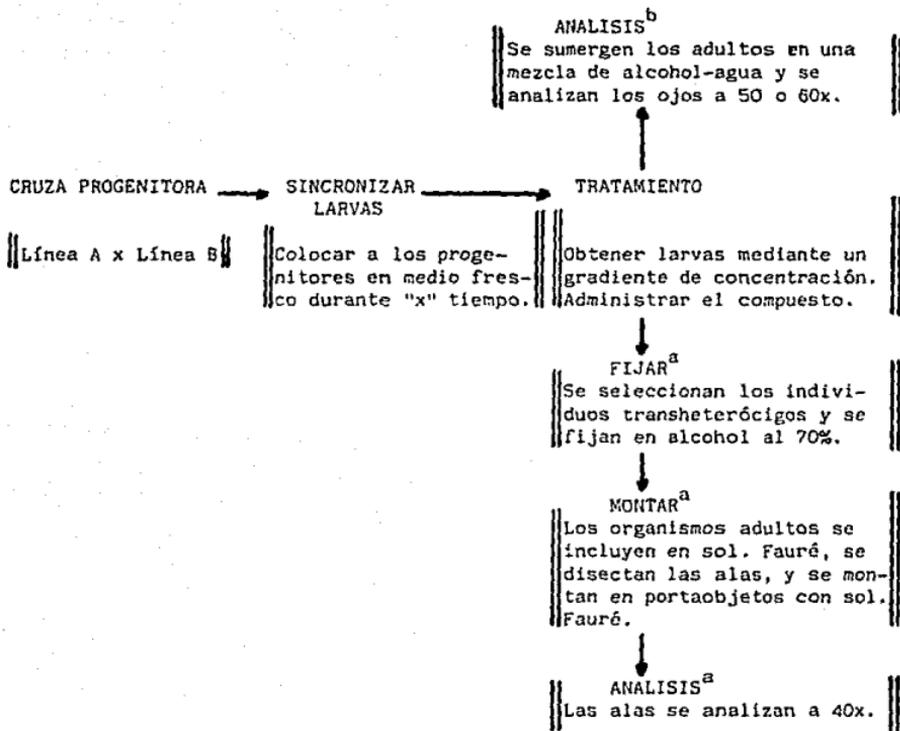


Figura 7. Posibles tipos de líneas empleadas para la prueba de pérdida cromosómica (SCLT).



a. Especifico para el protocolo de ala.

b. Especifico para el protocolo de ojo.

Figura 8. Cronograma de la técnica SMART.

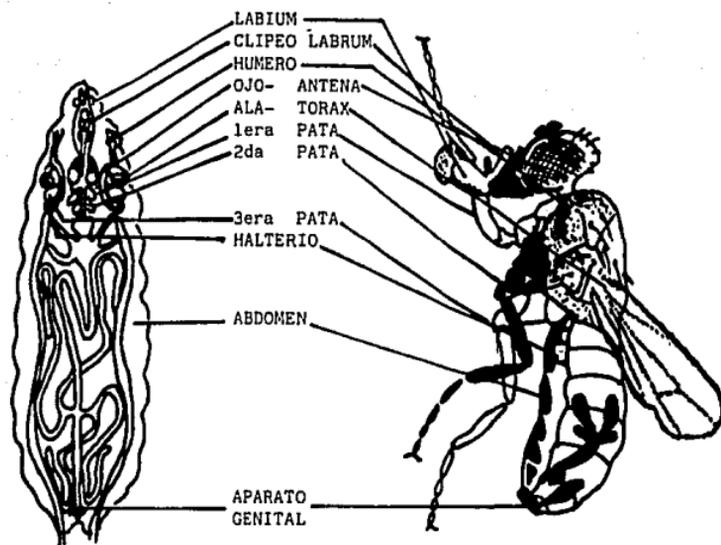


Figura 9. Discos imagales y su correspondencia con las estructuras a que van a dar origen en el adulto o imago (Tomado de Wilkins 1985).

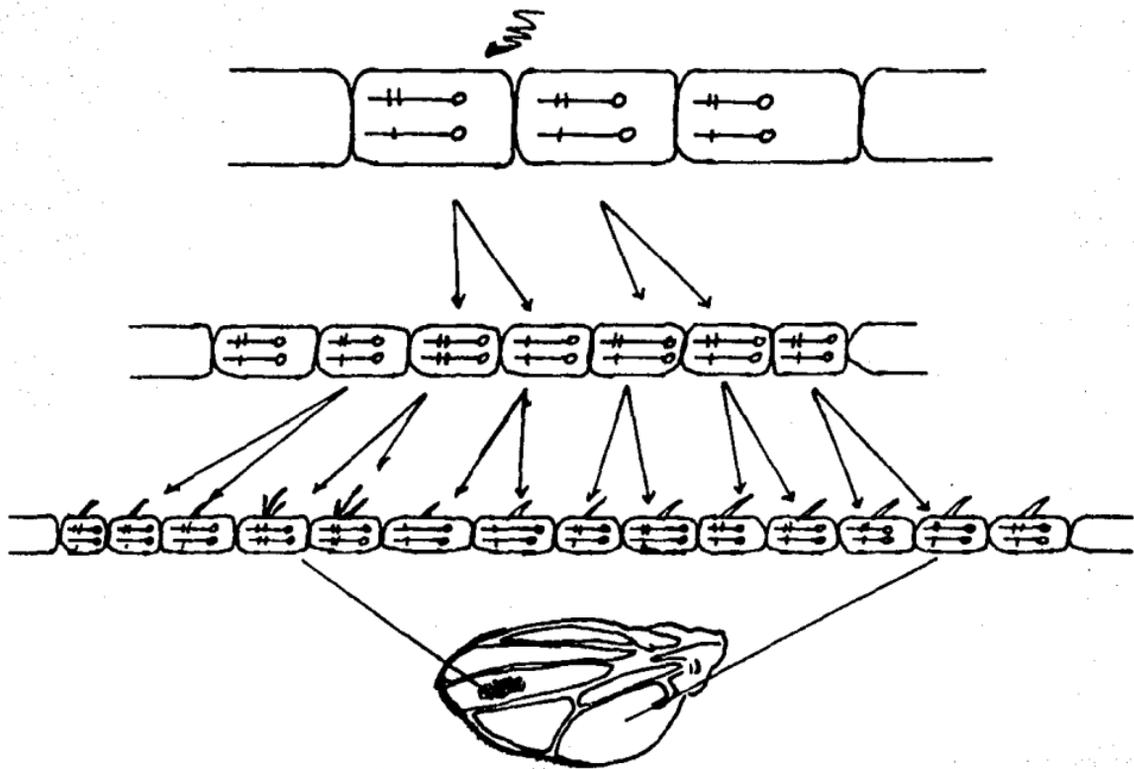


Figura 10. Origen de un clon en células del ala de Drosophila melanogaster.

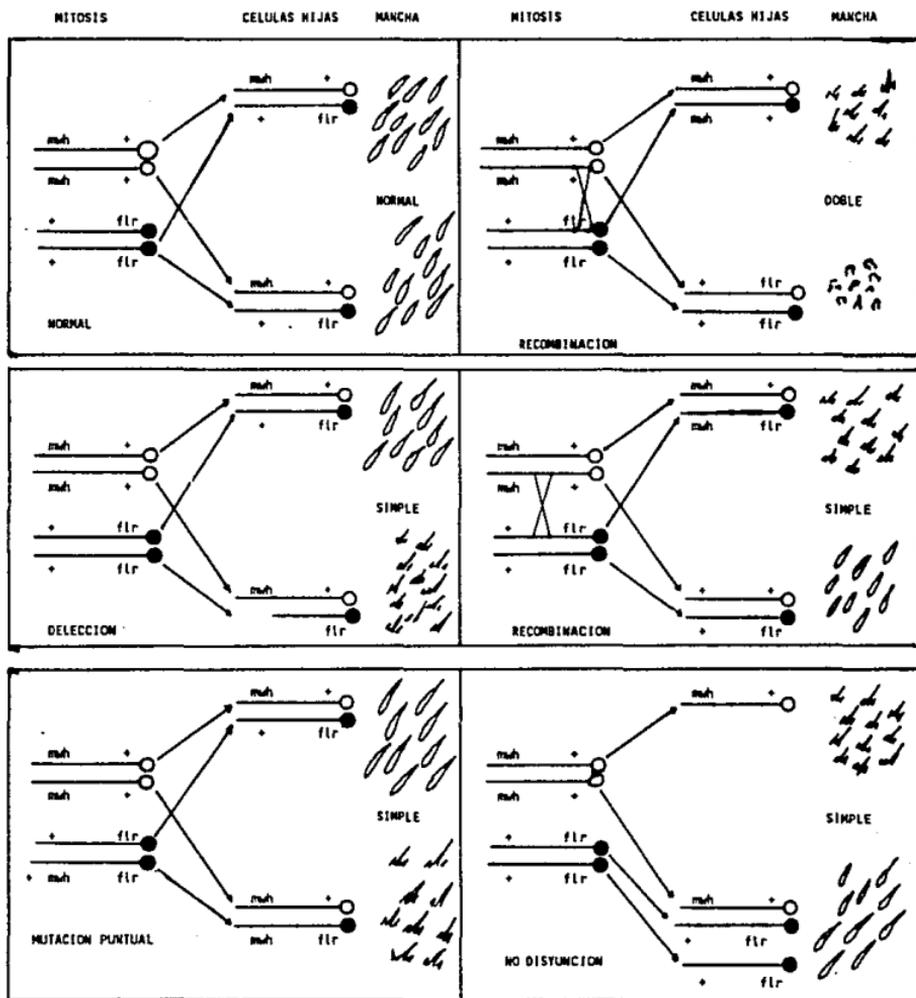
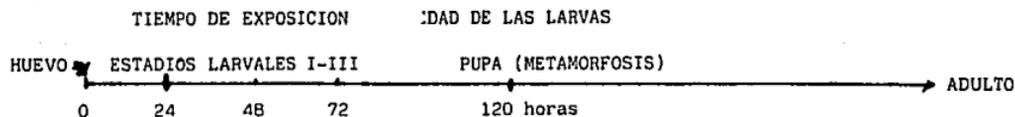
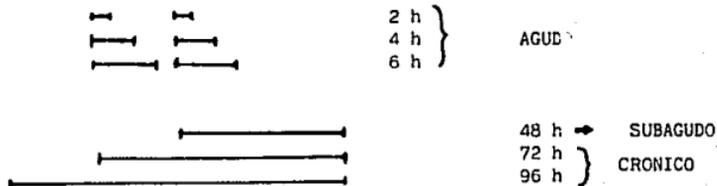


Figura 11. Eventos recobrados con la prueba de SMART en las alas de *Drosophila melanogaster*.



EXPOSICION AL
MUTAGENO:

TIPO DE TRATAMIENTO

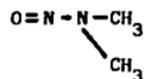


RUTAS DE ADMINISTRACION

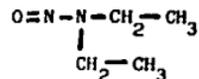
- + ALIMENTACION
- + INYECCION
- + INHALACION

Figura 12. Versatilidad del protocolo de la prueba SMART.

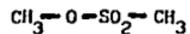
N-Nitrosodimetilamina



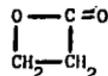
N-Nitrosodietilamina



Metilmetanosulfonato



Beta-Propiolactona



Azida de Sodio



Figura 13. Fórmulas de los compuestos empleados.

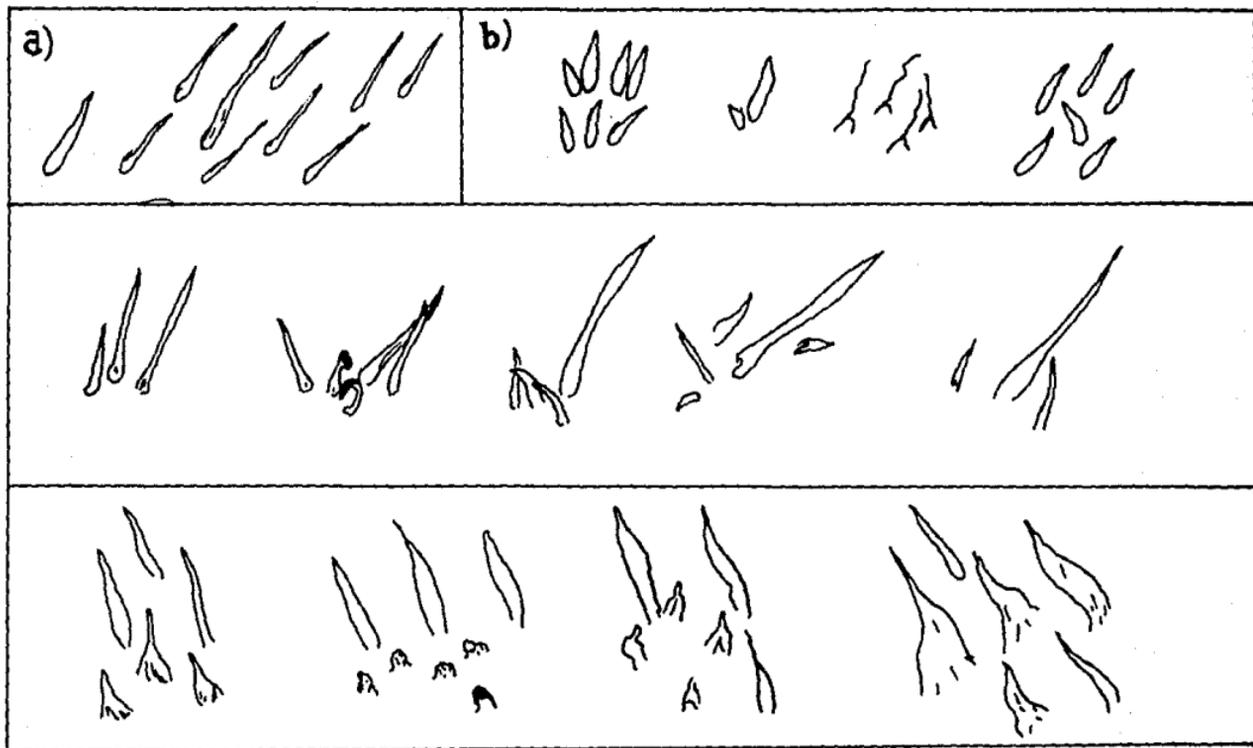


Figura 14. Tricomas en la superficie del ala. a) Normales, b) formas de tricomas no considerados como mwh o flr, c) formas en las que se puede presentar mwh, d) manifestaciones típicas de flr. (Basado en Graf et al. 1984).

LINEA DE HEMBRAS

mwh / mwh

LINEA DE MACHOS

flr³ / TM₃, Ser x flr³ / TM₃, Ser

♀	flr ³	TM ₃ , Ser
flr ³	flr ³ / flr ³ <u>letal</u>	flr ³ / TM ₃ , Ser <u>Serrata</u>
TM ₃ , Ser	flr ³ / TM ₃ , Ser <u>Serrata</u>	TM ₃ , Ser / TM ₃ , Ser <u>letal</u>

CRUZA PROGENITORA mwh / mwh x flr³ / TM₃, SerF₁mwh + / + flr³mwh + / TM₃, Ser

Figura 15. Esquema de letales balanceados empleados en la cruce.

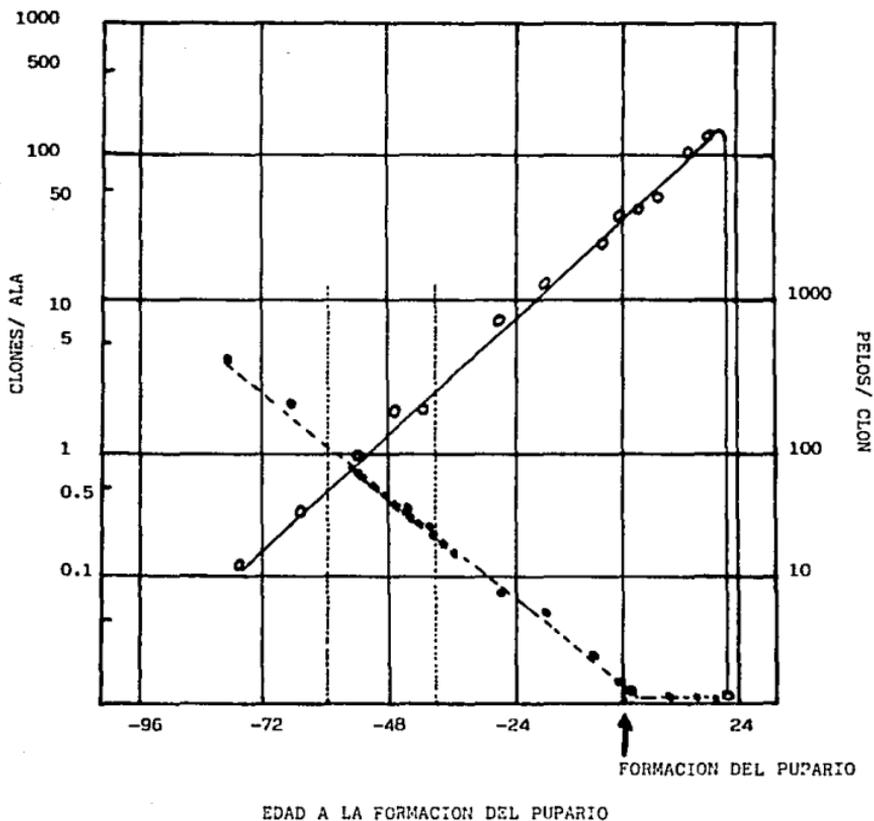


Figura 16. Frecuencia y tamaño de clones mwh inducidos a través del desarrollo de *Drosophila melanogaster* (Tomado de García-Bellido y Merriam 1971). El área marcada entre las líneas punteadas indica la edad aproximada al momento del tratamiento.

Cruza: hembras mwh/mwh X machos flr³/TM₃. Ser

Edad de las larvas al tratamiento: 72 ± 4 horas

Tratamiento: alimentación a larvas durante 6 horas

Control: sacarosa al 5%

Repeticiones: dos

Registro de datos: se analizan las alas a 40x y se registra el número y tamaño de manchas por zona

Análisis estadístico: se llevó a cabo según Frei y Würigler 1988.

Figura 17. Características del protocolo.

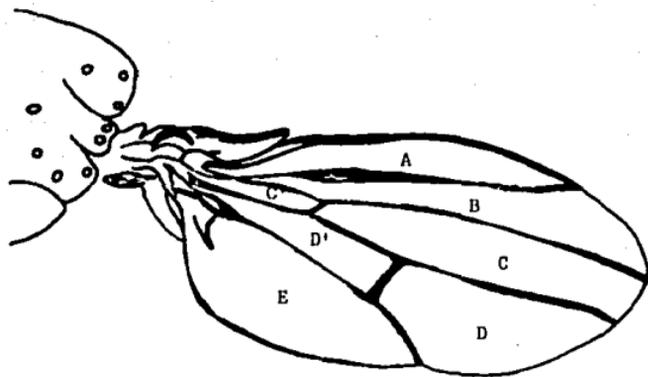


Figura 18. Medio mesotórax de *Drosophila melanogaster* mostrando la forma en la que se divide al ala para el registro de las manchas (Tomado de García-Bellido y Merriam 1971).

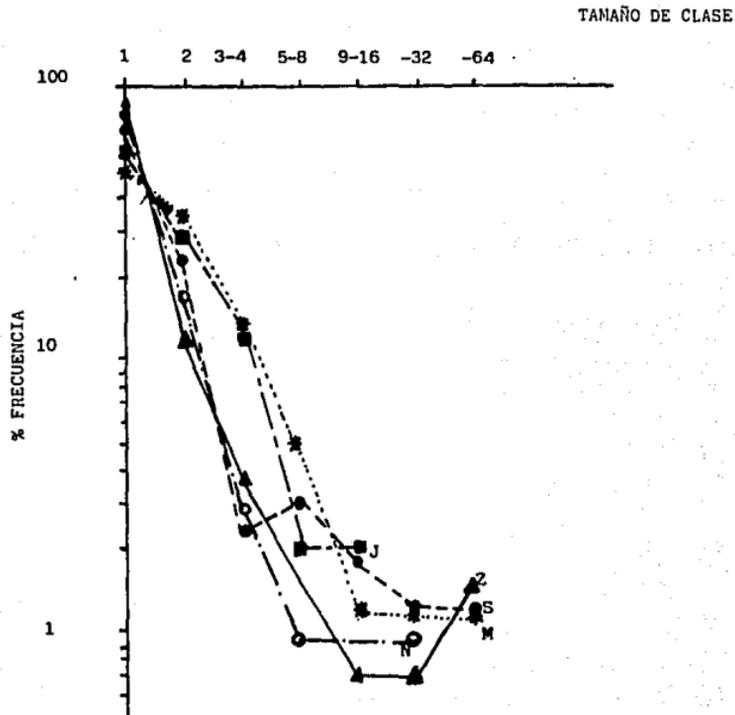


Figura 19. Distribución del tamaño de clase de manchas simples observadas en controles negativos para cinco laboratorios. J: Johannesburgo, N: Illinois, S: Schwerzenbach, Z: Zurich y M: México.

LINEA DE HEMBRAS y/y; mwh jv/ mwh jv

LINEA DE MACHOS y/y; Dp(1:3) sc^{j4}, flr/ TM1, Mé ri sbd²

CRUZA PROGENITORA

<u>y</u>	<u>mwh jv</u>	<u>y</u>	<u>Dp(1:3), flr</u>
y	mwh jv	y	TM1, Mé ri sbd ²

	y mwh jv	y mwh jv
y Dp(1:3), flr	<u>y mwh jv</u> <u>y Dp(1:3), flr</u> <u>silvestre</u>	<u>y mwh jv</u> <u>y Dp(1:3), flr</u> <u>silvestre+</u>
y TM1, Mé ri sbd ²	<u>y mwh jv</u> <u>y TM1, Mé ri sbd²</u> <u>cuerpo amarillo</u> <u>ojos Moiré</u>	<u>y mwh jv</u> <u>y TM1, Mé ri sbd²</u> <u>cuerpo amarillo</u> <u>ojos Moiré</u>

Figure 20. Esquema de la cruce empleada por Graf et al. (1984).

MANCHAS SIMPLES CHICAS

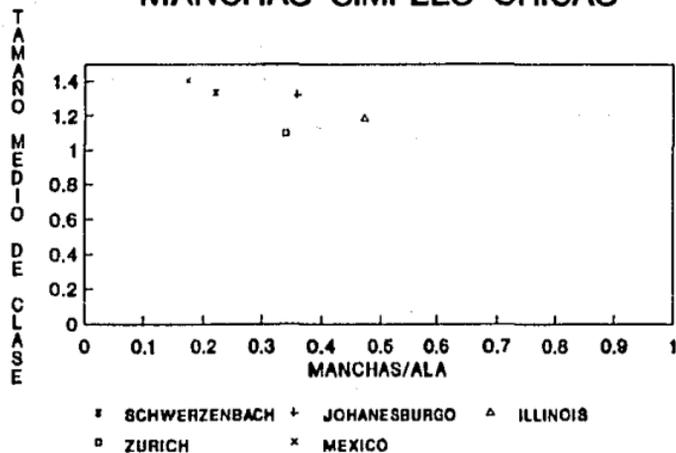


Fig. 21. Frecuencia de manchas chicas observadas en los controles negativos de cinco laboratorios

N-NITROSODIMETILAMINA
AL +72h POR 6 hr

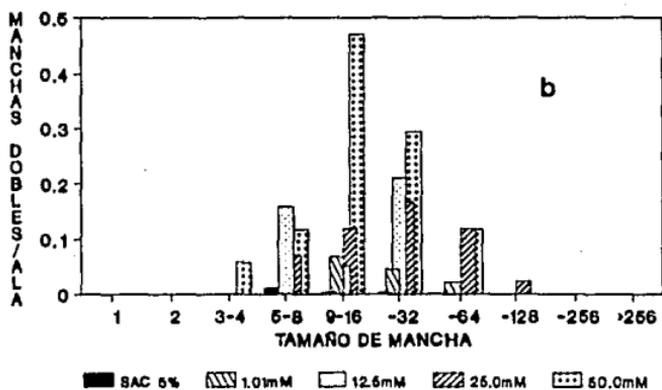
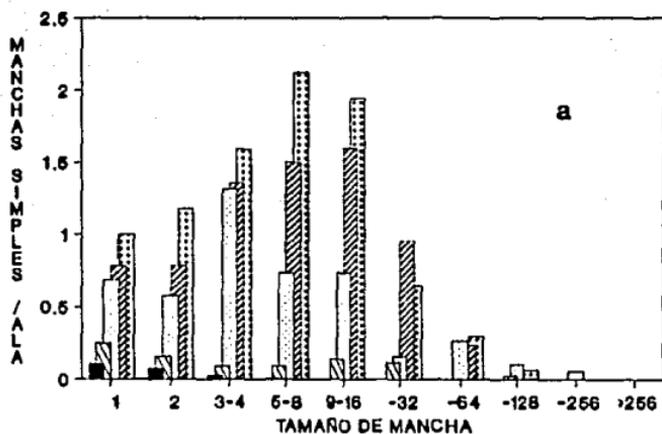


Figura 22. Manchas inducidas por ala por tamaño de clase con N-Nitrosodimetilamina
a) simples, b) dobles

N-NITROSODIETILAMINA
AL:72h POR 6 hr

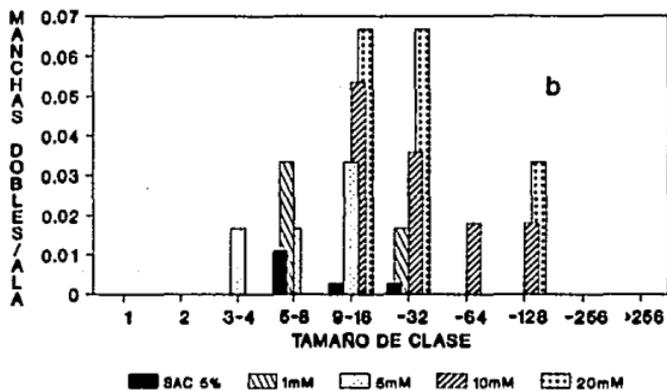
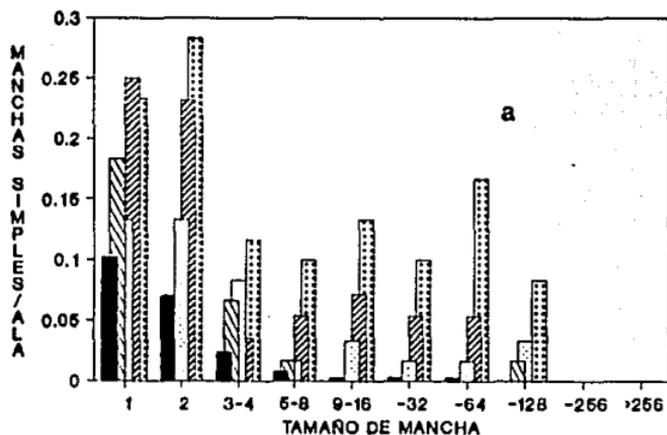


Figura 23. Manchas inducidas por ala por tamaño de clase con N-Nitrosodietilamina. a) simples, b)dobles.

METILMETANOSULFONATO
AL 72 h POR 6 h

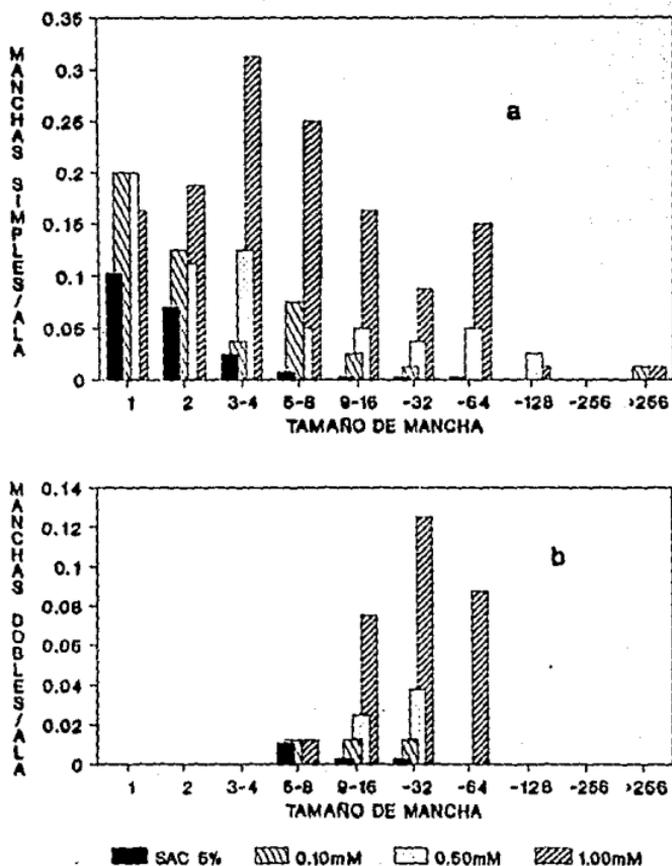
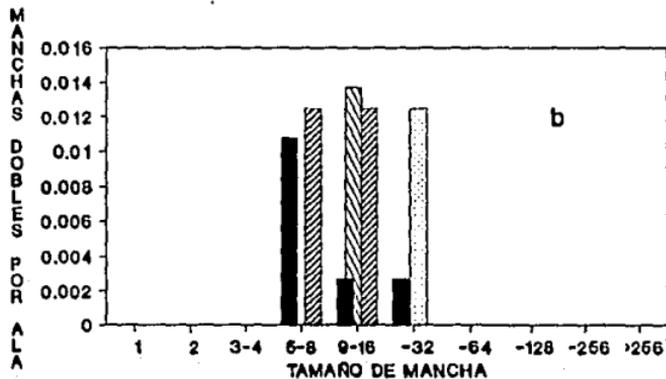
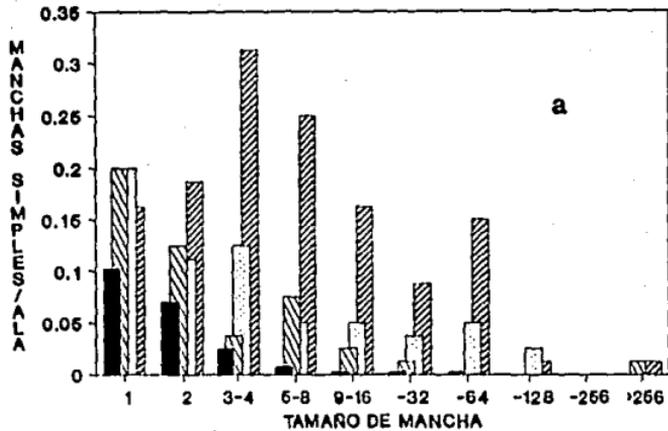


Fig. 24. Manchas inducidas por ala por tamaño de clase con Metilmetanosulfonato a) simples, b) dobles.

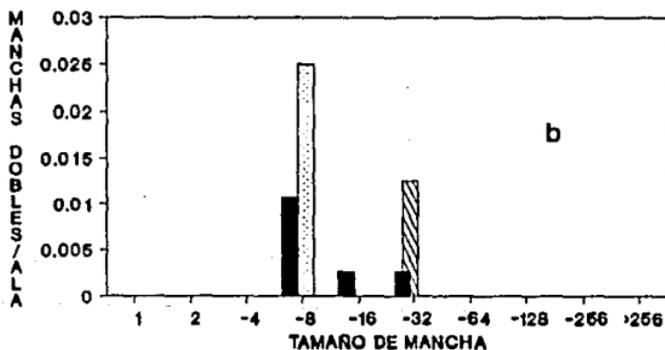
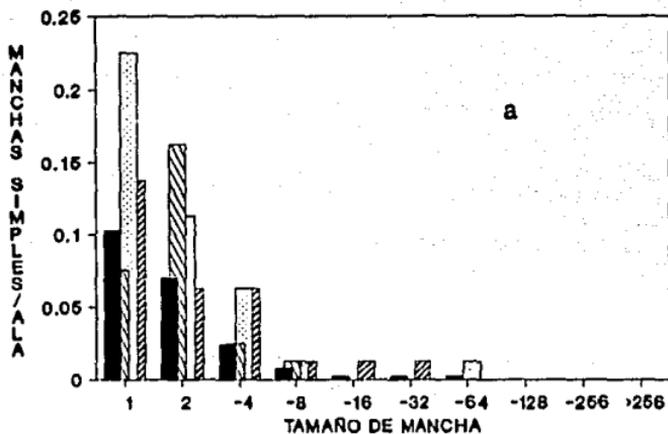
**β -PROPIOLACTONA
AL 72h POR 6h**



■ SAC 5% ▨ 25mM ▩ 50mM ▤ 100mM

Figura 25. Manchas inducidas por ala por tamaño de clase con β -Propiolactona, a) simples, b) dobles

AZIDA DE SODIO AL 72h POR 6 h



■ SAC 5% ▨ 7.3mM ▤ 9.8mM ▩ 14.7mM

Figura 26. Manchas inducidas por ala por tamaño de clase con Azida de Sodio
a) simples, b) dobles.

1. Características generales de los compuestos empleados.

COMPUESTO SIGLA Y CAS	^a CLASE QUIMICA	^b CARCINO- GENICIDAD	USO INDUSTRIAL.	USO TERAPEUTICO	EFFECTOS
N-NITROSODIMETILAMINA DMN. (62-75-9)	37	+	NO INDICADO	NO INDICADO	LESIONES SEVERAS EN HIGADO, RIONES Y PULMON.
N-NITROSODIETILAMINA DEN. (55-18-5)	37	+	ANTIOXIDANTE Y ADITIVO PARA GASOLINA Y LUBRICANTES.	NO INDICADO	LESIONES EN HIGADO, PULMONES Y ESOFAGO.
METIL-NETANO SULFONATO NMS. (66-27-3)	5	+	CATALIZADOR EN REACCIONES DE POLIMERIZACION, ALQUILACION Y ESTERIFICACION.	NO INDICADO	IRRITACION AL CON- TACTO CON LA PIEL.
BETA-PROPIOLACTONA β-PL. (57-57-8)	27	+	CATALIZADOR EN SINTESIS ORGANICAS	DESINFECTANTE.	NO INDICADOS.
AZIDA DE SODIO NaN ₃ . (26628-22-8)	28	?	EN LA PREPARACION DE AC. HI- DRAZOICO, AZIDA DE PLOMO Y SODIO PURO. EN LA CONSERVA- CION DE PRODUCTO QUIMICOS.	ANTIHIPERTENSIVO	NO INDICADO.

a. La clase química se tomó de la tabla IV de D.J. Brusick et al. 1980.

b. La carcinogenicidad se tomó de Griesner y Cueto (1980).

II. Frecuencias basales por tipo de mancha en la prueba de SMART en ala.

Laboratorio	No. alas.	Manchas simples chicas.		Manchas simples grandes.		Manchas dobles	
		No.	Fr.	No.	Fr.	No.	Fr.
Schwerzenbach	746	164	0.22	15	0.02	6	0.008
Johannesburg	234	85	0.36	5	0.02	15	0.06
Illinois	224	106	0.47	6	0.026	2	0.008
Zurich	398	136	0.34	10	0.025	11	0.028
México ^a	372	64	0.17	15	0.04	6	0.02
Würgler ^{a, b}			0.20		0.03		0.02

^a. Empleando la cruz $mwh \pm fr^3$.

^a. Datos de U.Graf, F.E. Würgler, H.Frel y A. Kägi, publicados por Würgler y Vogel (1986)

III. Resultados obtenidos con la prueba de SMART en ala de Drosophila melanogaster.

Conc. [mM]	Trata- miento.	Alas	Manchas Simples m=2		Manchas chicas m=5		Manchas grandes m=5		Clones sw/h	Media de tamaño de clase.	Frec. Ind. (10 ⁻⁵)			
			No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.				No.	Fr.	D.
Control (Sacarosa 5%)														
	A 6 h	372	64	0.17	15	0.04	6	0.02	84	1.94	0.9			
N-Nitrosodimetilamina														
1.01	A 6 h	44	18	0.41 +	20	0.45 +	6	0.14 +	39	3.21	3.6			
12.5	A 6 h	19	24	1.26 +	64	3.37 +	8	0.42 +	55	3.25	11.9			
25.0	A 6 h	42	66	1.57 +	237	5.64 +	21	0.50 +	242	3.82	23.6			
50.0	A 6 h	17	37	2.18 +	113	6.65 +	18	1.06 +	132	3.61	31.9			
N-Nitrosodietilamina														
1.00	A 6 h	80	11	0.14 -	6	0.08 -	4	0.05 f	21	2.48	1.1			
5.00	A 6 h	80	16	0.20 -	12	0.15 +	4	0.05 f	32	3.00	2.5			
10.00	A 6 h	76	27	0.36 +	15	0.20 +	7	0.09 +	47	3.11	2.5			
20.00	A 6 h	80	31	0.39 +	42	0.52 +	10	0.12 +	74	3.77	3.8			
Metilmetanosulfonato.														
0.10	A 6 h	80	26	0.32 +	13	0.16 +	3	0.04 f	39	2.33	2.0			
0.50	A 6 h	80	25	0.31 +	27	0.34 +	5	0.06 +	48	3.08	2.5			
1.00	A 6 h	80	28	0.35 +	79	0.99 +	24	0.30 +	102	3.95	5.2			
β-propiolactona.														
25.0	A 6 h	73	12	0.16 -	3	0.04 -	1	0.01 -	16	2.44	0.9			
50.0	A 6 h	80	19	0.24 f	11	0.14 +	1	0.01 -	31	2.81	1.6			
100.0	A 6 h	80	19	0.24 f	19	0.24 +	2	0.03 -	39	2.67	2.0			
Azida de Sodio														
7.3	A 6 h	80	19	0.24 f	3	0.04 -	1	0.01 -	21	1.90	1.1			
9.8	A 6 h	80	27	0.34 +	7	0.09 -	2	0.03 -	34	1.79	1.7			
14.7	A 6 h	80	16	0.20 -	8	0.10 (+)	0	0.00 -	24	2.12	1.2			

El análisis estadístico se realizó con la prueba de χ^2 de proporciones ($P < 0.05$) y con el programa de cómputo SMART (Würgler y Frel 1989, sin publicar).

IV. Resultados obtenidos en el presente trabajo comparados con los reportados en la literatura para SMART y SLRLT^a

U.N.A.M. 1990		Würgler 1985.		SLRLT. ^b	
[mM]	Conc. ^a	[mM]	Conc. ^a	[mM]	Conc. ^a
N-Nitrosodimetilamina					
50	+	50	+		
25	+				
12.5	+			10	+
1.01	+			1.0	+
N-Nitrosodietilamina					
20	+	20	+		
10	+			10	+
5	(+)			7.5	+
1	-				
Metilmetano Sulfonato					
1	+	0.118-117.5	+	1	+
0.5	+			0.5	+
0.1	+			0.1	+
β-propiolactona					
----		200	+		
100	(+)	100	+		
50	(+)				
25	-				

a. Conclusiones: +, positivo, (+), mutágeno débil, -, negativo. ($P < 0.05$).

b. Datos tomados de Kortselius (1979), Lee *et al.*, (1983), Vogel y Waterajan (1979) y Vogel *et al.*, (1981).

CONSERVACIÓN DE LA SALUD
 CON LA SALUD DE LA COMUNIDAD
 CON LA SALUD DE LA COMUNIDAD
 CON LA SALUD DE LA COMUNIDAD