



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

151
24

**“VALORACION DE LA PRUEBA PARA DETECCION DE
MUTACION Y RECOMBINACION SOMATICA (SMART)
EN LAS CELULAS DEL OJO DE *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

MARIA GUADALUPE ORDAZ TELLEZ
Dir: M en C. PATRICIA RAMOS M.

MEXICO, D. F.

EXALLA DE ORIGEN

1991



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
INTRODUCCION.....	1
MATERIAL Y METODOS.....	21
RESULTADOS.....	27
DISCUSION.....	29
CONCLUSIONES.....	35
REFERENCIAS.....	36
Figuras.....	49
Tablas.....	89

RESUMEN

Recientemente se ha propuesto el empleo de células somáticas de *Drosophila melanogaster* en un sistema, que permite detectar aquellos agentes químicos capaces de inducir mutaciones y recombinación en células somáticas (SMART). Emplea células de los discos imagales de las larvas, las cuales se encuentran ya determinadas genéticamente y permanecen en un número reducido hasta entrar a la etapa de metamorfosis (donde se llevan a cabo una serie de divisiones mitóticas que darán lugar a las diversas estructuras del adulto). El propósito de este trabajo fue el de calibrar el sistema de prueba SMART (Somatic mutation and recombination test) en células de los ojos de *Drosophila* utilizando 5 mutágenos de referencia: DMN, DEN, MMS, β -PL, MMC que son agentes alquilantes que requieren de activación metabólica excepto el MMS que es un agente de acción directa.

Se expusieron larvas de 72 ± 4 horas de edad, a los agentes sujetos a prueba durante 6 horas (tratamiento agudo), el testigo negativo fué sacarosa al 5% . La variable de respuesta analizada son las células pigmentarias primarias. Se comparó la frecuencia y el tamaño de las manchas tanto en las series tratadas como en el control, y para hembras y machos respectivamente, a una $P = 0.05$. El orden de inducción de manchas obtenido fué: MMC > MMS > DMN > DEN > β -PL en hembras y MMS > MMC > β -PL > DEN > DMN en machos.

I. INTRODUCCION

El ambiente contiene un número cada vez mayor de productos químicos capaces de producir daño genético con efectos a corto, mediano y largo plazo, se calcula que más de 50,000 productos químicos distintos son elaborados por el hombre para uso comercial e industrial, cada año entran al mercado entre 500 y 1000 productos químicos nuevos (Albert, 1988). La contaminación ambiental por agentes químicos potencialmente tóxicos, constituye en la actualidad una preocupación a nivel mundial por los riesgos que ocasiona en la salud humana, se sabe que ciertas características químicas y físicas tienen importancia para estimar el peligro potencial que entrañan los agentes tóxicos ambientales. Además de la información en cuanto a los efectos sobre los diferentes organismos, es esencial conocer sus propiedades para predecir el impacto ambiental, capacidad de degradación de la sustancia, movilidad por el aire, agua y suelo, que ocurra o no bioacumulación, transporte de la sustancia y bioamplificación de sus efectos por las cadenas alimenticias. Los productos químicos que se degradan pobremente (por vías bióticas o abióticas), manifiestan persistencia ambiental y por lo tanto, pueden acumularse. Las sustancias lipofílicas tienden a acumularse en la grasa corporal. Cuando el agente tóxico se incorpora en la cadena alimenticia, ocurre bioamplificación en el momento en que una especie se alimenta de otras y concentra el producto químico (Pfla 1990), por lo cual es necesario conocer la manera en que se pueden emplear estas sustancias sin que sean peligrosas para el hombre y el ambiente.

La contaminación ha sido un fenómeno paralelo a los procesos tecnológicos, la industrialización y la creación de grandes centros urbanos han hecho que se contamine el aire, el agua y el suelo. Las causas principales de contaminación se relacionan con la producción y el empleo de productos químicos industriales y el aumento de la actividad agrícola.

Ciertas sustancias pueden ser mutagénicas, carcinogénicas o teratogénicas.

Una sustancia mutagénica es aquella que produce un cambio genético que se manifiesta en la descendencia como alteraciones hereditarias (células germinales), mientras que las mutaciones en células somáticas están asociadas con la carcinogénesis. (Beranek 1990). La mayoría de los carcinógenos son mutágenos (Suzuki 1990 y Avers 1984).

Un teratógeno es cualquier agente susceptible de provocar malformaciones congénitas, actúa a nivel de las células de los tejidos en desarrollo, principalmente durante la organogénesis, como anomalías anatómicas que se expresan al nacer. Durante las dos primeras semanas de desarrollo, los agentes teratógenos pueden ocasionar la muerte al embrión. (More, 1979).

Se han encontrado agentes mutagénicos entre los químicos utilizados como aditivos de alimentos, medicamentos, cosméticos, pesticidas y otros contaminantes ambientales. En la tabla I se muestra una clasificación de los mutágenos ambientales propuesta por (Motschen 1985). Así el mercurio, es un metal pesado que es tóxico a niveles bajos; el humo de los cigarrillos y los tintes del cabello contienen también productos mutagénicos, los nitritos que son utilizados para mejorar el color de

algunas carnes, el edulcorante artificial ciclamato, es mutagénico en algunos sistemas de prueba y su uso se ha restringido en muchos países. Estos son solo algunos ejemplos de los miles de productos a los que están expuestos los seres vivos (Jenkins, 1982).

El hombre interactúa con una gran variedad de agentes físicos y químicos de forma accidental, laboral y/o voluntaria (Sorsa *et al.* 1982), las sustancias pueden entrar al organismo mediante diversas rutas como: ingestión, inhalación, vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea y dérmica (Fig. 1), la principal ruta de distribución en el organismo es el sistema circulatorio, mediante el cual los químicos son transportados por todo el organismo y posteriormente son excretados o bien almacenados en determinados tejidos (Klaassen, 1975).

La vía de entrada de las sustancias químicas en el cuerpo difiere en las distintas formas de exposición. En el ambiente industrial la vía principal de entrada es la inhalación. Es también muy importante la vía cutánea, pero la vía oral es relativamente menor, por lo tanto, las medidas preventivas se diseñan principalmente para eliminar o controlar la absorción por inhalación o por contacto. Los contaminantes atmosféricos logran entrar en el cuerpo por inhalación, mientras que para los contaminantes del agua y del suelo la vía principal de exposición del hombre es la ingestión (Plaa 1990).

Los químicos pueden ser clasificados de acuerdo al tipo de acción que presentan; así se considera un agente de acción directa a aquel compuesto químico que no requiere ser metabolizado para producir su efecto tóxico, mientras que un compuesto de acción indirecta, requiere ser transformado previamente a través del metabolismo (Norton 1975).

Ciertos agentes físicos y químicos presentes en el ambiente incrementan la incidencia de cáncer (Devoret 1979). La mayoría de los químicos carcinógenos exhiben su actividad iniciadora a través de interacciones con el ADN lo que origina daños genéticos como mutaciones y aberraciones cromosómicas (Fig.2),

La presencia de estos compuestos en el ambiente conduce a desarrollar metodologías sensibles y rápidas para detectarlos, por lo que es necesario identificar aquellas sustancias potencialmente cancerígenas así como buscar alternativas para disminuir las concentraciones de las ya existentes en el ambiente (Castañeda 1988). De esta manera se justifica la investigación de los efectos mutagénicos de los contaminantes, no solo para evaluar el riesgo potencial para la población o prole que están expuestas a agentes físicos o químicos, sino también, como herramienta para determinar su potencial cancerígeno. En comparación con los estudios que evalúan carcinogenicidad, las pruebas que determinan la capacidad mutagénica de un compuesto son de menor costo y duración (días o semanas) (Vogel 1987 y Brusick 1988).

El campo al que se hace referencia es de la Genética Toxicológica, que estudia los efectos provocados por contaminantes en los seres vivos con el fin de determinar las condiciones en las cuales un agente químico no es capaz de producir daño, a través de bioensayos animales en los cuales las respuestas podrían ser similares a las que se presentarían en el hombre bajo ciertas condiciones de exposición (Casaret 1975 y Brusick 1987). Los bioensayos son evaluados en base a su capacidad de respuesta y son seleccionados aquellos que resulten sensibles y puedan evaluar los diferentes tipos de daños (Brusick 1987).

Los resultados obtenidos a partir de las pruebas mutagénicas pueden ser de gran utilidad para:

1. Identificar posibles constituyentes carcinógenicos en una mezcla compleja tal como los alimentos.
2. Determinar el tipo de interacción química del compuesto en el organismo.
3. Establecer los mecanismos genéticos involucrados.

La gran variedad de compuestos es uno de los principales problemas en los estudios de la evaluación de riesgo, ya que a menudo la exposición involucra a más de un contaminante (Zijlstra 1987).

Los contaminantes pueden ser tanto de origen natural como de origen antropogénico, estos últimos son los más abundantes en el ambiente (Albert 1988 y Fishbein 1981).

El daño genético puede ser causado tanto en células somáticas como en germinales. Cuando el daño es ocasionado en las células germinales se hereda a las futuras generaciones y cuando ocurre en células somáticas se expresa en el organismo afectado.

Para la determinación genotóxica de los químicos se requiere necesariamente del empleo de organismos con diversos niveles de organización (que van desde bacterias hasta mamíferos), debido a que si bien el ADN es la molécula hereditaria universal, el impacto que reciben los organismos resulta distinto por las diferentes barreras que los químicos han de atravesar para poder interactuar con él. En la actualidad se cuenta con una gran diversidad de ensayos experimentales que proporcionan información sobre el peligro que implica la exposición a ciertos químicos. (Klaassen 1975 y Brusick 1987 y 1988).

Las características principales que debe de tener un sistema de prueba son: que sea sensible, que pueda detectar bajas concentraciones del mutágeno, reproducible, de corta duración, bajo costo y que analice un amplio espectro de mutaciones. (Brusick, 1987).

Existe una gran variedad de pruebas de corto-tiempo que se han desarrollado para detectar agentes mutagénicos (Tabla II), dentro de estas se encuentra el sistema, que emplea a *Drosophila melanogaster*, el cual es uno de los organismos de bioensayo más rápido, versátil y eficiente con el que pueden analizarse un amplio espectro de alteraciones genéticas inducidas por agentes ambientales, las ventajas que brinda este ensayo se muestran en la figura 3.

Entre los ensayos de mutagénesis realizados en *Drosophila melanogaster* se encuentran :

La Prueba de no disyunción y pérdida de cromosomas sexuales (SCLT; Sex Chromosome Loss Test), la cual valora el efecto clastogénico y la no disyunción de cromosomas a través del análisis de la pérdida parcial de marcadores fenotípicos y la ganancia o pérdida de cromosomas sexuales, el tiempo requerido es de una sola generación (Fig. 4) (Castañeda, 1988).

La Prueba de letales recesivos ligados al sexo (SLRLT; Sex-linked Recessive Lethal Test), valora la aparición de letales recesivos ligados al sexo como producto de eventos genéticos del tipo de mutación puntual y aberraciones estructurales, es una de las pruebas más sensibles para la detección de los efectos mutagénicos inducido por agentes químicos, involucra simultaneamente entre 600 y 800 loci del cromosoma X que equivale al 80% del cromosoma o una quinta parte de este, el cual consta aproximadamente de 5000 genes (Gaytan 1988); emplea células germinales, la generación analizada es la generación filial F₂; Con este sistema se han probado 421 compuestos, 198 tienen una respuesta mutagénica, 46 fueron clasificados no mutagénicos y 177 han dado resultados inconcluyentes, (Lee et al. 1983 y Vogel, 1987). La correlación entre actividad carcinogénica y mutagénica en el ensayo de letales es excelente, entre 83% (85/102) y 91% (50/55) de los carcinógenos probados son mutagénicos en *Drosophila* (Würgler y Vogel 1986 y Wilbourn et al. 1986) (Fig.5).

Este sistema es específico, lo que indica que en general un resultado positivo en SLRL es probablemente correcto, pero un resultado negativo es poco significativo (Vogel 1987). Una desventaja del sistema es el tiempo y costo en comparación con otros bioensayos, como las bacterianos y los cultivos de células animales.

El sistema más reciente es **La prueba de inducción de Mutación y Recombinación Somática (SMART; Somatic Mutation and Recombination Test)**. En general, los ensayos de mutación somática se basan en una sola generación de moscas, con un genotipo tal que un evento mutacional en las células de los discos imaginales origina un cambio que se manifiesta fenotípicamente en todas las células hijas a partir de la célula madre mutante, se produce así un clon que se expresará como una mancha en el organismo adulto, cuando se utilizan los marcadores apropiados (Fig. 6) (Baker *et al* 1978 y Vogel y Szakmary 1990). Existen diferentes protocolos, los más utilizados son:

- 1.- El sistema de mosaico en ala, el cual emplea dos marcadores genéticos que son específicos para la forma de los tricomas del ala, *mwh* y *flr*³; se localizan en el brazo derecho del cromosoma tres, fué desarrollado por Graf y colaboradores en 1983 (Vogel *et al.* 1985).
- 2.- El sistema de mosaico en ojo *white+* / *white* que utiliza dos marcadores ligados al sexo, desarrollado por Becker en 1966. En la Tabla III se comparan ambos sistemas.

Una desventaja de la prueba de letales (SLRLT) ha sido el tiempo empleado para realizar este bioensayo, el cual dura aproximadamente 3 meses (Lee *et al.* 1983 y Gaytan 1988), mientras que el más novedoso bioensayo SMART en *Drosophila melanogaster* ha resultado ser un sistema capaz de detectar un amplio espectro de agentes genotóxicos, incluyendo un número de procarcinógenos que no han sido correctamente identificados por la prueba de SLRLT.

Este sistema permite acortar al tiempo del ensayo a una sola generación (10 días), es un bioensayo técnicamente sencillo, el costo es sumamente barato y sensible. Además involucra un número de células elevado por organismo (24,400 células para el protocolo que emplea las alas y 800 omatidias el que emplea los ojos del insecto). (Clements y Vogel 1988, Clements *et al.* 1988), se emplean células de los discos imagales de las larvas, los que posteriormente darán origen a las distintas partes del cuerpo del imago.

Es un sistema nuevo que permite detectar la capacidad de los agentes químicos para inducir mutación y recombinación a nivel somático, este tipo de estudios cobran día a día gran importancia debido a que existe correlación entre la actividad recombinogénica y la carcinogénesis. En la Tabla IV se comparan ambas pruebas.

Biología del desarrollo.

Desde el momento en que la larva eclosiona del huevo hasta que emerge el imago (adulto), el ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* es aproximadamente de 192 horas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, la larva pasa por tres estadios y dos mudas larvales, la primera muda ocurre a las 25 horas y la segunda a las 48, la formación del pupario se dá aproximadamente a las 96 horas (Fig 7) (Demerec 1965 y Roberts 1986).

Después de un día de desarrollo embrionario, eclosiona del huevo una pequeña larva, su cuerpo se encuentra formado por doce segmentos no aparentes: 1 segmento de la cabeza, 3 torácicos y 8 abdominales. La pared del cuerpo de la larva esta formada por una cutícula externa no celular y por una epidermis celular interna, la cutícula esta formada por dos capas: una externa llamada exocutícula, y la interna o endocutícula.

La cutícula de cada segmento lleva en el borde anterior un anillo con pequeños ganchos quitinosos que se originan a partir de la exocutícula, una característica principal del segmento de la cabeza es la presencia de los ganchos bucales que son de color obscuro, estos son remplazados en cada muda. Las estructuras internas de la larva son fácilmente distinguibles cuando se observan a traves de la luz, ya que su cuerpo es translúcido. En la figura 8 se muestran las diferentes estructuras internas de la larva (Demerec 1965).

La larva presenta dos linajes celulares diferentes; las células larvarias y las imagales.

Las células imagales (no estan involucradas en la formación del cuerpo de la larva) son distinguibles de las células larvales por su tamaño pequeño, constitución cromosómica diploide, retención de la capacidad de división celular, y porque alcanzan su diferenciación hasta que entran a la etapa de metamorfosis. Los discos imagales aumentan de tamaño por mitosis, las cuales ocurren a determinados tiempos durante el desarrollo larvario (Fig 9). Las células larvarias forman el cuerpo de la larva, estas células han perdido su capacidad de división y solamente aumentan de tamaño, en algunas se presentan cromosomas politénicos, son poliploides y están determinadas genéticamente (Demerec 1965, Wilkins 1986, Würgler y Vogel 1981, Pomerai 1990).

En la figura 10 se muestra cada uno de los discos imagales; solamente el disco imagal del ojo muestra indicios de diferenciación temprana, ya que revela la presencia de omatidias precursoras en el último estadio larvario (Wilkins. 1986)

Durante la metamorfosis, la hormona ecdisterona desencadena una serie de cambios en el organismo, este proceso involucra la destrucción de ciertos tejidos y órganos larvales (histólisis) y la organización de las estructuras del adulto a partir de un complejo de células primitivas, los discos imagales. Los órganos que son completamente histolizados durante la metamorfosis son las glándulas salivales, el intestino, los cuerpos grasos y los músculos. Todos los órganos del imago son formados a partir de los discos imagales ya presentes en la larva o por células larvarias que se diferencian en el momento de la reorganización del estado pupal, los tubos de Malpigi son relativamente poco alterados durante la metamorfosis aunque sí sufren algunos cambios en su composición estructural, el tórax se forma por la

combinación de varios discos imagales. Las extremidades, ojos, antena, ala y el aparato genital se diferencian a partir de su respectivo disco imagal que sufre una histogénesis durante el desarrollo pupal dando origen a las distintas partes del cuerpo del adulto (Fig 11 y 12),(Demerec 1965 y Wilkins, 1986).

DESARROLLO DEL OJO:

Aproximadamente a las 16 horas después de la eclosión de la larva, Chen encontró indicios de la presencia del complejo cefálico de los discos antenal-ocular (Demerec, 1965).

En la larva de 25 horas de edad el complejo cefálico está compuesto por dos sacos frontales los cuales se originan por evaginaciones de la pared dorsal de la faringe, a las 48 horas el complejo antenal-ocular empieza a incrementar su tamaño; el pedúnculo del ojo unido al cerebro ya es evidente. Semejante a otros discos imagales, el complejo antenal-ocular crece durante el periodo larval por multiplicación celular y el tamaño de las células permanece constante. A las 51 horas el complejo antenal-ocular adquiere una forma ovalada integrada por varias capas celulares, el tallo óptico esta claramente presente a las 56 horas, la porción anterior del complejo se ha elongado.

El complejo se incrementa en tamaño (64 horas), la porción anterior está ensanchada y la porción posterior empieza a ampliarse, la diferenciación del complejo hacia los discos de antena y ojo propiamente ha empezado.

A las 74 horas se distingue claramente la porción anterior y la posterior, los discos de antena y ojo se distinguen perfectamente y a las 80 horas están bien formados, están conectados por una delgada capa de células e incrementan su tamaño.

El disco de la antena empieza a plegarse (86 horas), probablemente en este tiempo también las células del disco del ojo inician su organización hacia unidades, tales unidades se observan por primera vez en larvas de 96 horas, cada una de estas unidades consiste de un grupo de cuatro células, solo unos pocos de estos grupos están presentes, pero se incrementan en número conforme el ojo se desarrolla.

Steinberg en 1943 (citado por Demerec 1965) estudió el desarrollo del ojo de *Drosophila* y propuso que cada grupo es precursor de una omatidia. La segmentación del disco de la antena continúa (106 horas), hasta que a las 120 horas los discos han llegado a su tamaño máximo, las células (4) agrupadas se arreglan en hileras; se termina la segmentación del disco antenal-ocular (Demerec 1965 y Wilkins 1986).

Los ojos compuestos (Fig. 13) están constituidos por un conjunto de pequeñas unidades llamadas omatidias, que son elementos visibles independientes, en la mayor parte de los insectos las omatidias están íntimamente unidas y adoptan una forma hexagonal. En el ojo de *Drosophila melanogaster* el ojo compuesto consiste de 780 a 800 omatidias (Fig. 14 A). Externamente cada omatidia está formada por una lente cornea distal hexagonal (C), debajo de la cornea están localizadas 4 células glandulares que secretan un material semilíquido el cual llena la región del pseudocono (ps), el núcleo de cada célula del pseudocono (ncp) está orientado en la base de las células primarias pigmentarias (cpp).

Las células pigmentarias secundarias (cps) están presentes rodeando a la omatidia, se extienden desde la región del pseudocono a la membrana basal, sus nucleos están localizados aproximadamente al mismo nivel que los nucleos de las células del pseudocono. Un corte transversal de esta región (Fig.14 B-E) muestra la manera en la cual las células secundarias pigmentarias forman una envoltura protectora de pigmento alrededor de las células visuales y la manera en la cual los cuatro nucleos del pseudocono rodean el extremo de los siete rabdómeros (R).

Una omatidia normal está formada por ocho retinulas, de las cuales 7 son células largas, cada una contiene un rabdómero (R) a lo largo de la porción media de la célula, seis de las células retinulares tienen sus nucleos (nr) en la porción superior de la célula pero en la séptima célula retinular su núcleo (nr₇) se localiza más cerca a la membrana basal. La octava retínula es una célula pequeña rudimentaria sin rabdómero y su núcleo (nr₈) está justamente arriba de la membrana basal. Un corte transversal revela que estas ocho retinulas forman una roseta de células con los siete rabdómeros que constituyen un rabdómero sensorial en el centro.

Las fibras nerviosas pasan desde las retinulas a través de la membrana basal (mb) hacia la región postretinal (rp) y después hacia la placa ganglionar exterior del cerebro, una región compuesta de neuronas monopolares (nm) (Clayton 1952 y Demerec 1965) (Fig.14 A).

Vogel et al. (1989) obtiene información experimental de la biología del desarrollo de *D. melanogaster* mediante el uso de rayos X. Proponen que el número de células precursoras de omatidias es de aproximadamente 20 en el primer estadio larval, se incrementa a 150-200 células durante el segundo estadio y alcanza de 780

a 800 células pre-omatiídias en el tercer estadio, después de 3-4 divisiones celulares (Tabla V). La diferenciación de las células primordiales tiene lugar durante el tercer estadio larvario. Los linajes celulares productores de células pigmentadas primarias se establecen durante la primera ola de actividad mitótica que migra a través del ojo en el tercer estadio larvario (Fig.15); la mayoría de las células pigmentarias se producen en la división mitótica de la segunda ola de división. Las células primordiales del ojo compuesto se dividen continuamente durante el período larval y cualquier alteración genética en estas células puede ser reconocida como manchas blancas en el contexto rojo del ojo compuesto del adulto (Fig 16).

Los clones inducidos al principio del primer estadio larvario son de tamaño grande mientras aquellos que se producen en el segundo o tercer estadio larvario, son sucesivamente más pequeños.

La clasificación del tamaño de mancha y el análisis de la distribución del tamaño del clon pueden usarse para estimar el tiempo de la inducción del evento mutacional (Vogel y Zijlstra 1987).

El tamaño promedio de las manchas inducidas depende de varios factores tales como el tipo de tratamiento utilizado en el protocolo, el mutágeno empleado, la dosis, edad de la larva en el momento del tratamiento. Este sistema detecta un amplio espectro de alteraciones como recombinación mitótica, delección, mutación somática y pérdida de una cromatida, las cuales pueden originar un clon mutante w/w, w/0 (Fig. 22 y 23).

Para valorar una prueba se emplean varios compuestos de referencia, es decir agentes cuyos efectos son conocidos genéticamente por su capacidad de inducción de daño genético en diferentes organismos 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, se usan para someter a los organismos a la misma manipulación que los grupos tratados; conocer la frecuencia basal o espontánea de la alteración que se pretende analizar; así como evaluar la sensibilidad y especificidad que presenta el sistema (Vogel 1987, Brusick 1987 y Delgado 1990).

En este estudio se emplearon los siguientes compuestos de referencia:

N-Nitrosodimetilamina (DMN): es un agente alquilante, potente carcinógeno (EMS 1976) induce tumores en diferentes partes del organismo según la ruta de administración, por ejemplo a dosis de 25 ppm y 50 ppm de DMN en la dieta de conejos ocasiona carcinomas hepatocelulares, en ratas sometidas a inhalación repetidas de DMN se inducen tumores en las cavidades nasales y en el riñón; cuando se administra por vía oral a diferentes líneas de ratones provoca sarcomas, carcinomas y adenomas en pulmón, en *Drosophila melanogaster* induce letales recesivos ligados al sexo y pérdida cromosómica (Vogel y Natarajan 1979 a y b).

El descubrimiento de la actividad carcinogénica de la N-nitrosodimetilamina ha permitido establecer que los compuestos N-nitroso y otros agentes alquilantes pueden ser una clase importante de compuestos carcinogénicos, el contacto

humano con agentes alquilantes es exógeno debido al estilo de vida u ocupación y endógeno por la formación de compuestos N- Nitrosos dentro del organismo (Laval et al 1990). Se ha encontrado en pequeñas cantidades en muestras de humo condensado de tabaco, en carnes curadas como el tocino, y el pescado salado y ahumado; también se utiliza como solvente y en la síntesis del combustible 1-1 dimetilhidrazina. El DMN se forma por la interacción del nitrito con dimetilamina y por la acción de bacterias reductoras de nitrato. Es usado como solvente en la industria del plástico y la fibra, como antioxidante, aditivo para lubricantes y en condensadores para incrementar la constante dieléctrica, también se usa como nematocida. El DMN es un líquido amarillo de baja viscosidad, miscible en agua, soluble en la mayoría de los solventes orgánicos y en lípidos, muy volátil, su fórmula química es $(CH_3)_2 NNO$, está formado por C (32.42%), H (8.16%), N (37.82%) y O (21.60 %), peso molecular; 74.08 g, densidad; 1.0048 (Index Merck 1989).

La Nitrosodietilamina (DEN): es un agente alquilante de acción indirecta, produce lesiones en hígado, pulmones y esófago, en diferentes especies (ratón, criceto, perros, peces, monos) Los principales órganos blancos son: la cavidad nasal, tráquea, pulmón, esófago, e hígado; induce tumores con las diferentes rutas de administración; incrementa la presencia de letales recesivos en Drosophila y la pérdida cromosómica, (Vogel y Natarajan 1979 a y b).

Se ha encontrado en pequeñas cantidades en el humo del cigarrillo condensado, en algunos alimentos procesados, se forma por la interacción del nitrito con dietilamina y por la acción de bacterias reductoras de nitrato, es utilizado como solvente en la industria de la fibra, como aditivo para gasolina y lubricantes, además es empleado

en condensadores que incrementan la constante dieléctrica y como antioxidante. Comercialmente se encuentra como líquido amarillo, soluble en agua, alcohol y éter, esta formado por C (47.04%), H (9.87%), N (27.43%) y O (15.66%), siendo su fórmula química es $(\text{CH}_3\text{-CH}_2)_2 \text{NNO}$, su peso molecular 102.14 y su densidad 0.9422 (Index Merck 1989).

El Metil-Metano Sufonato (MMS): es un metil éster del ácido metanosulfónico, se usa como catalizador en reacciones de polimerización, alquilación y esterificación, como disolvente, es un agente mutágeno de acción directa, formado por C(21.81%), H(5.49%), O(43.58%), S(29.11%), su fórmula química es $\text{C}_2 \text{H}_6 \text{O}_3 \text{S}$; su peso molecular 110.13 y su densidad 1.2943. Es un líquido soluble en agua y ligeramente en solventes no polares (Index Merck 1989 y Reynolds 1989)

La B-propiolactona (B-PI): es un agente carcinógeno indirecto, La base de su acción alquilante se centra en su anillo rígido (Goldstein et al 1974 y Kortselius 1979), induce letales recesivos ligados al sexo en *Drosophila*, causa citotoxicidad y severos daños. utilizado como desinfectante en terapia, el cual es muy activo contra las bacterias Gram-positivo, Gram negativo, hongos y virus, se emplea como intermediario en la síntesis orgánica, está formado por C (50.00%), H (5.60%) y O (44.41%), su peso molecular 72.06, siendo su fórmula química $\text{C}_3 \text{H}_4 \text{O}_2$ soluble en

agua, alcohol, éter y cloroformo. Se prepara a partir de la condensación de acetona con el formaldehído. Los vapores de este compuesto son utilizados en la esterilización de material farmacéutico y quirúrgico y para desinfectar áreas cerradas, La vida media de B-PL a 25° es de 3.5 hrs.

La Mitomicina C (MMC): es un antibiótico aislado de Streptomyces caespitosus. contiene grupos quinona, carbamato y aziridina y todos ellos pueden ser activados, el medicamento es un agente altamente tóxico con propiedades antineoplásicas, disponible para uso clínico, es el mejor medicamento utilizado en contra de las células tumorales hipóxicas y al parecer tiene una utilidad cada vez mayor en la quimioterapia combinada (con bleomicina y vincristina) para el carcinoma de células escamosas del cuello uterino y para los adenocarcinomas del estómago, páncreas y pulmones. El medicamento también tiene cierta utilidad como agente alternativo para el cáncer metastásico de colon (Salmon y Alan 1990).

Se activa por vía enzimática dentro de las células y actúa como agente alquilante bifuncional o trifuncional, forma enlaces cruzados en el ADN, actúa con la guanina y la citosina, principalmente durante la fase G₂ y S del ciclo celular. Inhibe la síntesis de DNA, RNA y de proteínas (Carranza 1990, Reynolds 1989 y Schewe et al 1971). Su fórmula química es C₁₅H₁₈N₄O₆, comercialmente se adquiere como cristales azul-violeta, es soluble en agua, metanol, acetona, etcétera (Index Merck 1989).

En la figura 24 se muestran las fórmulas de cada compuesto. (Index Merck 1989 y Reynolds 1989). Los mutágenos de referencia anteriores son agentes alquilantes, es decir agregan grupos alquilo al DNA provocando desestabilización de la helice e induciendo rompimientos que interfieren en el proceso de replicación del material genético. La prevalencia de los compuestos N-Nitroso en el ambiente y su formación *in vivo* ha sugerido que pueden estar involucrados en la etiología del cáncer humano (Guttenplan, 1990).

En el Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M. se empleó la Prueba de SMART en células somaticas de los discos imagales de los ojos de *Drosophila melanogaster*, los objetivos del presente trabajo son: 1) Realizar la calibración interna de SMART empleando los discos imagales de los ojos y 2) Establecer la repetibilidad del sistema.

II. MATERIAL Y METODO

AGENTES QUÍMICOS:

Las sustancias empleadas fueron obtenidas de las siguientes casas comerciales: N-Nitrosodimetilamina (DMN), Sigma; Nitrosodietilamina (DEN), Radian Corporation; Metil-Metano Sulfonato (MMS), Aldrich Chemical Company Inc.; B-Propiolactona (B-PL), Radian Corporation y Mitomicina C (MMC), Sigma.

Las líneas de *Drosophila* utilizadas en el presente trabajo fueron: y/y ("yellow") cuerpo amarillo con cerdas café y w/w ("white") color de ojos blancos de la cuales se obtuvieron las hembras y machos, respectivamente.

Los marcadores involucrados en esta prueba son recesivos y ligados al sexo. (y)-"yellow" se encuentra en el cromosoma X a 0.0 unidades de mapa, mientras que (w)-"white" a 1.5 unidades de mapa (Lindsley y Grell 1968).

Los cultivos se mantuvieron a 25 ± 1 °C con una humedad relativa de 60 % en un medio de cultivo estándar.

SINCRONIZACIÓN:

Se obtuvieron hembras y/y vírgenes de no más de 72 hrs de edad y se cruzaron con machos w/Y no mayores de 48 hrs, (Fig 17) después de tres días de realizada la cruce, los progenitores se transvasaron a medio nuevo con el fin de permitir que las

hembras ovipositaran durante un intervalo de 8 horas, posteriormente los progenitores se retiraron de los frascos.

TRATAMIENTO:

Trascurridos 3 días se obtuvieron larvas de 72 ± 4 horas de edad por medio del método de Nöthiger (1970) que utiliza un gradiente de sacarosa al 20%, el cual provoca que las larvas floten en la superficie, luego fueron colectadas con una malla de nylon fina. Se sometieron a un tratamiento agudo de 6 horas con el químico y se mantuvieron en la obscuridad, posteriormente se enjuagaron con agua corriente y se colocaron en medio de cultivo fresco, hasta la emergencia de los adultos en los cuales se realizó el registro de manchas.

En la figura 25 se muestra al protocolo seguido. Cada experimento se repitió dos veces para determinar la repetibilidad en la respuesta, se compararon los resultados obtenidos en cada repetición mediante las tablas de Kastenbaum-Bowman

Las concentraciones empleadas de cada mutageno son las siguientes: DMN: 0.5, 1.0, 12.5, 25, 50 mM; DEN: 1, 5, 10, 20 mM; MMS: 0.05, 0.10, 0.5, 1mM; B-PI: 25, 50, 100 mM; MMC 0.3, 0.6, 1.2 mM.

ANÁLISIS DE LAS MANCHAS:

Las moscas se anestesiaron con éter, y enseguida se colocaron sobre una platina excavada con una solución de Tween-alcohol etílico-agua 1:70:29 lo que facilita la observación de las manchas en los ojos (Tripathy *et al.* 1989), la lectura se realizó bajo un microscopio de disección a un aumento de 120X, el registro de las manchas se llevó a cabo tanto en machos como hembras.

Los criterios de lectura fueron los siguientes; se contó el número de omatidias afectadas ("white") (Fig 26); se consideran como eventos independientes aquellas manchas que se encontraron separadas cada una por 4 hileras de omatidias normales, es decir, surgieron por dos eventos genéticos independientes (Fig. 18).

ANÁLISIS DE LOS DATOS:

Debido a que el ojo de la mosca es una estructura tridimensional de la cual sólo se analizan las células pigmentarias deben de estimarse las frecuencias de mutación inducidas mediante la fórmula propuesta por Szabad *et al.* (1983).

$$f = 2 \times n \times m \times 10^4 / N \times C. \text{ donde}$$

f = frecuencia de manchas por 10^4 células

m = tamaño promedio de mancha

n = número de manchas

C = Número de omatidias (aproximadamente 800) que forman el ojo.

N = Número de ojos analizados.

Esta ecuación da una estimación de la manifestación de clones por 10^4 células ($f \times 10^4$) si bien esta ecuación no determina exactamente la frecuencia de inducción de clones en relación al número de células expuestas, debido a factores como los diferentes patrones de proliferación, muerte celular selectiva y otros eventos entre los cuales destaca que de los dos clones formados en cada evento sólo es evidente el correspondiente al fenotipo de omatidias blancas, lo que a su vez influye en el tamaño promedio del clon por 10^4 células. Así los valores promedio de manchas determinadas experimentalmente, deben multiplicarse por un factor de 2 (Vogel y Zijlstra 1987).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Se realizó conforme al método propuesto por Frei y Würigler en 1988, el cual se basa en contrastar dos hipótesis para cuantificar el daño causado por el tratamiento. La contrastación de dos hipótesis permite distinguir la probabilidad de obtener un resultado positivo, débil positivo, inconcluyente o negativo en un experimento (Frei y Würigler 1988).

La hipótesis nula (H_0) plantea que no hay diferencias entre la frecuencia de mutación de las series control y las tratadas. El rechazo de la hipótesis nula indica que hay un incremento estadístico significativo en la frecuencia de mutación basal.

La hipótesis alternativa (H_a) postula que el tratamiento resulta en un incremento estadístico de la frecuencia de mutación de las series tratadas equivalente a m veces la frecuencia basal. Esta H_a es rechazada si la frecuencia de mutación es significativamente más baja que el incremento de la frecuencia postulada. El rechazo indica que el tratamiento no produce el incremento requerido para considerarlo como mutagénico bajo las condiciones probadas.

El incremento estadístico se traduce en m , que es el número de veces que se aumenta la frecuencia de mutación del lote testigo. Se ha fijado $m = 2$ para este protocolo con el fin de garantizar que la frecuencia basal se ha duplicado como resultado del tratamiento (Vogel y Zijlstra 1987).

Si se acepta la hipótesis nula y se rechaza la alternativa el resultado es negativo. Si se rechaza la nula y se acepta la hipótesis alternativa, el resultado es positivo. Si las dos hipótesis son rechazadas, el resultado del tratamiento se considera débil positivo y si por el contrario ambas son aceptadas el resultado se considera inconcluyente ya que esto no puede ser cierto de manera simultánea. Para cada hipótesis se determina una zona de aceptación y otra de rechazo. La contrastación de las dos hipótesis se lleva a cabo por separado mediante la prueba de X^2 de proporciones, con la corrección de Yates (Fig 27).

OBTENCIÓN DE LOS VALORES ESPERADOS:

N_c y N_t representan el tamaño de muestra el número de ojos de la serie control y tratada respectivamente, n es el número total de mutaciones en la serie control mas la serie tratada. La proporción de mutaciones esperada en la series control (p) y en las series tratadas (q) son como sigue:

De acuerdo con la H_0 :

$$p_0 = N_c / (N_c + N_t) \quad \text{y} \quad q_0 = N_t / (N_c + N_t)$$

Donde p_{0n} y q_{0n} representan el número de mutaciones esperadas bajo la H_0 en las series control y tratadas respectivamente.

De acuerdo con la H_a :

$$p_a = N_c / (N_c + mN_t) \quad \text{y} \quad q_a = mN_t / (N_c + mN_t)$$

Donde p_{an} y q_{an} representan el número de mutaciones esperadas bajo H_a en las series control y tratadas respectivamente.

Regla de decisión para ambas hipótesis: Si $X^2_{\text{experimental}} > X^2_{(=0,05)(n=1)}$, se rechaza H_0 o H_a , según sea el caso.

III. RESULTADOS

Las concentraciones de DMN seleccionadas fueron 0.5, 1.0, 12.5, 25.0 y 50 mM, sin embargo la última (50 mM) fué imposible de analizar por la gran cantidad de daño que se manifestó en omatidias totalmente alteradas y en ojos deformados (Fig. 19), así, se presentan únicamente los datos de las primeras cuatro concentraciones.

Para cada experimento se realizó una repetición, se compararon los resultados obtenidos en cada caso mediante la prueba no paramétrica de Kastenbaum-Bowman (1970), el testigo negativo fué sacarosa al 5%. No se observaron diferencias significativas entre las repeticiones de cada experimento ($P > 0.05$) por lo cual se procedió a la suma de los resultados de las repeticiones, el análisis de los datos se realizó por medio de la X^2 para proporciones.

En la tabla VI se presentan los resultados que se obtuvieron al exponer larvas de 72 ± 4 hrs de edad a diferentes concentraciones de los mutágenos de referencia.

Los parámetros considerados fueron; número de ojos totales, total de manchas, ojos con manchas, frecuencia de manchas inducidas así como las esperadas por 10^4 células para ambos sexos, se compararon las frecuencias de manchas en las series tratadas y las series control.

La distribución de frecuencia de manchas obtenidas después de exponer larvas de 72 ± 4 horas de edad a distintas concentraciones de DMN se presenta en las figuras 28, 29 y 30, para hembras y machos respectivamente. Se observa que el DMN

resultó positivo en todas las concentraciones probadas, no hubo diferencias entre hembras y machos excepto en la concentración más baja que resultó negativa en machos.

En el caso de DEN, la respuesta obtenida fué positiva en todos los casos e igual para hembras y machos. La relación de concentración-respuesta fué clara así como los valores de la frecuencia de inducción. En la concentración 10 mM se observó una disminución en la frecuencia obtenida, no obstante ésta fue significativa con respecto al control (Figs. 31, 32 y 33).

Las distintas concentraciones de MMS dieron una respuesta similar para las hembras y los machos (Figs. 34, 35 y 36 respectivamente) esta resultó positiva en todos los casos.

Las figuras 37, 38, y 39 muestran la distribución de las manchas recobradas al exponer larvas de tercer estadio a diferentes concentraciones de β -PL. Se obtuvo una respuesta positiva en todos los casos, tanto para hembras como para machos ($P < 0.05$).

Los resultados obtenidos con MMC se muestran en las figuras 40, 41 y 42. Como puede observarse, la respuesta obtenida para hembras resultó más fuerte que para los machos, siendo positiva en todos los casos para las primeras mientras que en los machos sólo lo fué en la concentración más alta.

IV. DISCUSION

El primer paso para el estudio genotóxico de una sustancia es la obtención de una curva dosis-respuesta, este tipo de curvas juegan un papel importante para la comparación cuantitativa entre los mutágenos (Lee *et al.* 1990). La obtención de la dosis exacta que recibió cada organismo tratado no se obtuvo por ir más allá de los objetivos de éste estudio. Así, se representan las curvas concentración-respuesta para cada mutágeno (Figs 28, 31, 34, 37 y 40).

El análisis comparativo entre los sexos es indispensable en este tipo de estudios, la crua empleada en este trabajo fueron hembras y/y por machos w/Y por lo cual la descendencia resultante son hembras (y + / + w) heterocigóticas para ambos marcadores genéticos ligados al sexo (cromosoma X) mientras que los machos son hemicigóticos (y + / Y) para los mismos (Fig 43). En los machos cualquier daño inducido en el cromosoma X se expresa debido a la presencia de un solo cromosoma X y un cromosoma Y, el tipo de daño que se detecta se origina através de rompimientos, mutación puntual y recombinación; en las hembras los eventos genéticos que inducen a la formación de clones "white" son recombinación mitótica, no disyunción, mutación puntual y delección. (Tripathy *et al.* 1989 y Würigler *et al.* 1991)

El marcador "yellow" no aporta información para este ensayo pero permite distinguir aquella progenie no derivada de la crua experimental. En la tabla VI se presentan los resultados que se obtuvieron al exponer larvas de 72 horas de

edad, a los diferentes mutágenos de referencia resultando positivas todas las concentraciones para machos y hembras respectivamente, excepto en los machos de las concentraciones (0.3 y 0.6 mM) de MMC.

El tamaño de la mancha es un indicador del tiempo en que ocurrió la alteración, aquellos compuestos indirectos se espera que produzcan manchas pequeñas (el daño ocurre hacia el final del desarrollo del disco imagal del ojo) debido a que el compuesto necesita ser metabolizado (Fig 20), mientras que las manchas grandes se originan porque el compuesto actúa directamente sobre las células blanco al inicio del período de exposición (Fig 21).

El incremento en el tamaño de la mancha conforme aumenta la concentración muestra la sensibilidad del sistema pues al existir una mayor concentración del mutágeno en las células la probabilidad de interacción con el ADN es cada vez mayor, esta interacción se dá en menor tiempo por lo cual se recuperan tamaños de manchas mayores. El tamaño de la mancha depende entonces de dos factores, metabolismo y concentración.

Szabad (1983) sugiere que se calcule la frecuencia de inducción de manchas por cada 10^4 células con el fin de disponer de un valor de frecuencia absoluto que pondere las posibles diferencias debidas al tamaño de muestra, la edad de la larva al momento del tratamiento, que sólo se observa una parte de los clones por el contexto rojo de los ojos y los posibles sesgos por muerte celular. Sin embargo, puede observarse en la tabla V que dicha fórmula resulta fácilmente afectada por el tamaño promedio de la mancha. Así, para DMN en machos en la concentración de 1 mM,

el análisis estadístico aplicado indica resultados positivos, si bien, la frecuencia de inducción por 10^4 células indica un valor igual al control (7.15 vs. 7.4). Al analizar la razón de dicho resultado, se observa que el tamaño promedio del clon para la serie tratada es casi la mitad del tamaño del clon control (2.3 y 3.69 respectivamente), una razón de lo anterior es la ocurrencia de muerte celular la cual fué característica para este compuesto, lo que a su vez provoca la aparición de relaciones de genotoxicidad de no guardar necesariamente una relación predecible con la concentración administrada (Brusick, 1987). En síntesis, debe ponerse atención al significado de la frecuencia de inducción por 10^4 células ya que tanto valores menores al tamaño promedio de los clones de las series control, como aquellos mayores van a modificar de manera considerable el valor de la frecuencia de inducción.

En la Tabla VI se puede observar que tanto en las hembras como en los machos se obtuvieron resultados positivos en todas las concentraciones.

Con este mutágeno se presenta una frecuencia muy alta de manchas chicas lo que indica que es un agente indirecto es decir requiere ser metabolizado y es cuando adquiere mayor actividad mutagénica (Figs. 28, 29, y 30).

DEN (N-Nitrosodietilamina) fué el único compuesto en el cual el comportamiento de la frecuencia de hembras y machos fué igual (Figs. 31, 32 y 33). De esta manera resulta evidente que el mecanismo de inducción de manchas fué muy similar entre ambos sexos. En este protocolo de SMART, la hembra es capaz de detectar eventos genéticos terminales del tipo de mutación puntual, delección, no disyunción y recombinación mitótica, mientras que el macho (por su condición

de detectar eventos genéticos terminales del tipo de mutación puntual, delección, no disyunción y recombinación mitótica, mientras que el macho (por su condición hemiciga) no detecta este último evento, si bien no hay que descartar a la recombinación intragénica. Así, puede sugerirse que el mecanismo de acción de este compuesto no se da particularmente por recombinación.

MMS (Metil-Metanosulfonato) es un cancerígeno directo, produce efectos tóxicos al momento en que entra en contacto con el material genético, dando lugar a la formación de clones grandes; no obstante en el presente estudio se obtuvieron básicamente manchas chicas (Figs 20 y 21). Una posible explicación de ésta respuesta es la edad de la larva (72 ± 4 horas) en la que el número de células blanco es de 500 a 800 células precursoras de omatidias (Tabla V) y al patrón de crecimiento, pues como se indicó anteriormente, las mitosis se representan en oleadas y no continuamente, por lo que éste no se ajusta a un modelo exponencial. Por otra parte, si bien el tamaño del clon está en relación con el tiempo de inducción del daño, esto es sólo relativo porque únicamente se observa uno de los dos tipos de clones (blancos y silvestre) que resultan de un evento de recombinación mitótica, aunado a lo anterior la muerte celular que se incrementa conforme aumenta la dosis. En la tabla VI se observa que el tamaño promedio de la mancha mutante disminuye ligeramente a partir de la concentración (0.5 mM) tanto en hembras como en machos.

La respuesta MMS fué muy similar entre hembras y machos, excepto en la concentración más alta (1 mM) en la que la frecuencia de manchas en los machos resultó menor. Lo anterior se puede deber a un efecto tóxico que provoque muerte celular en los organismos más sensibles. A nivel de los clones analizados lo anterior

mM, este tiende a disminuir probablemente por muerte celular. Por otra parte, la similitud en los valores de las frecuencias obtenidas entre hembras y machos indica al igual que en el caso de DEN, que el mecanismo de acción del MMS debe de ser similar.

B-PL (b-propiolactona) Se caracteriza por tener una vida media corta de aproximadamente 17 minutos por lo que se empleó para determinar la capacidad de SMART para detectar este tipo de químicos. La relación concentración respuesta es consistente en hembras y machos, es decir, a mayor concentración, mayor frecuencia de manchas; la que resultó positiva en ambos casos para todas las concentraciones probadas. De lo anterior se concluye que el sistema es sensible a compuestos de vida media corta. Es el compuesto que mostró menor actividad de todos los probados, ya que la menor concentración (25 mM) produce una respuesta similar a los otros compuestos en concentraciones 25 veces menores.

Finalmente la Mitomicina C (MMC) en *Drosophila*, este antibiótico es mutagénico en hembras y machos, particularmente en aquellas células que han completado la primera profase meiótica; en levaduras y hongos incrementa la recombinación de las células que se están dividiendo mitóticamente (Schewe *et al.* 1971 y Reynolds, 1989). Actúa esencialmente por recombinación mitótica por lo cual se esperaba que la frecuencia de manchas inducidas sea superior en las hembras que en los machos, comportamiento que se observa en las figuras 40, 41 y 42. En los machos sólo la concentración (1.2mM) fue positiva lo que indica que los mecanismos de mutación puntual y delección contribuyen poco a la inducción de manchas, presenta una frecuencia alta de manchas chicas (1-2 omatidias afectadas) por lo cual

es un agente que requiere ser metabolizado.

En síntesis SMART mostró que es sensible a los distintos tipos de químicos empleados, puede detectar efectos a bajas concentraciones. En un intento de establecer un orden en la respuesta se seleccionó aquella concentración que fuera común en los diferentes químicos, esta estuvo alrededor de 1 mM, excepto en el caso de β -PL en el que la concentración más baja fue de 25 mM. Así, el orden obtenido fue: MMC > MMS > DMN > DEN > β -PL en hembras y MMS > MMC > β -PL > DEN > DMN en machos.

En los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con los reportados por Delgado (1990) para los mismos compuestos pero a través del uso de células somáticas de las alas de relación con el protocolo que emplea células somáticas del ala de *D. melanogaster*, debido al número diferente de células blanco en el ojo (800 omatidias) y el ala (24-400 células) y el uso de diferentes marcadores genéticos no es posible hacer una comparación detallada de las frecuencias de inducción encontradas para ambos sistemas.

En resumen, la prueba de mutación y recombinación en células del ojo en *Drosophila melanogaster* es repetible en su respuesta pues los resultados de los diferentes experimentos son consistentes; es sensible a bajas concentraciones de mutágenos, es un bioensayo prometedor en el campo de la toxicología para la detección de sustancias genotóxicas. Se espera que la prueba de SMART tanto en ala como en ojo se incorporen a las baterías de prueba para disponer de un sistema en el monitoreo ambiental en México para la detección de sustancias genotóxicas.

V. CONCLUSIONES

- 1) SMART demostró ser sensible a los diferentes mutágenos de referencia. El orden de respuesta fué:
**MMC > MMS > DMN > DEN > β -PL en hembras y
MMS > MMC > β -PL > DEN > DMN en machos.**
- 2) Este sistema mostró ser repetible en la respuesta.
- 3) Para MMC la comparación de la respuesta obtenida en ambos sexos permite estimar si el mecanismo de acción se debe principalmente a eventos de mutación y delección o bien a recombinación mitótica.

BIBLIOGRAFIA

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, New York, 461-487 pp.

Albert., L. A. (1988). Curso basico de toxicología ambiental. 2ed Limusa, México. 311 pp.

Avers., Ch. J. (1984) Genetics, Willard Grant Press, 2 ed. Boston, Mas. 664 pp.

Buars. A.J., W.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. Mutat. 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., (1966) mitotic recombination. En Ashburner M.(Ed). The *Drosophila*. Academic Press, Vol:1, New York, 1020-1089.

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

Brusick., D. (1987). Principles of genetic toxicology. Plenum Press, Nueva York, 284 pp.

Brusick.,D. (1988). Evolution of testing strategies for genetic toxicity. *Mutation Res.*, 205, 69-78.

Carranza R.R. (1990). Manual de medicamentos: Cuadro Basico del Sector Salud. Facultad de Medicina. U.N.A.M. D.F.,365 pp.

Casarett, L.J. (1975). Origin and scope of Toxicology. En: L.J. Casarett y Doull (Eds). Toxicology, the basis science of poison, Nueva York. Macmillan Pub. Co. 3-10.

Castañeda, S. A. N. (1988). Estudio del efecto de la nemorona y la desmetil fruticulina sobre la pérdida parcial y total de cromosomas (SCLT) en *Drosophila melanogaster*. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias. U.N.A.M. 14 pp.

Chandley., A.C. y A.J. Bateman. (1962) Timing of spermatogenesis in *Drosophila* using tritiated thymidine. Nature, 20, 229-300.

Clayton F.E. (1952). Phenotypic abnormalities of eyes of Lozenge alleles in *Drosophila melanogaster*. The University of Texas Publication. por Patterson. pp 227-251

Clements, J , Denise H , Malcolm P , y Todd N.K. (1988) The *Drosophila* wing test: A comparison of the sensitivity of different strains. Mutat. Res. 203, 117-123.

Clements, J y Vogel, E.W (1988) Somatic recombination and mutation assay in *Drosophila*: A comparison of the response of two different strains to four mutagens. Mutat. Res. 62, 1-5.

Delgado R.A. (1990) Daño genético inducido por mutágenos positivos en células del ala de *Drosophila melanogaster*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. U.N.A.M. 75 pp.

Devoret, (1979). Cáncer. Investigación y Ciencia, Prensa Científica, Barcelona. 191 pp.

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

Environmental Mutagen Society. (1976). Environmental mutagen hazards. Science, 187, 503-514.

Fishbein L., 1981. Sources, Transport and Alterations of Metal Compound. An Overview I: Arsenic, Beryllium, Cadmium, Chromium and Nickel. Environ. Health Perspec. 140, 43-64.

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

Gaytan.,O. J. C. (1988). Efecto del Dalapón sobre la inducción de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en *Drosophila melanogaster*. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias. U.N.A.M. 11 pp.

Goldstein A., Lewis Aronow, y Sumner M. Kalman (1974). Principles of Drug Action: The basis of pharmacology. 2 ed. Wiley Internation Edition. 854 pp.

Gilbert.,S.F. (1989). Developmental Biology. 2ed. Sinaver Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts.

Guttenplan. J.B. (1990). Mutagenesis by N-nitroso compounds: relationships to DNA adducts, DNA repair, and mutational efficiencies. *Mutat. Res.* 233, 177-187.

Index Merck.(1989). Encyclopedy of chemical and drugs. Publish by Merck and Co.,Inc. Rahway, N.J., U.S.A. 11 ed. 1606 pp.

Jenkins, J.B. (1982). Genética. Reverté, Barcelona. Esp.784 pp.

Kagi A., Frei H.J., Juon H., Graf U y Würigler F.E. (1990). The detection of promutagens and procarcinogens in the *Drosophila* wing - spot test. XXEEMS Meeting, York Inglaterra. Poster.

Klaassen, C.D. (1975). Absorption, distribution and excretion of toxicants En: L.J. Casarett y J. Doull (Eds.). Toxicology, the basic science of poisons, Macmillan Pub. Nueva York. Co. pp 26-44.

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

Kilbey, B.J, MacDonald D.J, Auerbach, Sobels F.H, y Vogel E.W. (1981) The use of *Drosophila melanogaster* in tests for environmental mutagens. Mutat. Res. 85, 141-146.

Kortselius M. J. H. (1979) Induction of Sex-linked recessive lethals and autosomal translocations by Beta-Propiolactone in *Drosophila*: Influence of the route of administration on mutagenic activity. *Mutat. Res.*, 66, 55-63.

Laval, J., S. Boiteux y T.R. O' Connor. (1990). Physiological properties and repair of apurinic / apyrimidinic sites and imidazole ring-opened guanine in DNA. *Mutat. Res.*, 233, 73-79.

Lee, W.R., S. Abrahamson, R. Valencia, E.S. Von Halle, F.E. Würglery S. Zimmering. (1983). The sex-linked recessive lethal test for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*, Gene-Tox report. *Mutat. Res.* 123, 183-279.

Lee, W. R., David T. Beranek. B. Jane Byrne y Anne B. Tucker (1990). Comparison of dose-response relationships for ethyl methanesulfonate and 1-ethyl-1-nitrosourea in *Drosophila melanogaster* spermatozoa. *Mutat. Res.* 231, 31-45.

Linsdley, D.L. y R.H. Grell. (1968). Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Institution of Washington publication, Washington. 472 pp.

Madhavan M.M y Schneiderman H.A (1977) Histological analysis of the dynamics of growth of imaginal disc and histioblast nests during the larval development of *Drosophila melanogaster*. Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. 183, 269-305. En Gilbert. Developmental Biology.

Moore.,K.L. (1979). Embriologia clínica. 2ed. Interamericana. México., D.F. 397 pp.

Moutschen (1985) Introduction to Genetic Toxicology John Wiley & Sons New York 184 pp.

Nöthiger, R. (1970). Sucrose density separation: A method for collecting large number of *Drosophila* larvae. Dros. Inf. Serv., 45. 177.

Norton, T.R. (1975). Metabolism of toxic substances. En: L.J. Casarett y J. Doull (Eds.). Toxicology, the basics science of poisons, Macmillan Pub. Co. Nueva York. pp. 45- 135.

Obe, G. y A.T. Natarajan (1982) Mechanisms of the origin of structural chromosomal aberrations. En D. Muller, A.T. Natarajan, G. Obe y G. Rohrborn (Eds). Sister chromatid exchange test. Thieme-stratton Inc., New York, 1-5.

Plata G.L. (1990). Introducción a la Toxicología: Toxicología ocupacional y ambiental. En Katzung B.G. Farmacología básica y clínica, 3a ed., El Manual Moderno. Mex. D.F. 910 pp.

Pomerai, D.D. (1990). From gene to animal: An introduction to the molecular development. Cambridge University Press. 2 ed, New York. 417 pp.

Reynolds, J.E.F. (1989). Martindale; The extra pharmacopoeia, 29 ed. The pharmaceutical Press, London, 1896 pp.

Roberts., D.B. (1986). *Drosophila* a practical approach. IRL Press. Oxford. England. 295 pp.

Rodriguez-Arnaiz, R. (1982). Efectos genéticos del tiner y algunos de sus componentes en *Drosophila melanogaster*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, U.N.A.M. 36pp.

Salmon, S.E. y Alan C. Sartorelli. (1990). Quimioterapia del cáncer. En Katzung B.G. Farmacología básica y clínica, 3a ed., El Manual Moderno. Mex. D.F.

Schewe, M.J., David T. Suzuki and Udo. E. (1971). The genetic effects of mitomycin C in *Drosophila melanogaster* II. Induced meiotic recombination. *Mutat. Res.* 12, 269-279.

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.

Suzuki, D.T, A.J. F. Griffiths, J.H. Miler y R.C. Lewotin (1989). An introduction to genetic analysis. W.H. Freeman & Co., New York, 612 pp.

Szábad J, I Soos, G Polgar y G Hejja (1983) Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mosaic and sex linked recessive lethal test, Mutat. Res. 113, 117-133.

Tripathy, N.K, Kalyani K, Patnaik y Md, J. Nabi (1989) Genotoxicity of tartrazine studied in two somatic assays of *Drosophila melanogaster*. Mutat. Res. 224, 479-483.

Vogel., E. W. (1974). Some aspect of detection of potential mutagens in *Drosophila*. Mutat. Res. 29, 241- 250.

Vogel, E.W. (1987). Evaluation of potential mammalian genotoxins using *Drosophila*: the need for a change in test strategy. Mutagenesis, vol:2. 2, 161-171.

Vogel, E. W. y A.T. Natarajan. (1979 a). 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*. Mutat. Res.,62. 51-100.

Vogel E.W. y Natarajan (1979 b). The relation between reaction kinetics and mutagenic action of mono-functional alkylating agents in higher eucariotic systems. II: Total and partial sex chromosome loss in *Drosophila*. Mutat. Res. 101- 123.

Vogel E.W. y J.A. Zijlstra. (1987). Mechanistic and methodological aspects of chemically-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. Mutat. Res. 182, 243-264.

Vogel, E.W. y A. Szakmary (1990 b). Basic principles and evaluation of results of assays measuring genotoxic damage in somatic cells of *Drosophila*. The Netherlands, Mutation and the Environment. pp 149-158.

Vogel, E.W., H. Frei, K. Fujikawa, U. Graf., S. Kondo, H. Ryo y F.E. Würzler (1985) Summary Report on the performance of *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/Noerth Holland, Amsterdam, 47-57.

Vogel, E.W., F.E. Würigler, U. Graf, H. Frei. (1989) *Drosophila* course on somatic assays; Inst. Nacional de Investigaciones nucleares (ININ), Salazar, México.

Wilbourn J.L. Haron., E. Heseltine, J. Kaldor (1986). Response of experimental animal to human carcinogens: IARC Monographs 7 (11): pp 1853-1863.

Wilkins, A.S.(1985). Genetic analysis of animal development. John Wiley and Sons (Eds). Nueva York. 1500 pp.

Würigler., F. E. y Ekkehart W. Vogel (1986). *IN VIVO* Mutagenicity Testing Using Somatic Cells of *Drosophila melanogaster*. En Chemical mutagens: principles and methods for their detection, volume 10. J. de Serres (Ed). Plenum Press. New York. pp 1-72.

Würigler, F.E., Ulrich Graf y Albert Frölich. comunicación personal.

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

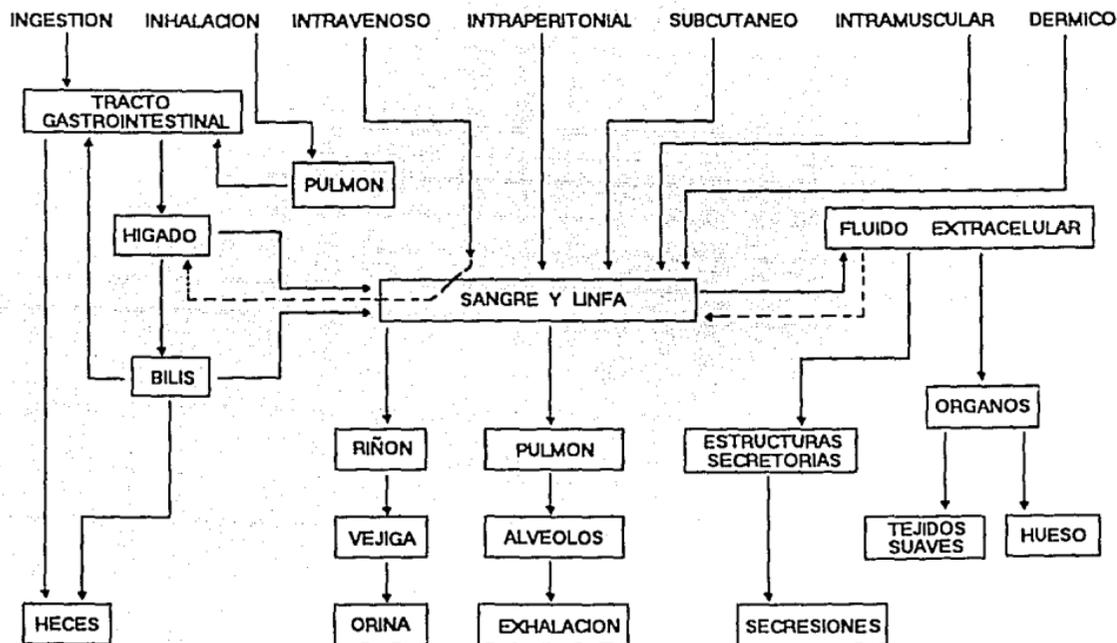


Fig. 1 Rutas de exposición, distribución y excreción de sustancias en el hombre (Tomado de Klaassen, 1975).

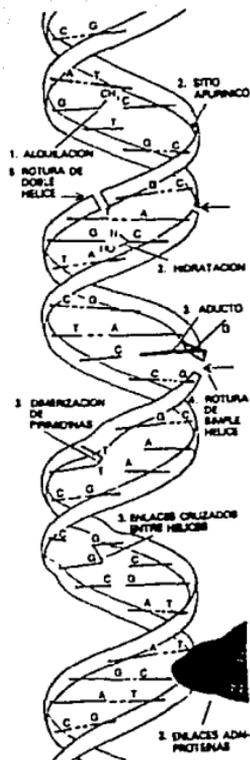


Fig. 2

Ciertos agentes químicos provocan alteraciones en la doble hélice de DNA alquilación de una de las bases (1); distorsiones menores (2) provocadas por hidratación o ausencia de una base; distorsiones mayores (3) por inserción de un aducto, la unión entrecruzada de dos filamentos o de un filamento y una proteína, roturas de un solo filamento (4) o de dos (5). Cualquier alteración estructural afecta a la función del DNA (tomado de Obe y Natarajan, 1982).

Fig. 3 Características de *Drosophila melanogaster*.

- 1.- Es el eucariote mejor conocido genéticamente
- 2.- Se pueden realizar estudios in vivo e in vitro.
- 3.- El ciclo de vida es corto aproximadamente 9 a 10 días a 25°C y una humedad relativa del 60%, involucra un periodo de embriogénesis completo dentro del huevo, y una secuencia de estadios larvales que derivan en una metamorfosis completa de la que finalmente surge un imago o adulto.
- 4.- Tiene cuatro cromosomas perfectamente mapeados
- 5.- La presencia de un paquete enzimático en la fracción microsómica muy semejante al del hígado de mamíferos, permite la biotransformación in vivo de los compuestos (Baars, et al., 1980)
- 6.- Se conoce el tiempo de su gametogénesis; se tratan estados pre y postmeióticos para evaluar la respuesta en cada una de las etapas de esta (Chandley y Bateman 1962).
- 7.- Se mantiene en espacios reducidos y un costo de moderado a bajo
- 8.- Se obtienen poblaciones grandes: 500 organismos por pareja
- 9.- Dimorfismo sexual positivo hacia la hembra.
- 10.- Tipo de exposición: de aguda a crónica.
- 11.- Se pueden realizar estudios en células somáticas y células germinales.
- 12.- Los agentes a probar pueden administrarse por alimentación, inyección o en forma gaseosa, esto depende de las propiedades físico-químicas del compuesto y de los objetivos del trabajo a realizar.
- 13.- Existe una gran cantidad de líneas con marcadores genéticos que permiten la evaluación de gran variedad de efectos genéticos y cromosómicos.

(Vogel 1974, Kilbey et. al., 1981 y Rodríguez- Arnaiz 1982).

Fig. 4

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

CRUZA PROGENITORA Y PROGENIE REGULAR

P y^2w^a/y^2w^a X y/B^*Yy'
Cuerpo amarillo Ojos en Barra
Ojos color durazno

F₁ y^2w^a/y y^2w^a/B^*Yy'
Cuerpo amarillo Ojos en Barra
color durazno

<u>EVENTO GENETICO</u>	<u>GENOTIPO</u>	<u>SEXO</u>	<u>FENOTIPO</u>
Pérdida del brazo largo del Y.	y^2w^a/Yy'	♂	w^a . Ojos color durazno.
Pérdida del brazo corto del Y.	y^2w^a/B^*Y	♂	y^2w^a/B^* .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 y	$y^2w^a/y/B^*Yy'$	♀	B^* .Ojos en Barra.
	$y^2w^a/0$	♀	y^2w^a . Cuerpo amarillo con pelos y cerdas negros, ojos color durazno.

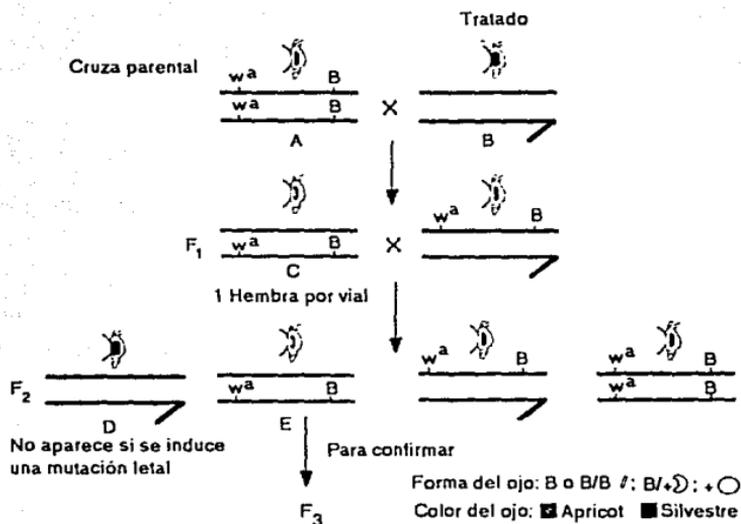


Fig. 5

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).

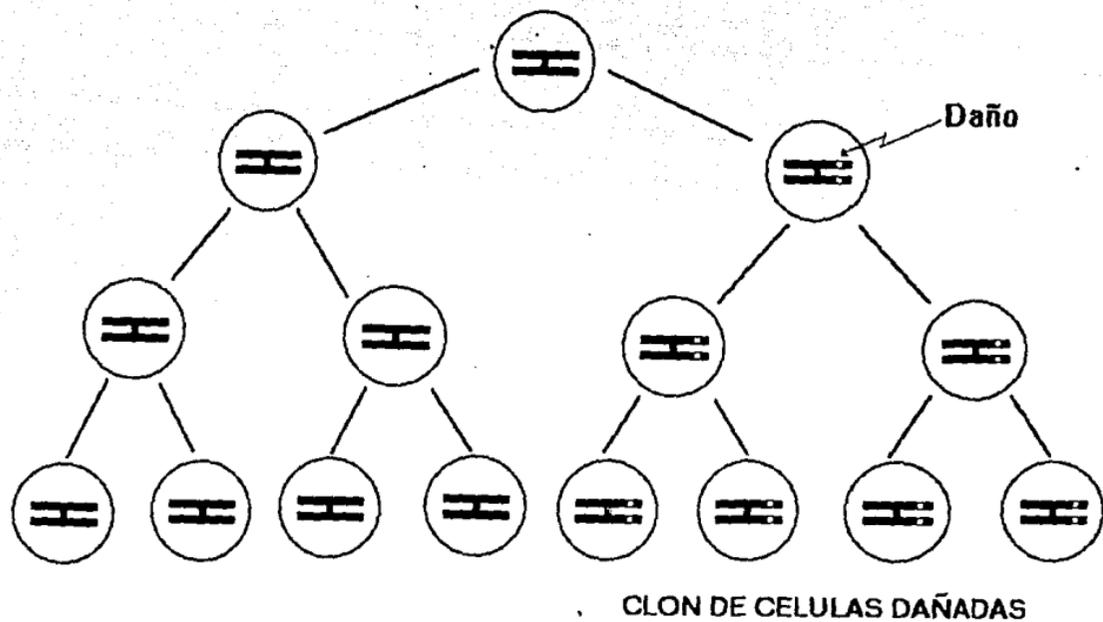


Fig. 6 Producción de un clon de células alteradas mediante división mitótica.

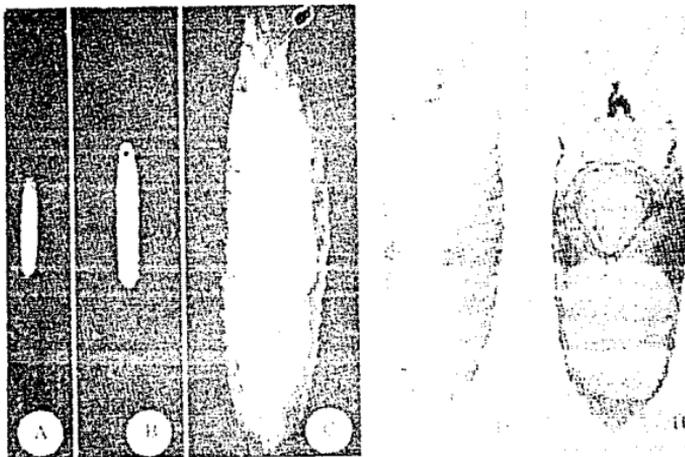


Fig. 7

Estadío larvario y pupal de *Drosophila melanogaster*. A: primero B: segundo, C: tercer estadío larvario D: pupa E: imago (Tomado de Demerec 1963).

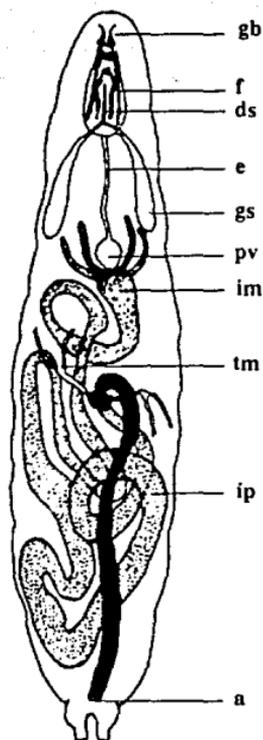


Fig.8

Morfología de una larva madura: ganchos bucales (gb), faringe (f), ducto salival (ds), esófago (e), glándula salival (gs), proventrículo (pv), intestino medio (im), tubos de malpigi (tm), intestino posterior (ip), ano (a). (Tomado de Demerec, 1965).

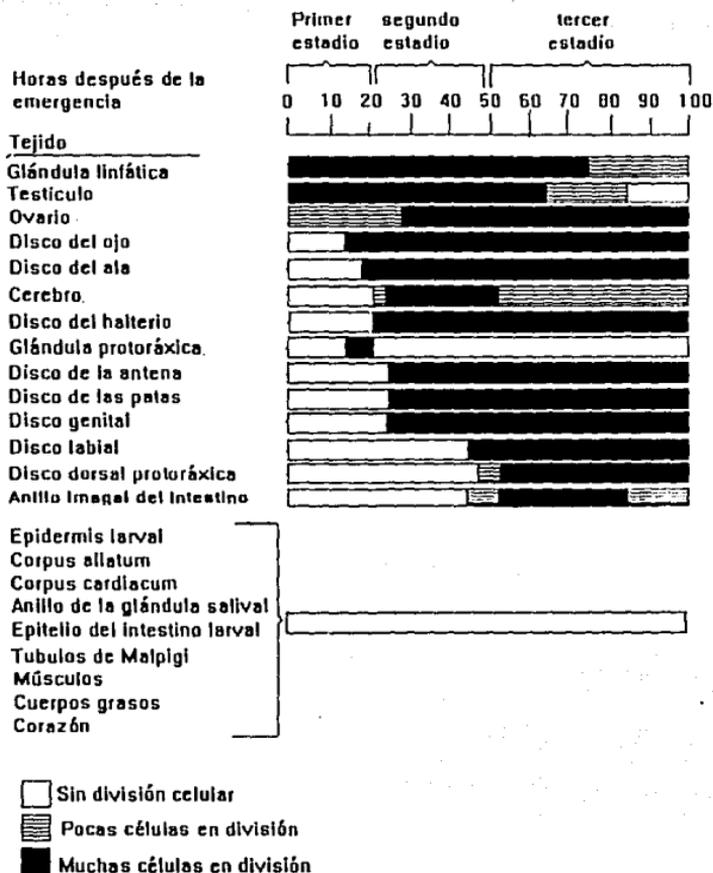


Fig. 9 Patrones de división celular para varios tejidos larvales e imagales durante el desarrollo de la larva de *Drosophila*. (Tomado de Gilbert, 1990).

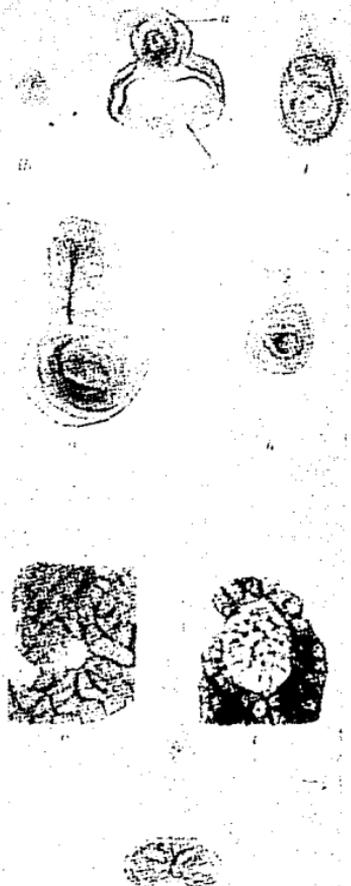
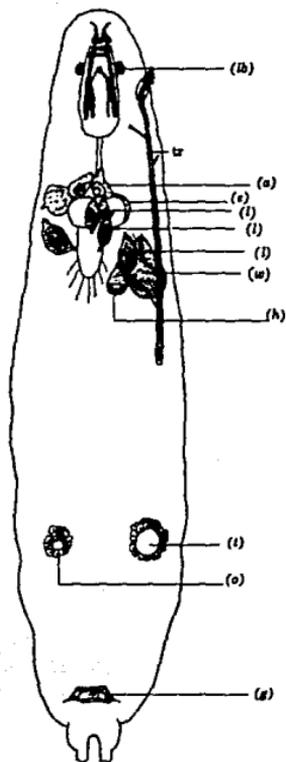


Fig. 10 Localización e identificación de los discos imagales de la larva madura; disco labial (lb), tráquea (tr), disco de la antena (a), disco del ojo (e), discos del primer par de patas (1¹), segundo par de patas (1²), tercer par de patas (1³), disco del ala (w), disco del halterio (h), testículo (t), ovario (o), disco genital (g). (Tomada de Demerec, 1965).

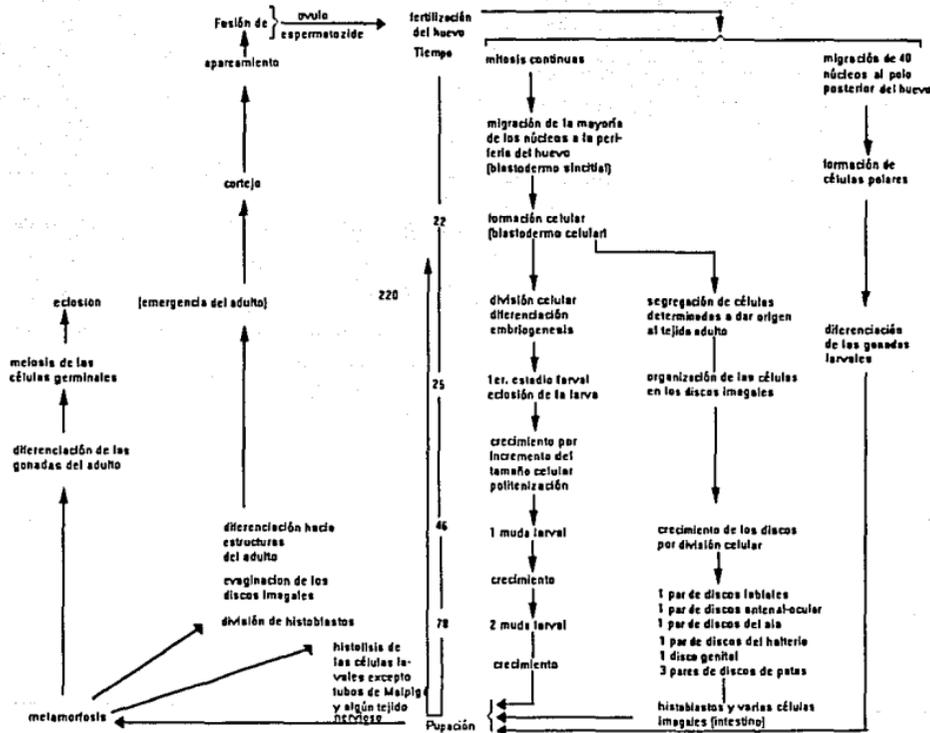


Fig. 11 El ciclo de vida de *Drosophila*, todos los tiempos son a 25°C. (Tomado de Roberts, 1986).

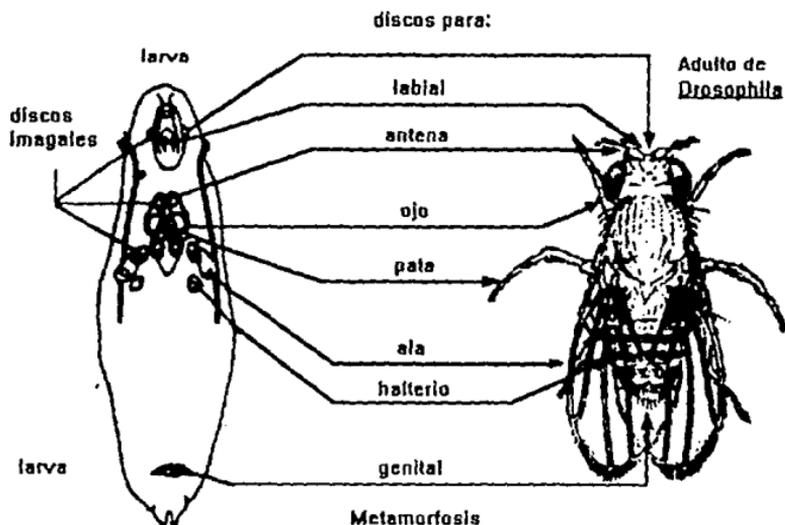


Fig. 12 Los discos imagales de *Drosophila melanogaster* darán lugar a las diversas estructuras del adulto por una serie de divisiones mitóticas. (Tomado de Gilbert, 1990).

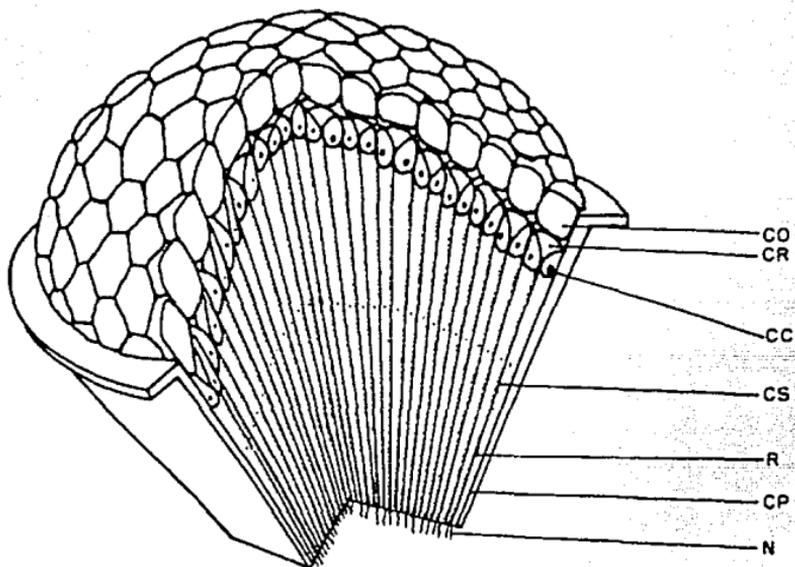


Fig. 13 Esquema de la composición celular de un ojo de adulto de *Drosophila melanogaster*. CC: células de la córnea, CO: córnea, CR: cristalino, CS: células sensoriales, R: rabadomero, CP: células pigmentarias, N: nervio. (Tomado de Vogel *et al.*, 1989).

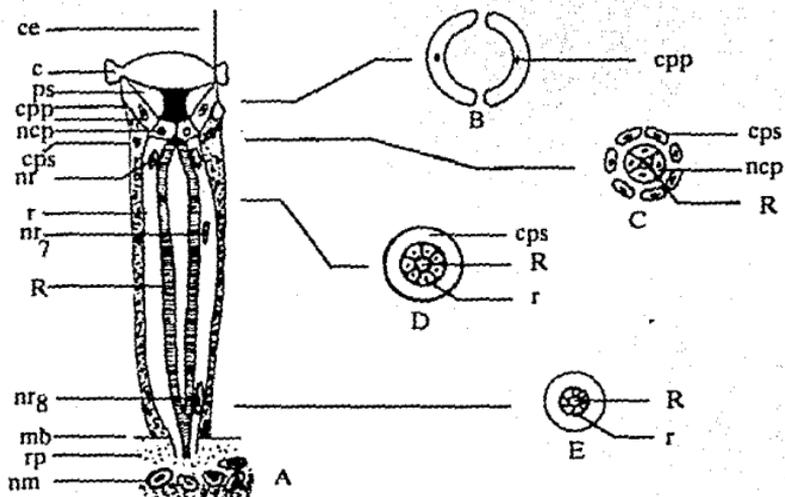


Fig. 14 A. Diagrama de una omatidia aislada de un adulto. cerda (ce), córnea (c), pseudocono (ps), células pigmentarias primarias (cpp), núcleo de la célula del pseudocono (ncp), célula pigmentaria secundaria (cps), núcleo de la célula retinula (nr), retinula (r), núcleo de la septima retinula (nr₇), rabdómero (R), núcleo de la octava retinula (nr₈), membrana basal (mb), región postretinual (rp) y neuronas monopolares (nm). B-E cortes transversales en distintos niveles de la omatidia. (Tomado de Demerec, 1965 y Clayton, 1952).

Fig.15 Frecuencia de clones producidos por edad (1000 R de rayos X) (Tomado de Würgler y Vogel 1986).

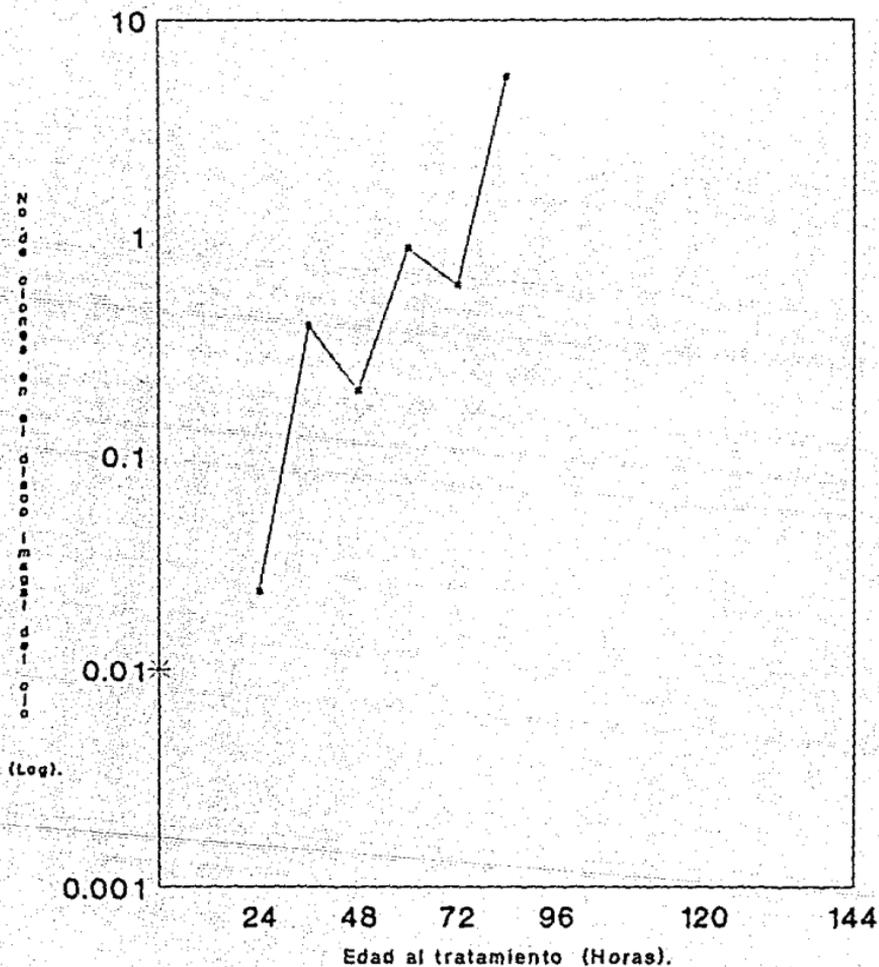




Fig. 16

Ojo con un mancha grande, se observa la ausencia de pigmento en las omatidias afectadas.



Fig. 17

Hembras "yellow" y machos "white" empleadas en la cruce progenitora.

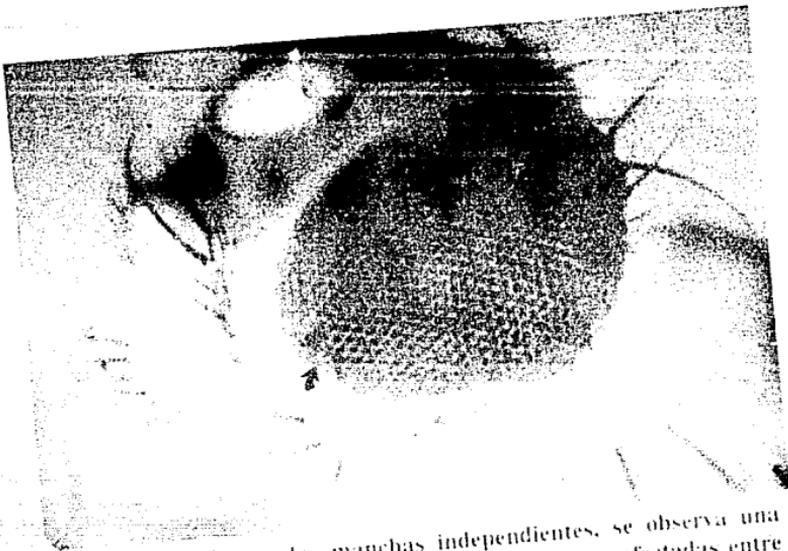


Fig.18 Ojo con dos manchas independientes, se observa una separación de 4 hileras de ommatidias no afectadas entre cada mancha.

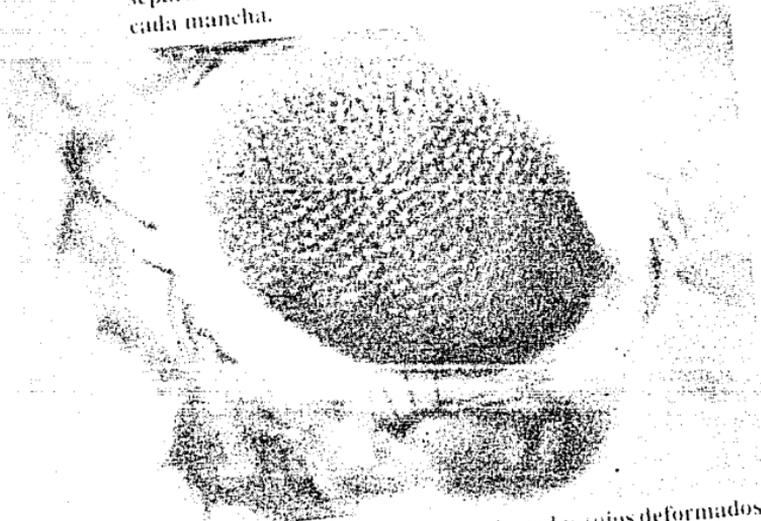


Fig.19 Ojo con ommatidias totalmente alteradas (ojos deformados) no se puede realizar el registro de las manchas inducidas por DMN (50 mM).



Fig. 20 Ojo que muestra una mancha chica de Somatidias alteradas.

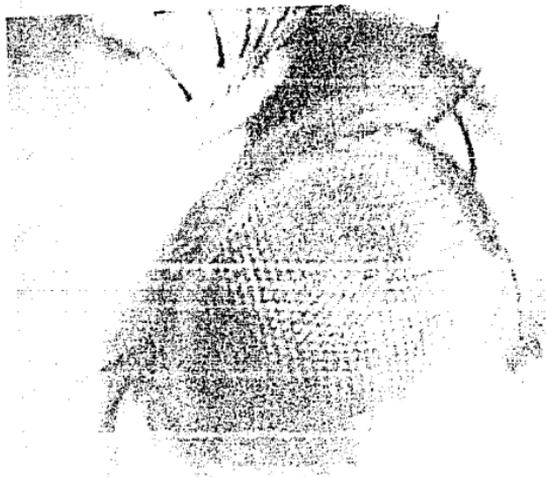


Fig. 21 Mancha grande de 25 somatidias afectadas.

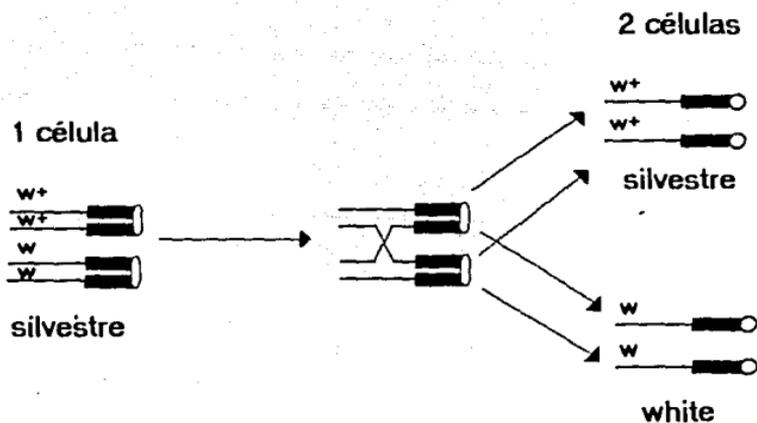


Fig. 22 Formación de clones "white" por recombinación mitótica.
 (Tomado de Vogel et al. 1989).

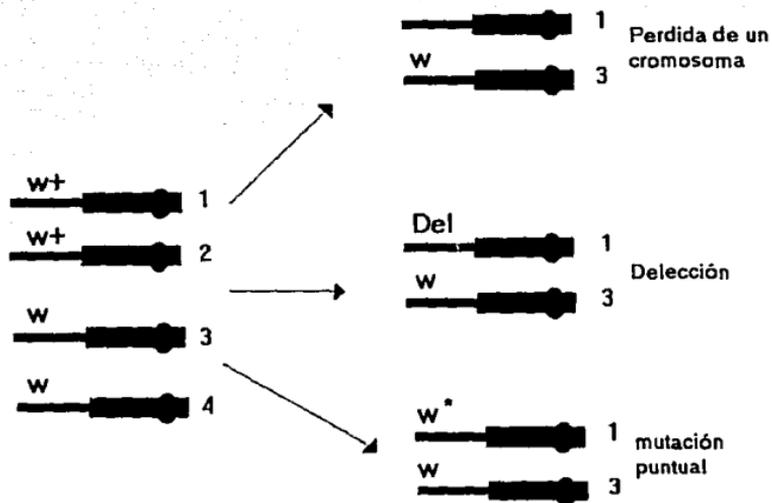


Fig. 23 Formación de clones w/w por pérdida de un cromosoma, delección e inducción de una mutación puntual. (Tomado de Vogel et al. 1989).

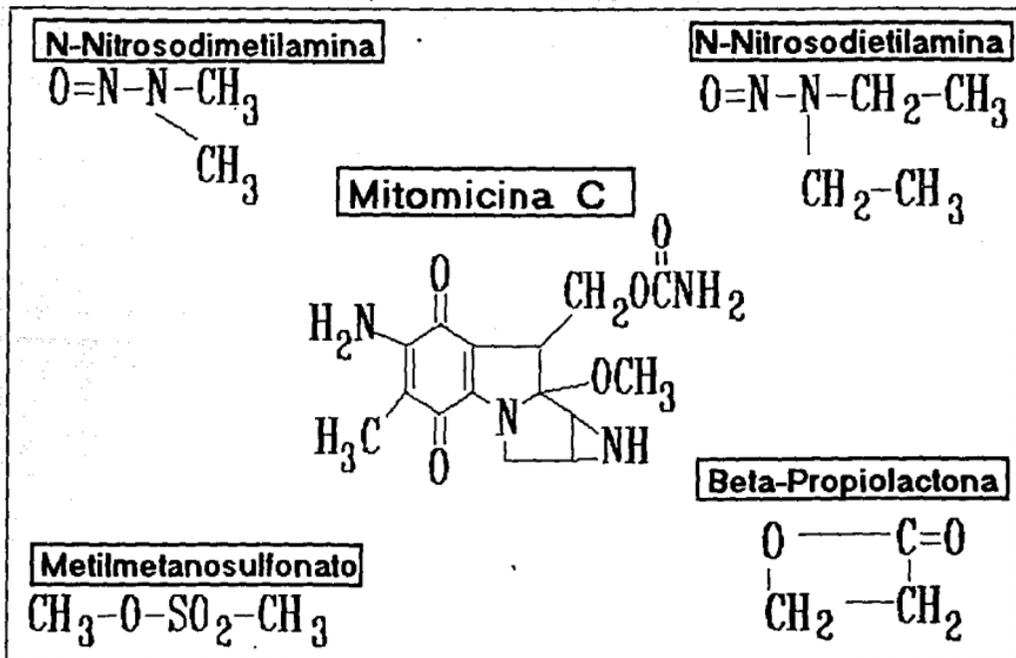


Fig. 24 Fórmulas de los compuestos empleados.

Fig. 25 CARACTERISTICAS DEL PROTOCOLO SMART EN OJO.

Organismo empleado:	<i>Drosophila melanogaster.</i>
Ensayo:	Somatic Mutation And Recombination Test (SMART)
Líneas:	y (yellow) y w (white); marcadores del cromosoma X.
Cruza:	hembras vírgenes y/y X machos w/Y
Genotipo en la F1 :	hembras heterócigas y + / + w machos hemécigos y + / Y
Células somáticas analizadas:	células pigmentarias primarias.
Vía de administración:	Alimentación a larvas de 72+4 horas de edad.
Sincronización:	Durante 8 horas
Tipo de tratamiento:	Agudo durante 6 horas
Control:	sacarosa al 5%
Repeticiones:	Dos
Detección de Genotoxicidad:	Número y tamaño de manchas.
Análisis estadístico:	Chi cuadrada para proporciones.

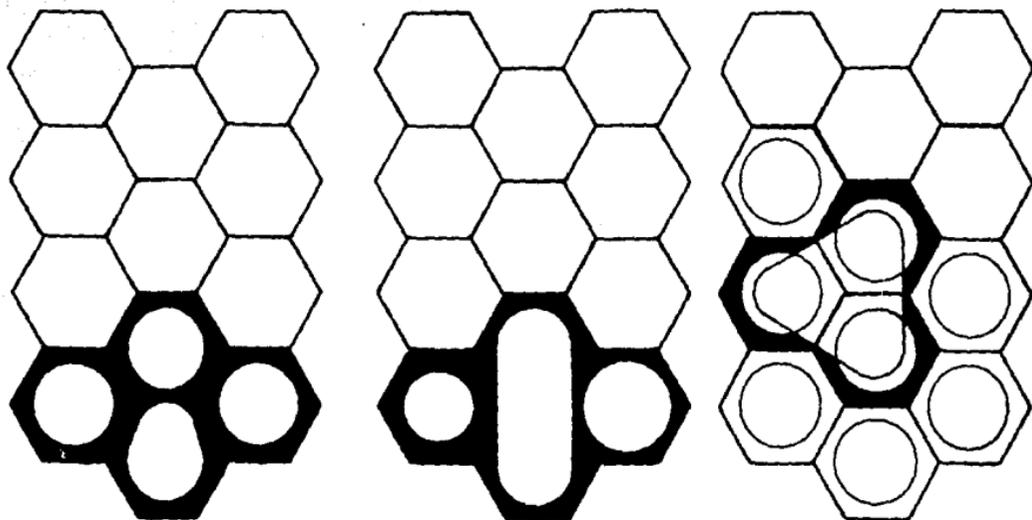
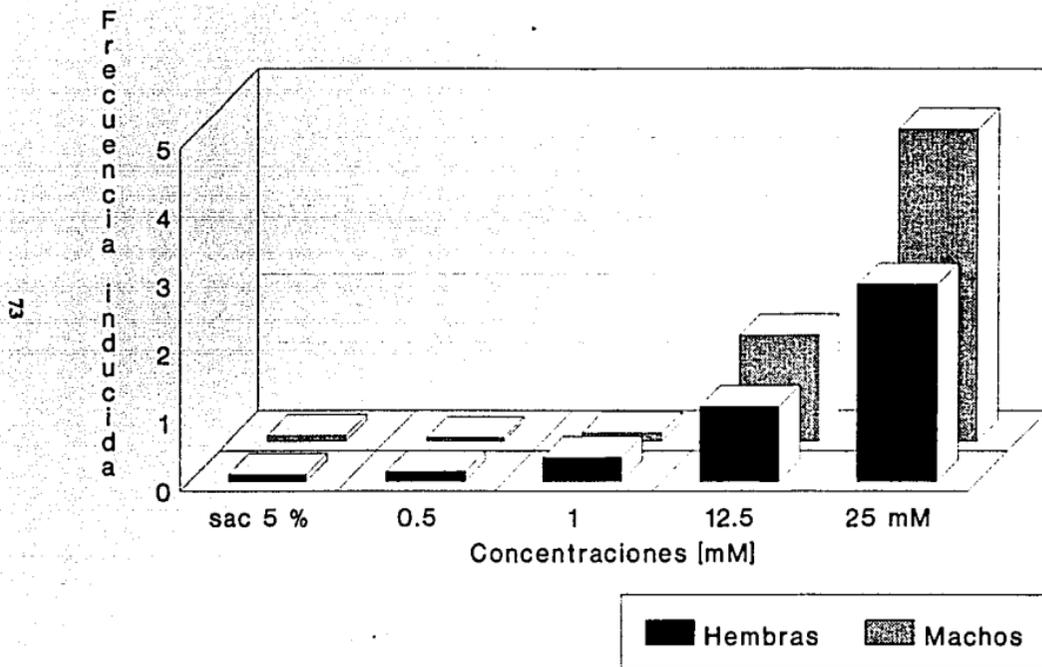


Fig. 26 Ilustración de las diferentes formas de manchas chicas: 1, 2 y 3 omatidias afectadas. (Tomado de Vogel *et al.* 1989).

Fig. 27 Probabilidades de error (P) para cada uno de los cuatro posibles diagnósticos (positivo, negativo, débil positivo e Inconcluyente). (Tomado de Frei y Würzler. 1988).

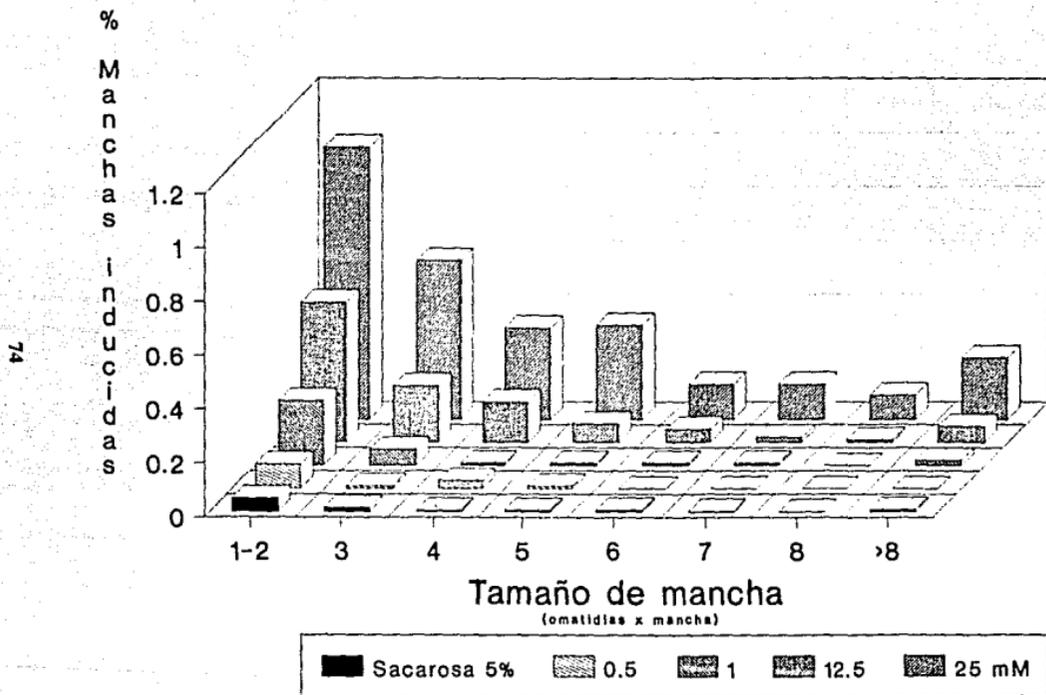
Hipótesis	H_a	
	aceptada $1-\beta$	rechazada β
H_0 aceptada $1-\alpha$	Inconcluyente $P = (1-\alpha)(1-\beta)$ $= 1-\alpha-\beta+\alpha\beta$	Negativo $P = (1-\alpha)\beta$ $= \beta-\alpha\beta$
rechazada α	Positivo $P = \alpha(1-\beta)$ $= \alpha-\alpha\beta$	Débil positivo $P = \alpha\beta$

Fig. 28 Frecuencia de manchas inducidas por DMN en larvas de 72 hrs. (Tratamiento agudo).



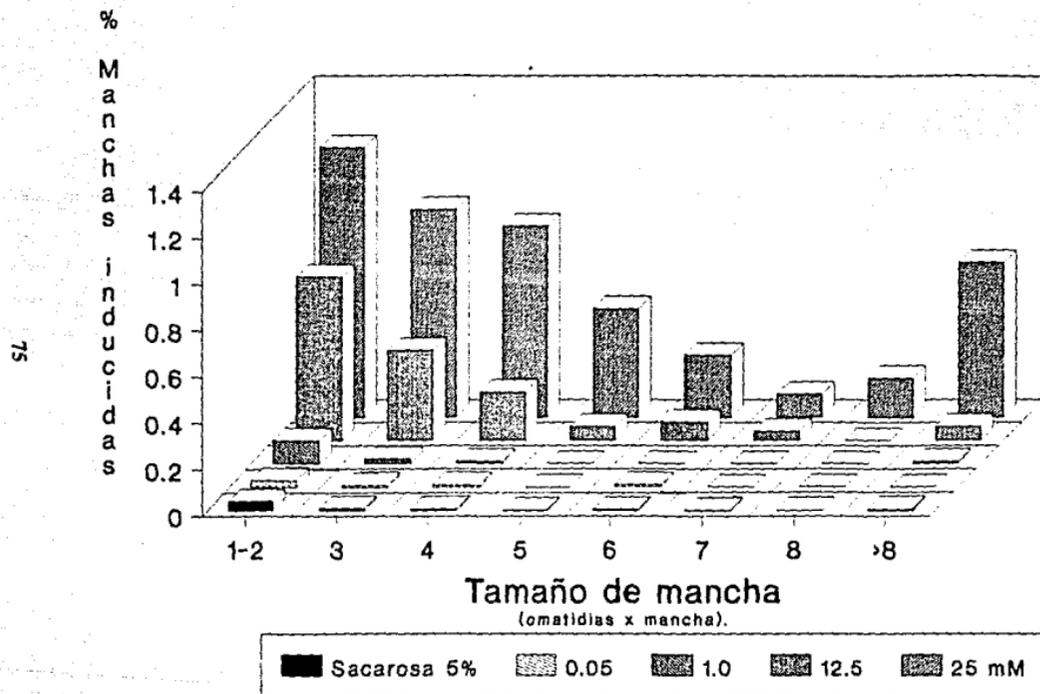
DMN

Fig. 29 Distribución de manchas inducida por DMN en larvas de 72 hrs (Hembras).



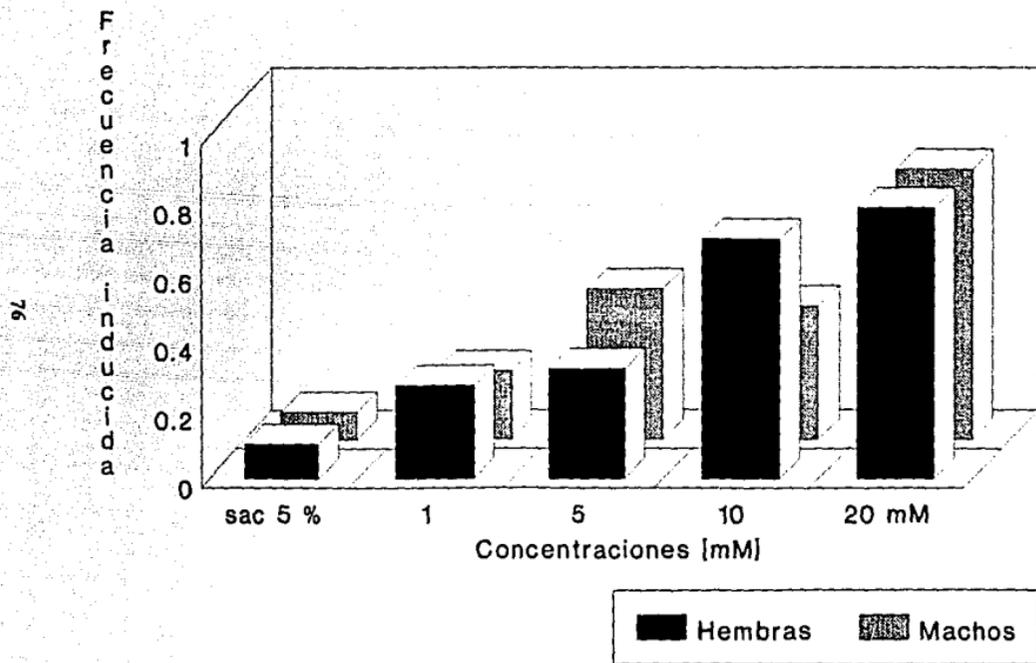
DMN

Fig. 30 Distribución de manchas inducida por DMN en larvas de 72 hrs (Machos).



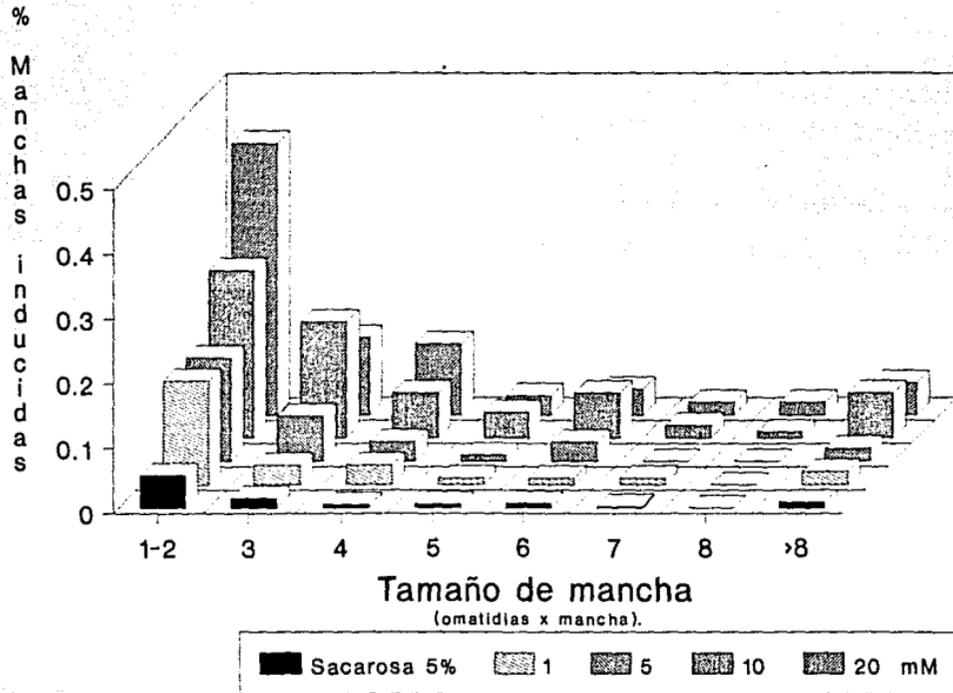
DMN

Fig. 31 Frecuencia de manchas inducida por DEN en larvas de 72 hrs. (Tratamiento agudo)



DEN

Fig. 32 Distribución de manchas inducida por DEN en larvas de 72 hrs (Hembras).



DEN

Fig. 33 Distribución de manchas inducida por DEN en larvas de 72 hrs (Machos).

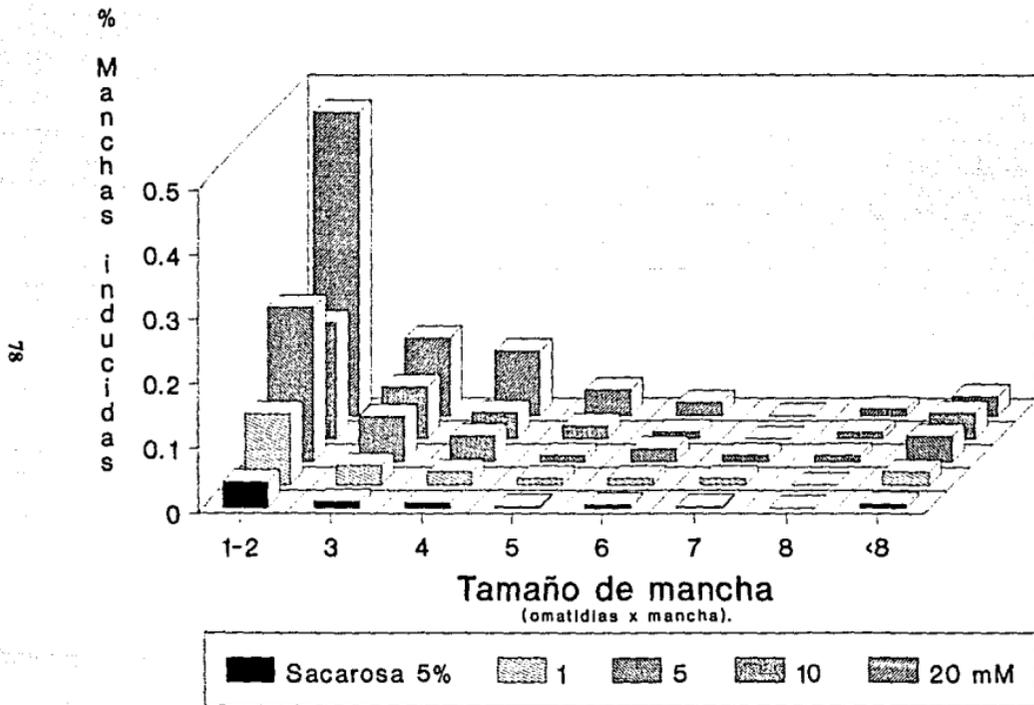
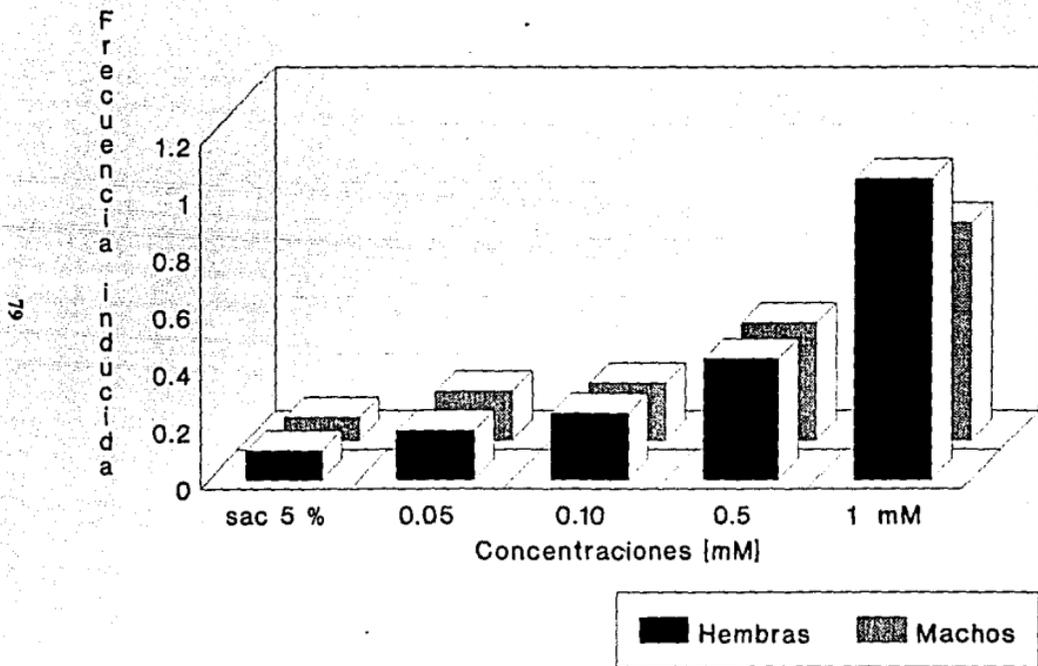


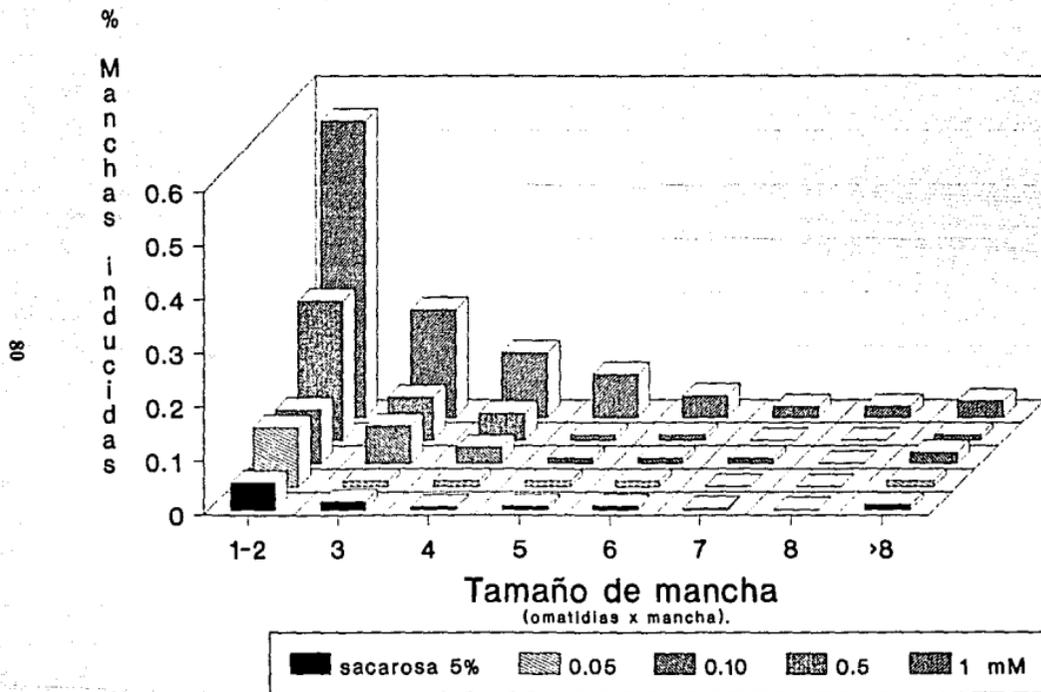
Fig. 34 Frecuencia de manchas inducidas por MMS en larvas de 72 hrs. (Tratamiento agudo).



MMS

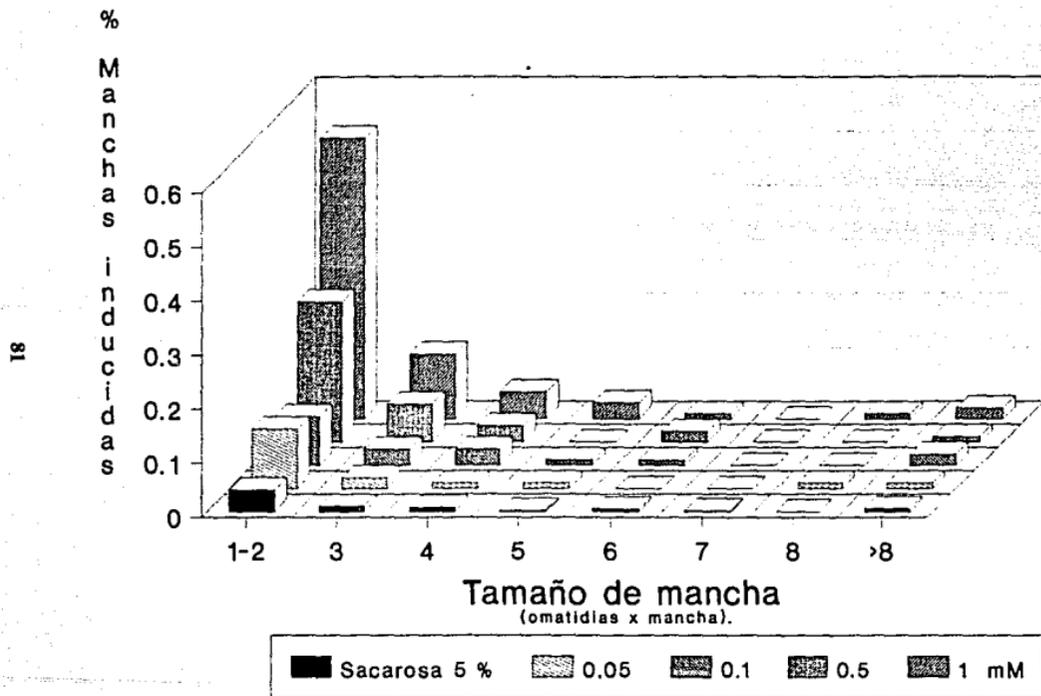
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Fig. 35 Distribución de manchas inducida por MMS en larvas de 72 hrs (Hembras).



MMS

Fig. 36 Distribución de manchas inducida por MMS en larvas de 72 hrs (Machos).



MMS

Fig. 37 Frecuencia de manchas inducidas por B-PL en larvas de 72 hrs. (Tratamiento agudo).

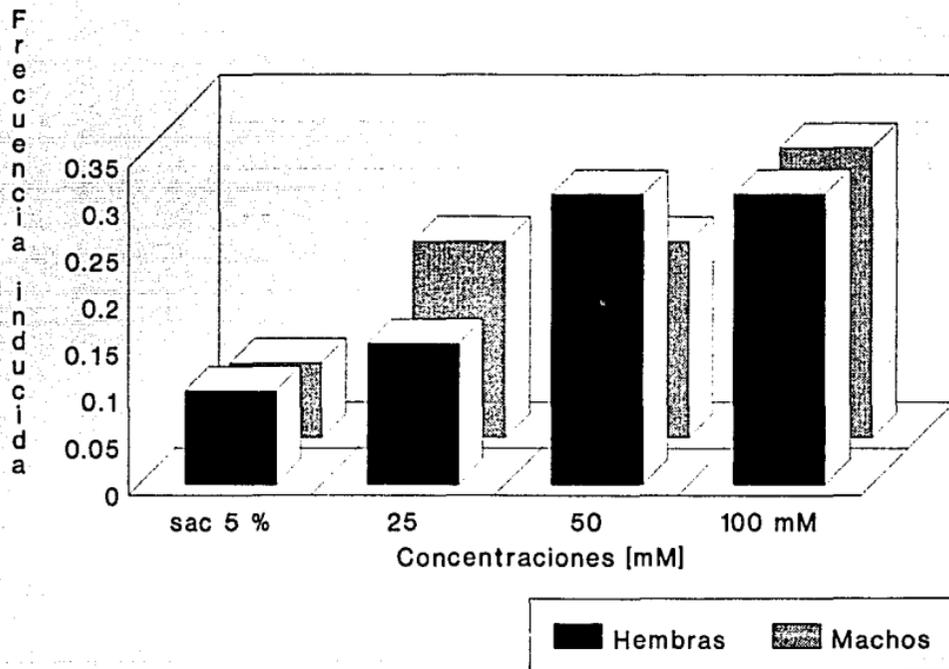


Fig. 38 Distribución de manchas inducida por B-PL en larvas de 72 hrs (Hembras).

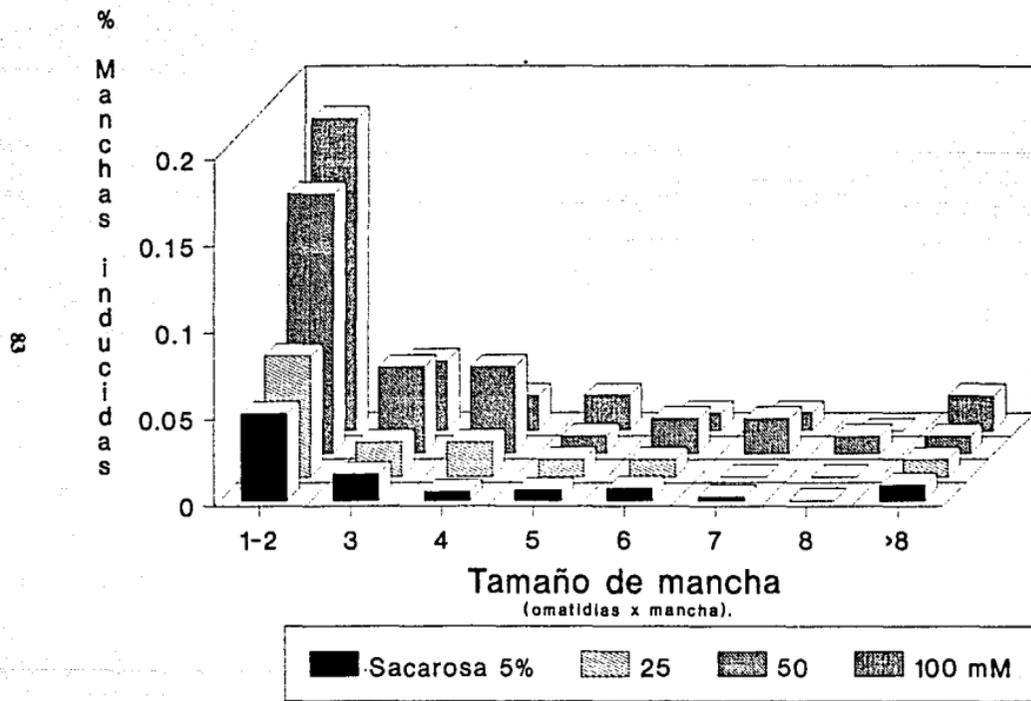
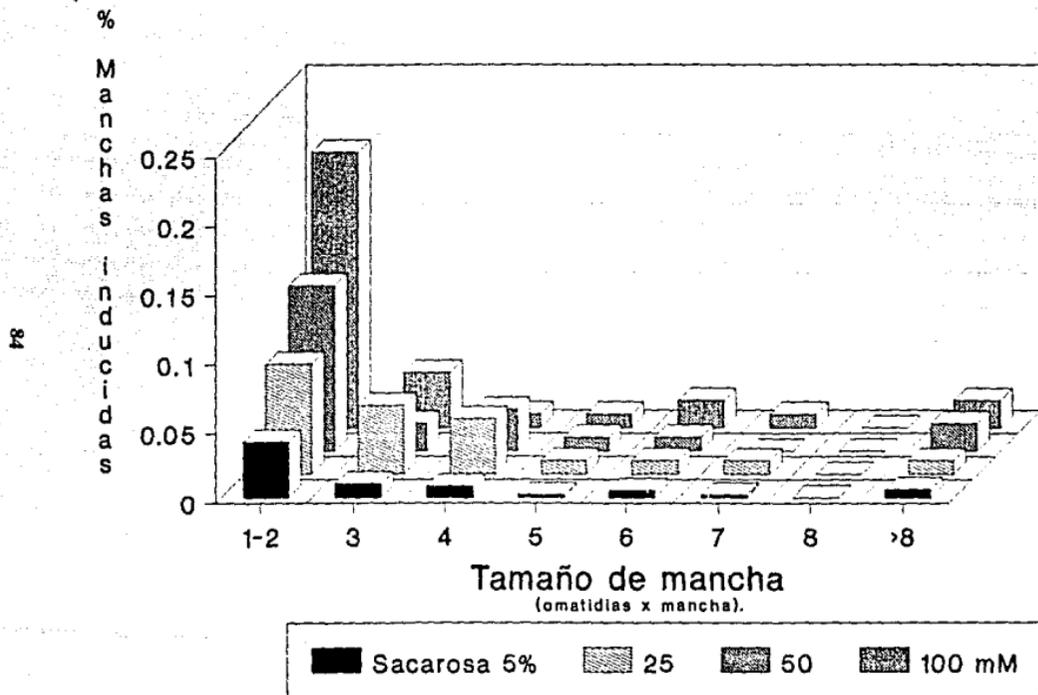


Fig. 39 Distribución de manchas inducida por B-PL en larvas de 72 hrs (Machos).



B-PL

Fig. 40 Frecuencia de manchas inducidas por MMC en larvas de 72 hrs. (Tratamiento agudo).

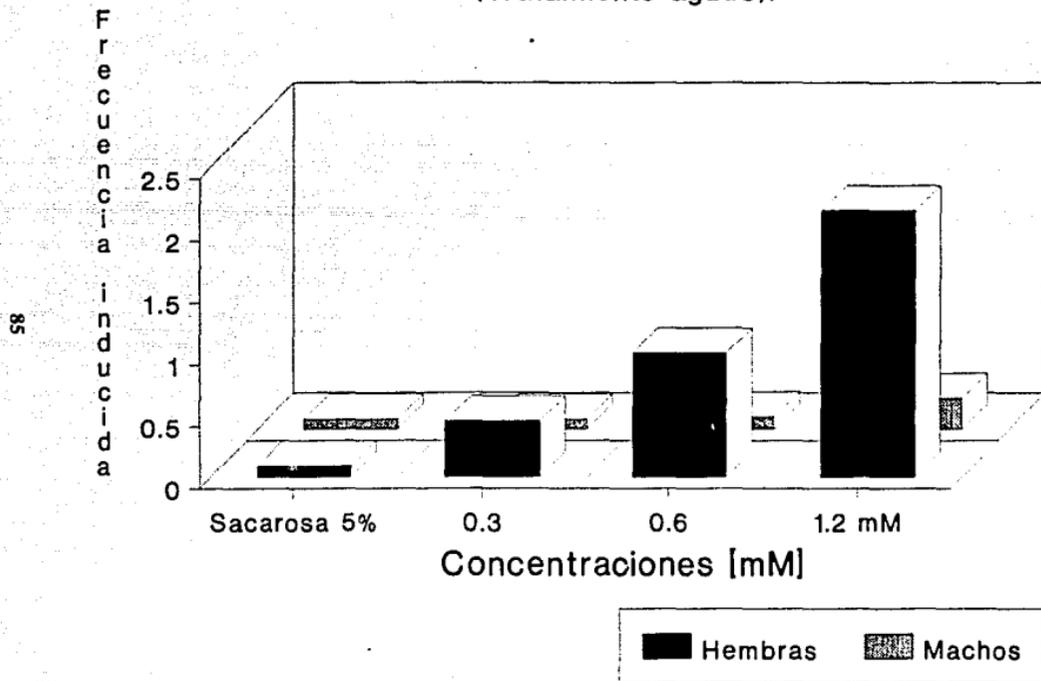


Fig. 41 Distribución de manchas inducida por MMC en larvas de 72 hrs (Hembras).

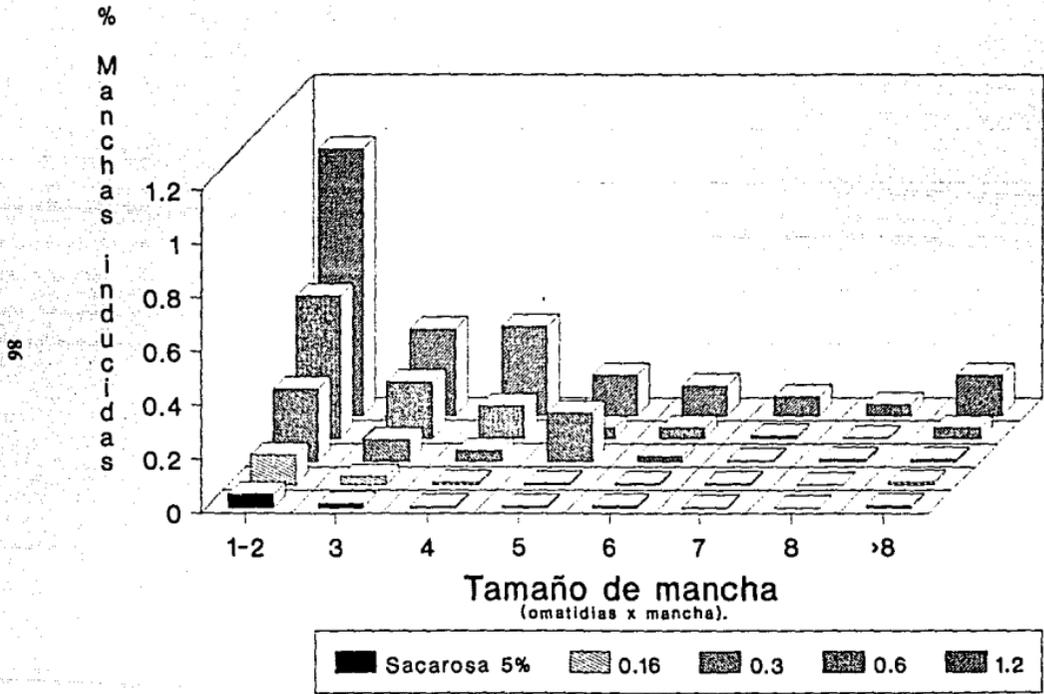
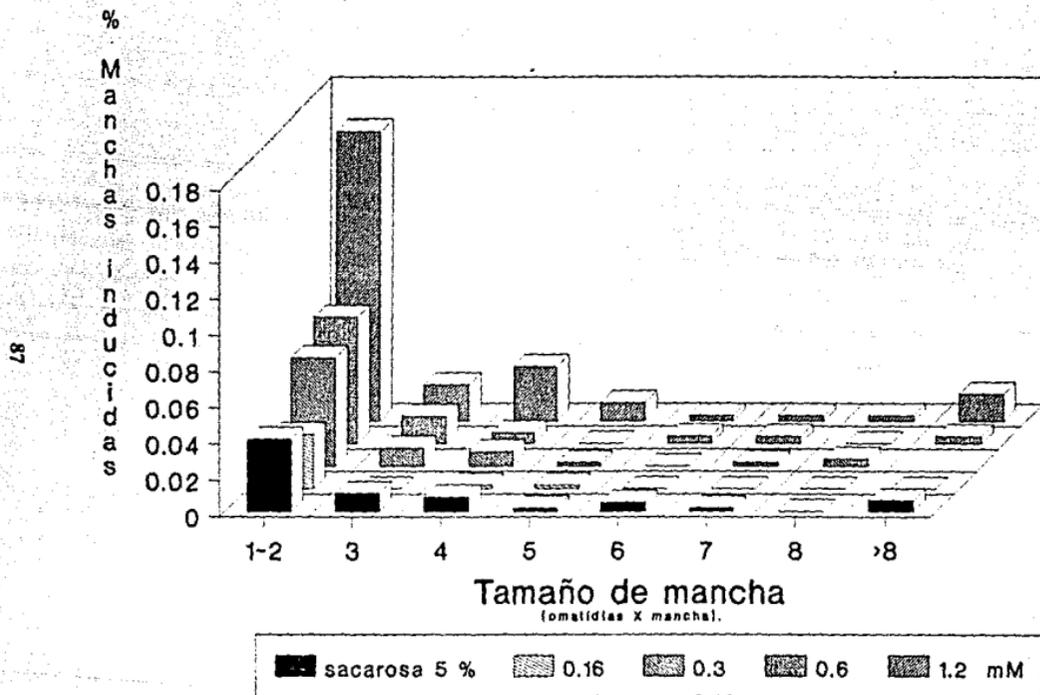


Fig. 42 Distribución de manchas inducida por MMC en larvas de 72 hrs (Machos).



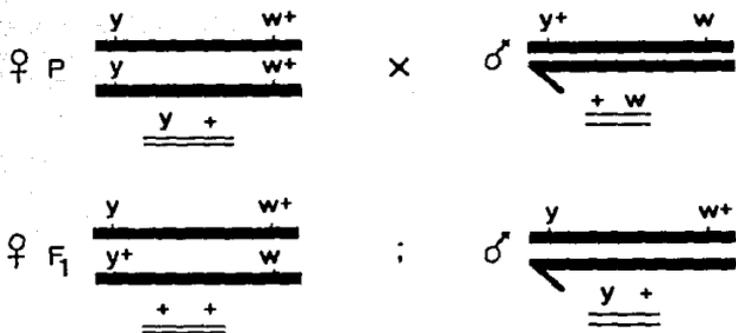


Fig. 43 Cruza progenitora: "yellow" con machos "white" y descendencia F₁.

TABLA I. CLASIFICACIÓN DE MUTÁGENOS AMBIENTALES

Grupo I.- Sustancias mutagénicas sintetizadas por el hombre y usadas directamente en condiciones específicas.

FARMACEUTICAS	PESTICIDAS	ADITIVOS	CONTAMINANTES BIOLÓGICOS
Agentes antitumores Antibióticos Narcóticos Anticonceptivos Excipientes Anestésicos	Insecticidas Herbicidas Raticidas Fungicidas Moluscicidas Nematicidas	Alimentos Otros (cosméticos)	

Grupo II.- Sustancias mutagénicas usadas en la industria o presentes en el ambiente como subproductos industriales.

- A.- Agentes alquilantes industriales.
- B.- Solventes orgánicos, compuestos organo-metálicos.
- C.- Contaminantes del agua.
- D.- Contaminantes del aire.
- E.- Metales pesados.

Grupo III.- Sustancias mutagénicas de origen natural.

- A.- Alcaloides
- B.- Productos del metabolismo microbiano.

Tomado de Moutschen (1985).

TABLA II. CLASIFICACIÓN DE PRUEBAS DE MUTAGÉNESIS

Grupo I: Pruebas destinadas a detectar lesiones a nivel molecular:

En ADN de origen diverso con o sin adición de fracción microsomal.
En la síntesis de ADN sin patrón.

En las proteínas, p.e. hemoglobina.

Grupo II.- Pruebas diseñadas para detectar mutaciones a nivel celular.

DIRECTOS	
ORGANISMOS INFERIORES	
Fagos	
Bacterias:	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> etc.
Levaduras:	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .
Hongos:	<i>Neurospora crassa</i> y otras especies. <i>Aspergillus nidulans</i> , varias especie de <i>Penicillium</i> , <i>Sordaria brevicollis</i> .
Protozoarios:	<i>Paramecium aurelia</i> , <i>Tetrahymena piriforme</i> , etc.
ORGANISMOS SUPERIORES	
Plantas:	Maiz (mutantes cerosos en células del polen). Cebada (mutantes cerosos en células del polen). Tradescantia (mutaciones en los pelos estaminales).
Mamíferos:	Conejo (células cultivadas <i>in vitro</i>). Hamster Sirio (células cultivadas <i>in vitro</i>). Hamster chinos (células cultivadas <i>in vitro</i>). Ratón (células cultivadas <i>in vitro</i> y pruebas de mosaicismos) Hombre (células cultivadas <i>in vitro</i> , detección inmunológica in vivo de sangre y esperma)

**Grupo II.- Pruebas diseñadas para detectar mutaciones a nivel celular.
(continuación)**

INDIRECTOS

Ensayos via el hospedero.

Conejo:	<i>Salmonella typhimurium, Neurospora crassa.</i>
Ratón:	<i>Salmonella Typhimurium, Neurospora crassa, Schizosaccharomyces pombe.</i>
Rata:	<i>Salmonella typhimurium, Neurospora crassa.</i>
Hamster:	<i>Salmonella typhimurium.</i>

**Grupo III.- Pruebas diseñadas para estimar el daño cromosómico inducido
(efecto clastogénico).**

In vitro

Plantas:	<i>Tradescantia</i> (granos de polen) <i>Trillium</i> (granos de polen) Zanahoria, Nicotiana, etc (varios cultivos de tejido diploide)
Animales:	Numerosas líneas celulares de conejo hamster Sirio y chino, rata, ratón y humano (incluye tejido maligno)

In vivo

Plantas:	Cebada (raiz) Cebolla (raiz) frijol (raiz) <i>Tradescantia</i> (granos de polen, células madre del polen y raiz) <i>Trillium</i> (granos de polen y células madre del polen)
Animales:	Ratón, rata, crisetto (espermatogenesis, médula osea)

Grupo IV.- Pruebas de mutagenicidad a nivel del organismo completo.

- Plantas:** Cebada (mutantes de clorofila, esterilidad inducida)
Maíz (mutantes de clorofila)
Arabidopsis thaliana (mutantes de clorofila)
Trigo (varios mutantes)
Chícharo (varios mutantes)
- Animales:** *Drosophila* (Letales recesivos ligados al sexo, CLB, Muller-5)
Habrobracon (Letales autosómicos recesivos)
Gusano de seda (mutaciones inducidas en oocitos)
Ratón: la prueba de mutación de locus específico, prueba de letales dominantes, No disyunción cromosómica, Letales recesivos ligados al sexo, Translocaciones heredables (hemisterilidad).

Tomado de Molschen (1985)

**TABLA III. PROTOCOLO EMPLEADO PARA LA PRUEBA DE
MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICA.**

a) Prueba de ala

b) Prueba de ojo

Cruza: ♀ mwh/mwh X ♂ flr/TM, Ser

♀ y/y X ♂ w/Y

Edad de las larvas al tratamiento: 72 + 4 horas

Duración del tratamiento: 6 horas

6 horas

Control: Sacarosa al 5%

Tamaño de muestra: 80 alas

500 ojos

Células somáticas
analizadas: Tricomas

Células pigmentarias
primarias

Registro de datos: mancha chica
mancha grande
mancha doble

mancha 1-8
mancha > 8

Análisis estadístico: Chi cuadrada para proporciones.

TABLA IV. COMPARACIÓN DE SLRLT vs SMART

	SMART	SLRL
Duración:	10 días	Tres meses
Edad al Tratamiento:	Larvas	Adultos
Generación analizada:	Generación tratada	2 generaciones después del tratamiento
Tipo de células expuestas	Cel. somáticas de los discos imagales	Cel. de la línea germinal del macho
Blancos	1 o 2 loci	800 genes
Eventos Genéticos terminales	Inespecífica: mutación génica delección aberraciones cromosómicas recombinación mitótica.	Inespecífica mutación puntual aberraciones cromosómicas

(Tomado de Kagí *et al.* 1990).

TABLA V. TAMAÑO DE CLASES DE MANCHAS MOSAICO QUE PUEDEN APARECER DESPUÉS DE TRATAMIENTO CON MUTAGÉNS.

Estado	Embrión	1er estadio	2do estadio	3er estadio
Duración (h)	20.5	22	21	44
Células precursoras de omatídias		20	150/200	800
Divisiones mitóticas		2-3	3	4
Tamaños de clase		33-64 65-128 128-256 256-512	5-8 9-16 17-32	1 2 3-4

(Tomado de Vogel et al., 1989).

TABLE IV. RESULTADOS OBTENIDOS CON LA PRUEBA DE SMART EN OJO DE *Drosophila melanogaster*

HEMBRAS						
Conc.	No de ojos	ojos con manchas	No de manchas	frec. manchas	Fx10 ⁴	Tamaño promed.
Control (sacarosa 5%)						
	1118	94	107	0.09	0.7	4.03
DMN						
0.5	283	37	41	0.14+	11.55	3.19
1.0	229	65	80	0.35+	27.51	3.15
12.5	291	164	317	1.09+	95.32	3.5
25	128	115	369	2.88+	309.90	4.3
DEN						
1	317	65	88	0.27+	22.38	3.3
5	296	74	98	0.32+	30.73	3.79
10	373	171	264	0.70+	76.26	4.31
20	262	142	208	0.79+	70.46	3.55
MMS						
0.05	222	30	38	0.17+	14.42	3.37
0.10	365	63	84	0.23+	23.01	4.0
0.5	326	106	136	0.42+	30.04	2.88
1	262	190	344	1.05+	87.31	3.32
β-PL						
25	451	69	68	0.15+	14.59	3.67
40	297	61	93	0.31+	26.77	3.42
100	401	79	123	0.31+	29.14	3.8
MMC						
0.3	504	179	228	0.45+	33.93	3
0.6	442	272	439	1.0 +	89.39	3.6
1.2	382	347	821	2.15+	214.9	4

M A C H O S

Conc.	No de ojos	ojos con manchas	No de manchas	frec. manchas	Fx10 ⁴	Tamaño promed.
Control (sacarosa 5%)						
DMN	839	54	67	0.08	7.4	3.69
0.5	172	8	9	0.05	3.92	3
1	193	17	24	0.12+	7.15	2.3
12.5	100	75	155	1.55+	144.54	3.73
25	30	29	137	4.57+	591.38	5.18
DEN						
1	330	52	67	0.20+	20.30	4.0
5	308	97	134	0.44+	41.55	3.82
10	367	106	142	0.39+	44.30	4.58
20	260	121	206	0.79+	60.41	3.05
MMS						
0.05	274	38	46	0.17+	15.11	3.6
0.10	268	39	53	0.20+	18.3	3.7
0.5	261	81	106	0.41+	29.75	2.93
1	293	136	224	0.76+	52.75	2.76
β-PL						
25	401	47	86	0.21+	21.34	3.98
50	337	40	70	0.21+	17.34	3.34
100	387	64	119	0.31+	27.83	3.62
MMC						
0.3	494	38	41	0.08	8.71	4.2
0.6	473	44	48	0.10	8.88	3.5
1.2	339	74	85	0.25+	25.76	4.1