

197
2 ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CALIBRACION DEL PROTOCOLO PARA EVALUAR
ANTIMUTAGENOS EN LA PRUEBA DE MUTACION
Y RECOMBINACION SOMATICA (SMART) EN
ALAS DE *Drosophila melanogaster*.

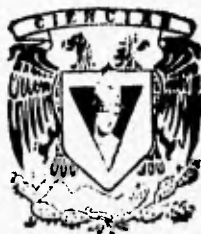
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

Y O L A N D A P A E Z S E R N A



DIRECTORA DE TESIS: DRA PATRICIA RAMOS MORALES



MEXICO, D. F. FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: " Calibración del protocolo para evaluar antimutágenos en la prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en alas de Drosophila melanogaster". realizado por Yolanda Páez Serna

con número de cuenta 8723429-7 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Dra. Patricia Ramos Morales.
Propietario

Propietario / Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre.

Propietario / Biol. Ma. Isabel Gracia Mora.

Suplente M. en C. Juan Carlos Gaytan Oyarzun.

Suplente M. en C. Patricia Guadalupe Orozco Soto.

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo de Biología

M. en C. Alejandro Martínez Mena .

COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

DEDICATORIAS

A mis padres :

Por ser la guía de mi vida, por su amor y comprensión; por enseñarme que en la vida todo es posible con perseverancia y fé. Por estar siempre a mi lado apoyandome y creyendo en mí.

A mis hermanos:

Noé y Xochitl, expresión de fortaleza , ternura y amor ; por ser amistad y apoyo incondicional en mi vida . Por tener siempre la capacidad de dar sin recibir.

A mi esposo:

Con amor, ya que a tu lado he aprendido a compartir, a soñar y amar; por que a tu lado todo es posible; por creer en mí y por ser el amor de mi vida.

A la mis suegros:

Por su apoyo y comprensión; por ser parte de mi vida.

A la familia Chavarria Guadarrama:

Claudia, Carlos y Julian por su aceptación y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento y admiración, a la Dra. Patricia Ramos Morales, a quien debo este logro; por ser mi guía académica. Por tener siempre una sonrisa y una meta que compartir.

A los sinodales:

Dr. Javier Espinosa Aguirre.

Biol. Ma. Isabel Gracia Mora.

M. en C. Juan Carlos Gaytan Oyarzun.

M. en C. Patricia G. Orozco Soto.

Por sus atenciones y valiosos comentarios.

A todos mis amigos por su presencia y ayuda en todos los momentos de mi vida.

A Héctor, Julián y Armando por su paciente e insustituible asesoramiento a lo largo de este trabajo.

A los compañeros del laboratorio: Juan C., Lupita, Edna, Irma, Ma. de Jesús, Patricia O., Blanca, Yadira y Hugo; por su amistad, enseñanza y colaboración en la realización de este trabajo. Especialmente a Juan C. por su orientación constante y por introducirme a esta área de investigación.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Genética "Theodosius Dobzhansky" de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.

INDICE

RESUMEN	ii
INTRODUCCION	1
Toxicología.....	1
Compuestos Carcinogénicos y Anticarcinogénicos	7
N-Nitrosodimetilamina	8
Azida de sodio	10
Cianato de sodio	15
<u>Drosophila melanogaster</u>	17
MATERIAL Y METODOS	26
Compuestos Químicos	26
Cruza y Marcadores	26
Sincronización	27
Tratamiento	27
Registro de Manchas	29
Análisis Estadístico.....	31
RESULTADOS	32
DISCUSION	45
CONCLUSIONES	56
REFERENCIAS	57

RESUMEN

El cianato de sodio es un compuesto con propiedades antineoplásicas que se utiliza en el tratamiento de mielomas, hepatomas y en otras alteraciones de los eritrocitos, atribuido esto último a su capacidad de carbamilación irreversible en los residuos NH^2 -terminal de la valina de alfa y beta globulinas. Esta sal es biotransformada de forma selectiva a nivel de síntesis de proteínas en células tumorales; su presencia puede inhibir la incorporación de aminoácidos en las proteínas citoplasmáticas y nucleares. Inhibe la acción del benzo(a)pireno y del 7'12'dimetilbenzo(a)antraceno. Aunque realmente no se conoce el mecanismo de acción del cianato de sodio, se sabe que actúa específicamente en células dañadas.

Los objetivos de la presente tesis son: 1) Evaluar la eficiencia de la prueba de mutación y recombinación somática (SMART), como una metodología para probar relaciones de sinergismo o antagonismo entre diversos compuestos en las células somáticas de Drosophila melanogaster y, 2) Determinar el efecto del cianato de sodio (CNNAO) sobre la genotoxicidad de la N-nitrosodimetilamina (DMN) y de la azida de sodio (NaN₃).

Larvas transheterocigóticas *flr3* +/- mwh de 72 horas de edad., obtenidas de la cruce entre ♀♀ *flr¹/TM3*, Ser X ♂♂ mwh/mwh, se sometieron a los siguientes tratamientos.

Se expusieron larvas de 72 ± 4 horas a un primer tratamiento de 6 horas (tratamiento agudo) con sacarosa (5%); DMN (10 y 12.5 mM) ó NaN₃ (2.5, 7.5 y 12.5 mM) y un segundo tratamiento de 48 horas (tratamiento crónico) con el cianato de sodio (10, 50 y 100 ppm) obteniendo una exposición total de 6 X 48 horas.

Se montaron laminillas con las alas de los organismos adultos transheterocigóticos, las cuales se revisaron a 40 X. Se registró el número, tamaño y tipo de manchas inducidas. El análisis estadístico se realizó con el programa de cómputo SMART a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

En este trabajo se encontró que el cianato de sodio no es genotóxico cuando se administra por alimentación a larvas de tercer estadio de Drosophila melanogaster en tratamiento crónico. Sin embargo muestra un comportamiento mitogénico en concentraciones mayores a 50 ppm.

El cianato de sodio incrementó la genotoxicidad de la DMN en tratamientos combinados; y mostró interferencia negativa cuando se le administró con azida de sodio.

El presente trabajo muestra que la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en células de alas de Drosophila melanogaster es una metodología sensible, versátil y económica para estudiar las interacciones entre varios compuestos.

INTRODUCCION

Toxicología

La toxicología estudia los efectos de sustancias nocivas (compuestos tóxicos) para los sistemas biológicos; además de intentar establecer la magnitud del daño inducido en función de la exposición a dichas sustancias. Se puede definir como tóxico ambiental a toda aquella sustancia potencialmente nociva que se encuentra diseminada en los diversos ecosistemas (Vega, 1985).

La exposición de los seres vivos a agentes químicos ambientales potencialmente peligrosos es frecuente. Se calcula que más de 100,000 productos químicos han sido elaborados para uso comercial e industrial, por ejemplo: aditivos de alimentos, cosméticos, medicamentos, plagicidas y otros más (De Serres, 1979) (Tabla I).

De acuerdo con Timbrell (1989), alrededor de 65,000 compuestos químicos se producen cada año en los Estados Unidos, y a éstos se suman entre 500 y 1000 sustancias nuevas anualmente. La presencia de estos compuestos en el ambiente es importante en la medida que se desconoce el riesgo genético que representan para los seres vivos.

El impacto de los contaminantes en los organismos será diferente dependiendo del tipo de células afectadas. Cuando el efecto se localiza en células germinales, el daño se manifestará en las generaciones siguientes (Loprieno, 1980); mientras que la inducción de mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas en células somáticas se ha asociado con el desarrollo de procesos

Tabla 1. Clasificación de mutágenos ambientales (Modificado de Meutchen, 1986).

Sustancias mutágenas sintetizadas por el hombre y usadas directamente en condiciones específicas.				
A. Fármacos	B. Plaguicidas	C. Aditivos		
a. agentes antitumorales	a. insecticidas	a. alimentos		
b. anestésicos	b. raticidas	b. otros		
c. narcóticos	c. herbicidas	(cosméticos)		
d. anticonceptivos	d. fungicidas			
e. anestésicos				
f. anestésicos				
Sustancias mutágenas en la industria o que se encuentran en el ambiente como productos industriales.				
A. Agentes alquilantes	B. Solventes orgánicos	C. Contaminantes del agua	D. Contaminantes del aire	E. Metales pesados
	compuestos organo-metálicos			
Sustancias mutágenas naturales.				
A. Alcoholes	B. Productos del metabolismo microbiano			

cancerosos (Loprieno, 1980; De Flora y Ramel, 1988).

El aumento en la frecuencia de enfermedades y malformaciones congénitas ha impulsado el estudio de posibles factores ambientales asociados a la etiología de dichas alteraciones. El continuo incremento en las tasas de morbilidad y mortalidad por cáncer ha intensificado la búsqueda de alternativas terapéuticas enfocadas a identificar sustancias con propiedades específicas que puedan combatirlo, retrasar su desarrollo o prevenir su aparición. Así, se trabaja con gran variedad de sustancias, entre las que se incluyen de manera predominante productos naturales derivados de plantas y animales y otros compuestos que se han sintetizado con esta finalidad.

La investigación de la actividad genotóxica de los compuestos que representan un riesgo mutagénico y/o carcinogénico para los seres humanos se ha multiplicado en los últimos años (Ames et al., 1973; Clayson, 1980; Graf et al., 1984), centrándose en dos aspectos que han resultado reiterativos en diferentes estudios experimentales: existe una clara asociación entre la actividad recombinogénica y la carcinogénesis y, el inicio de un proceso canceroso frecuentemente está relacionado con cambios en la información genética de las células, es decir, tiene una base mutacional (Ames et al., 1973; Vogel et al., 1980; Cairns, 1981).

Para detectar y cuantificar cantidades mínimas de compuestos ambientales potencialmente tóxicos se han desarrollado métodos analíticos de alta sensibilidad. La información así obtenida ha contribuido a determinar el significado toxicológico de la

exposición a bajas concentraciones de contaminantes (Vega, 1985).

Los compuestos ambientales de mayor interés en la toxicología genética, una rama interdisciplinaria en la que confluyen áreas del conocimiento como toxicología, genética, química y medicina entre otras, son aquellos con capacidad mutagénica, carcinogénica y teratogénica; además de otros cuya acción tóxica se manifiesta como infertilidad, aborto espontáneo y/o muerte fetal. A este último tipo de manifestaciones en forma genérica se le denomina daño reproductivo.

Así, un compuesto es considerado genotóxico si se ajusta a la definición propuesta por el comité de trabajo de la ICPEMC (International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens): "...un agente que produce una respuesta positiva en cualquier bioensayo que mida cualquier evento genético terminal...". Por lo anterior, para que un compuesto químico sea considerado no genotóxico se requiere su inactividad en las pruebas que miden los siguientes tipos de efectos: modificación de la secuencia de bases del ADN, rearrreglos del ADN, alteraciones de la segregación de cromosomas y daño a la integridad cromosómica, entre otros (Brusick, 1987).

Uno de los objetivos principales de la genética toxicológica consiste en detectar y comprender las propiedades de un pequeño grupo de compuestos químicos altamente específicos para los ácidos nucleicos, y en particular para el ADN, que puede producir cambios en el material genético (Vogel, 1992). Para lograr lo anterior los esfuerzos en esta área se han centrado en:

1) implementar pruebas y métodos para evaluar el riesgo y definir el impacto de los agentes genotóxicos ambientales cuya presencia puede alterar la integridad del acervo genético humano (efectos en células germinales); 2) elucidar las relaciones entre genotoxicidad y la iniciación de neoplasias (inducción de tumores o cáncer) (Vogel, 1992).

Muchos carcinógenos químicos muestran su actividad iniciadora a través de interacciones con el ADN nuclear que se pueden manifestar como daño genético permanente, del tipo de mutaciones y aberraciones cromosómicas. El rango de compuestos químicos potencialmente peligrosos va desde metales y compuestos inorgánicos hasta moléculas orgánicas muy complejas (Timbrell, 1989) (Fig.1).

La iniciación de daño genético en células somáticas (carcinogénesis), o en células germinales (mutagénesis) está determinada por diferentes factores:

- A. La ruta de administración, forma de aplicación, tasa de absorción, adsorción, distribución y eliminación de los compuestos.
- B. La capacidad de biotransformación del organismo afectado (activación metabólica y desactivación).
- C. El tipo de interacción con el ADN (radicales libres, intercalación electrofílica).
- D. La tasa de reacción con el ADN y otras biomoléculas.
- E. El tipo y distribución de aductos en el ADN.
- F. La participación de daño secundario al ADN (ligamentos cruzados, sitiosapurínicos, y otros).

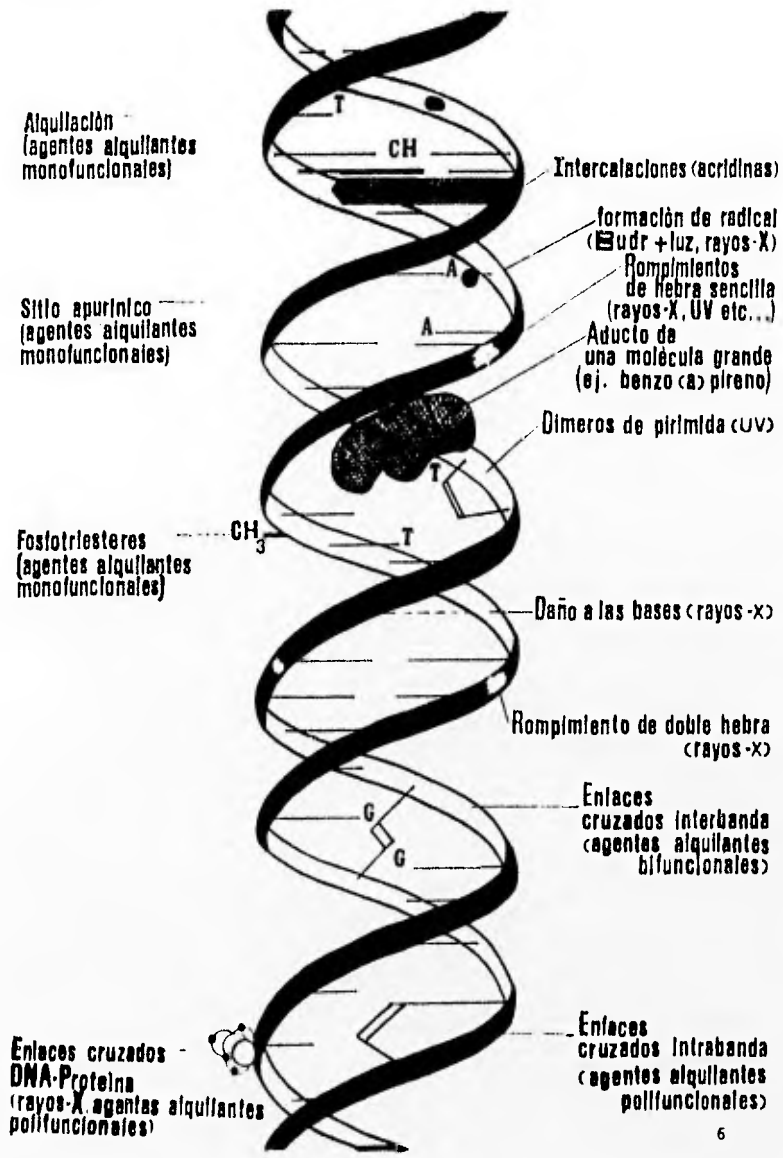


Fig. 1 Interacción del DNA con agentes físicos y químicos (Obe y Natarajan, 1982)

G. Reparación del daño al ADN (sujeta o libre de error, o la ausencia de reparación).

H. Tasa de división celular.

I. Expresión del daño genético.

J. Tiempo transcurrido entre el tratamiento y el efecto genético.

A su vez, estos eventos son modulados por una variedad de parámetros químicos asociados a los compuestos: lipofilicidad, factores estéricos, interacción con enzimas, reactividad absoluta y relativa, actividad óptica, mono y multifuncionalidad (Zijlstra, 1987; Waters et al., 1990).

Los compuestos tóxicos pueden dividirse en: directos (compuestos genotóxicos terminales), ya que reaccionan con el ADN o las proteínas sin requerir biotransformación; e indirectos, que requieren de activación metabólica (compuestos precursores o promutágenos), los cuales pueden no tener propiedades genotóxicas per se, pero se convierten en especies genotóxicas al ser biotransformados (Vogel, 1991).

Compuestos carcinogénicos y anticarcinogénicos

Algunos compuestos han sido claramente identificados como inductores de modificaciones en el ADN, por lo que se han incorporado a la investigación experimental con la finalidad de reproducir efectos conocidos en condiciones controladas, tal es el caso de la N-nitrosodimetilamina (DMN).

N-nitrosodimetilamina (DMN)

Es un líquido amarillo de baja viscosidad, altamente soluble en agua, alcohol, éter y en la mayoría de los solventes orgánicos, incluyendo lípidos; es muy volátil. Su fórmula química es $(CH_3)_2NNO$ y está constituida por 32% de C, 8.16% de H, 37.82% de N, y 21.60% de O. Su peso molecular es 74.08 g/l y su densidad es 1.0048 g/ml (Index Merck, 1989).

Con el descubrimiento de la actividad mutagénica y carcinogénica de la N-nitrosodimetilamina se ha reunido gran cantidad de información implicando de manera general a los compuestos N-nitroso y otros agentes alquilantes como clases representativas de compuestos carcinogénicos (Laval *et al.*, 1990).

La DMN se encuentra en trazas principalmente en el humo condensado de tabaco y en carnes curadas como tocino, pescado salado y productos ahumados. Se forma por la interacción del nitrito con dimetilamina, y por la acción de bacterias reductoras de nitrato. Se le ha clasificado como una sustancia de acción indirecta ya que requiere de la participación del metabolismo para ser reactiva (Index Merck, 1989; Nouse *et al.*, 1992) (Fig. 2).

Se le utiliza como solvente, en la síntesis del combustible 1-1 dimetil-hidrazida, en la industria del plástico y la fibra, como antioxidante, aditivo para lubricantes y en condensadores (para incrementar la constante dieléctrica); también se ha usado como nematocida (Index Merck, 1989).

La DMN es considerada hepatocarcinogénica, ya que aumenta de manera significativa la proliferación celular de hepatocitos e

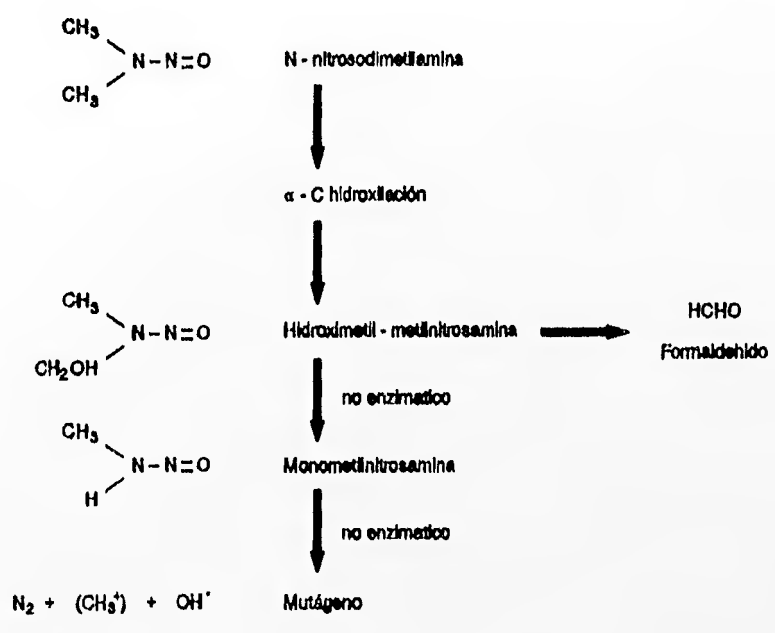


Fig. 2 Biotransformación de la N-nitrosodimetilamina (DMN) (Margison y O'connor, 1970).

induce aductos en células de hígado de ratón (Jeong y Yang, 1992; Mirsalis et al., 1993).

Brummer y Rabes, (1992) clasificaron alrededor de 49 tipos de tumores inducidos por la DMN en riñón de rata y reportaron que la cinética de proliferación celular varía para cada tipo de tumor. Además de su actividad mutagénica y carcinogénica en animales, se ha reportado que en plantas como Arabidopsis thaliana provoca alteraciones con atributos neoplásicos (Gichner et al., 1993).

En anfibios, inhibe la regeneración, particularmente en los miembros inferiores de Triturus cristatus; el crecimiento y la morfogénesis son afectados de forma diferente dependiendo de la concentración que se administre del carcinógeno (Koussoulakos, 1992). En células germinales de Drosophila melanogaster induce mutaciones letales recesivas ligadas al sexo, pérdida de cromosomas sexuales y, en menor grado no-disyunción, siendo mayor el efecto cuando se administra por alimentación (Vogel y Sobels, 1976). En células somáticas de las alas y de los ojos de la mosca induce mutación y recombinación cuando se trata a larvas de diferentes edades, aún a bajas concentraciones (Vogel et al., 1980; Graf et al., 1984; Ordaz, 1991).

Azida de sodio (NaN₃)

Es una sal que a temperatura ambiente forma cristales hexagonales; está constituida por 64.64% de N, 35.36% de Na. La azida de sodio es una sal altamente soluble en agua fría o

caliente, e insoluble en éter; es relativamente estable, con un pK de 4.8, al descomponerse produce ácido hidrazoico por lo que puede considerarse que todas las soluciones de azida de sodio contienen cierto porcentaje de éste. Las soluciones ácidas son ricas en ácido hidrazoico no cargado, el cual tiene un punto de ebullición de 37°C, por lo que se evapora rápidamente en soluciones acuosas (Kleinhofs et al., 1978; Beyer, 1987).

Es usada en la preparación del ácido hidrazoico y en la síntesis de azida de plomo y sodio puro; en la selección diferencial de bacterias, en el conteo automático de células sanguíneas y como preservativo de reactivos de laboratorio. En la agricultura se usa como nematocida, fungicida, herbicida, estimulante de la germinación y desinfectante de granos (Index Merck, 1989). En la industria automotriz se le utiliza, por su gran reactividad como generador de nitrógeno en las bolsas inflables de seguridad (Tomlinson, 1980; Index Merck, 1989). También se usa como conservador de vinos y de productos de diagnóstico para medicina y, al ser un potente vasodilatador, para controlar la presión sanguínea en el tratamiento de la hipertensión. En la investigación biomédica, es un inhibidor respiratorio y un bactericida selectivo. En la industria, las azidas metálicas se usan como detonadores, en la producción de caucho, en la purificación de aleaciones de aluminio y de silicón con aluminio; para prevenir la oxidación del acero y/o reducir la coagulación de látex de estireno-butadieno (Nilan et al., 1973; Tomlinson, 1980; Index Merck, 1989).

Los derivados de azida se han utilizan como compuestos de

fotoafinidad para estudiar la unión de ligandos a las proteínas (Kleinhofs et al., 1978; Beyer, 1987).

Las azidas pueden clasificarse en dos grupos principales: inorgánicas, que tienen un grupo azida simétrico y cierto grado de unión iónica; y orgánicas, las cuales presentan una unión covalente. Las primeras pueden agruparse en cinco clases:

- 1) Azidas simples, son azidas metálicas sencillas como la azida de sodio (NaN_3), azida de potasio (KN_3) y la azida de bario ($\text{Ba}(\text{N}_3)_2$). En estos compuestos todas las valencias están unidas al grupo azida.
- 2) Azidas compuestas, formadas por un grupo azida y otros ligandos, como las azidas halidas y las azidas básicas (p. ej. el níquel hidróxido azida $(\text{OH})\text{Ni}(\text{N}_3)_2$).
- 3) Hetero-azidas, estos compuestos contienen el grupo azida unido covalentemente a una estructura de al menos dos elementos de los grupos V y VI de la tabla periódica.
- 4) Complejos azida, formados por un ión azida como la esfera ligando interior.
- 5) Azidas metalorgánicas, representan una clase de compuestos que presentan una combinación metal-carbón y metal-azida (González, 1994).

Nilan et al. (1973) proponen que a pH bajos (ácidos) la azida actúa con mayor eficiencia; al ser una molécula neutra es probable que en estas condiciones pueda atravesar más fácilmente las membranas celulares. Se le puede encontrar como sal de sodio o de potasio, las cuales reaccionan con electrófilos y nucleófilos. La

descomposición de azidas inorgánicas por calor produce gas nitrógeno y un residuo metálico o nitritos, óxidos, hidroazidas y carbonatos (González, 1994).

Kleinhofs et al (1978) sugieren que numerosas hemoproteínas, otras enzimas que contienen zinc y otros metales son inhibidas por la azida; entre las que se incluyen enzimas dependientes de fosfato de piridoxal o de grupos disulfuro. La azida de sodio inhibe a la catalasa, la respiración celular, la oxidación del citocromo c y la reacción indofenol. Los efectos se deben principalmente a la interacción de azida con proteínas o enzimas del grupo hemo. Cuando el ión azida está involucrado (N_3^-) el pH se ubica por arriba del nivel fisiológico (7.5-8.5). Si además está el ácido libre (HN_3) no disociado, el efecto del pH puede ser muy grande y la inhibición se incrementa al disminuir éste.

Se han estudiado los efectos fisiológicos de azida de sodio en diversos organismos: bacterias, algas, ciliados, gusanos, crustáceos, insectos, plantas y algunos vertebrados; en la mayoría de los organismos tiene un fuerte efecto tóxico. La dosis letal cincuenta (LD_{50}) que se ha reportado para ratas vía inyección i.p. es de 35-38 mg/kg de peso corporal; en éstas el ácido hidrazoico es letal en concentraciones superiores a 1160 ppm durante una hora (Kleinhofs et al., 1978).

Gordon et al (1990) proponen que en humanos pequeñas dosis de azida de sodio provocan una marcada caída en la presión sanguínea.

En monos, la administración frecuente y repetida de azida de sodio produce desmielinización y necrosis del nervio óptico, la

necrosis puede originarse de una dosis simple o por exposición crónica; y se asocia con inconsciencia prolongada. Las alteraciones producidas en la corteza cerebral por azida inyectada ocasionan ataxia debido a la destrucción cortical cerebral; hiperquinesis e hipoquinesis, que correlacionan con cambios morfológicos en el sistema nervioso central (Kleinhofs et al., 1978). En mamíferos se reporta como un potente agente hipotensivo que al estimular los mecanismos cardiovascular vagal y simpático afecta el cronotropismo y el inotropismo del corazón in vivo (Kleinhofs et al., 1978; Gordon et al., 1990).

Gordon et al (1990) describen que las administraciones crónicas a individuos hipertensos (0.6-1.3 mg, 3-4 veces al día por más de dos años) producen un marcado descenso en la presión sanguínea hasta niveles normales, dosis mayores a los 4 mg/kg producen convulsiones y muerte.

Existe controversia en relación a la genotoxicidad de la azida de sodio, por una parte se ha probado que es un potente mutágeno en algunos sistemas bacterianos (provoca transiciones A.T → G.C), y en cebada (Kleinhofs et al., 1978); mientras que por otra, se le considera no genotóxica en organismos superiores y aún, se le atribuye potencial antimutagénico. En células de mamíferos no induce aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas, ni daño al ADN. Probablemente esta variedad de ejemplos se relaciona con la potente actividad de la azida de sodio como atrapador de oxígeno excitado (oxígeno singulete, 1O_2), el cual induce daño oxidativo.

Existen reportes de la activación de la azida de sodio a un metabolito mutagénico. La ruta de biotransformación implica a la enzima O-acetilserina sulfidrilasa, la cual convierte O-acetilserina en presencia de azida a β -azidoalanina, que es la forma reactiva (Owais et al. 1981 b). No se ha excluido la posibilidad de que β -azidoalanina requiera bioactivación adicional.

Kamra y Gollapudi (1979) no encontraron incrementos significativos en la frecuencia de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en machos de Drosophila melanogaster inyectados con soluciones amortiguadoras de azida de sodio (0.1, 1 y 5 mM) en un rango de pH 3.8 - 4.6. Sin embargo, en moscas alimentadas por tres días con azida de sodio (0.1 mM) a pH 4.6 observaron un ligero efecto mutagénico.

En células somáticas de Drosophila, larvas expuestas a tratamientos agudos (6 horas) de azida de sodio (7.3 - 14.7 mM) mostraron una débil respuesta positiva en la frecuencia de mutación y recombinación somáticas (Delgado, 1990). Sin embargo, en tratamientos subcrónicos con bajas concentraciones se encontró que la azida de sodio es mutagénica e induce recombinación en células somáticas de Drosophila (González, 1994), probablemente la diferencia en la respuesta obtenida en estos reportes radica en la alta toxicidad del compuesto, especialmente en los tratamientos agudos en los que se utilizan concentraciones relativamente altas.

CIANATO DE SODIO (CNNaO)

Su fórmula molecular es CNNaO, es una sal, que contiene 35.36%

de Na, 24.61% de O, 21.55% de N y 18.47% de C. Es soluble en agua y alcohol e insoluble en éter; se descompone en NaCO₃ y urea (Index Merck, 1989).

El cianato de sodio no parece ser genotóxico en diversos organismos, sin embargo existen evidencias que muestran su potencial anticarcinogénico, por lo que se le usa en el tratamiento de mielomas, hepatomas y en algunas enfermedades de los eritrocitos (Cerami et al., 1973; Wattenberg, 1980).

Esta sal es un inhibidor selectivo de la síntesis de proteínas en una gran variedad de células tumorales de mamíferos y tiene actividad antitumoral local en el sitio donde se inyecta (Shenouda y Hutchinson, 1993).

En 1977, Alfrey et al. probaron que esta sal requiere ser blotransformada para ser reactiva (acción indirecta). Los diferentes niveles de síntesis de proteínas de algunas células tumorales activan de forma selectiva a este compuesto. Cianato de sodio puede impedir la incorporación de aminoácidos en las proteínas citoplasmáticas y nucleares, además de inhibir la acción del benzo(a)pireno y del 7-12-dimetilbenzo(a)antraceno, que inducen neoplasias pulmonares en la cepa A/J de ratón.

El cianato de sodio inhibe la proliferación de los eritrocitos en casos de leucemia, lo que se atribuye a su capacidad de carbamilación irreversible por los residuos de NH²-terminal de la valina y de alfa y betas globulinas (Cerami y Manning, 1973).

El cianato de sodio se ha empleado como un fármaco en el tratamiento de anemias. Cerami et al. (1973) mostraron que

incrementa la afinidad por el oxígeno en la sangre de simios y perros. Sin embargo, la administración crónica del cianato de sodio puede traer consigo efectos tóxicos (Rivera et al., 1991); y llevar a la acumulación de grupos carbamil en la hemoglobina. Se ha probado que aproximadamente un grupo carbamil del tetrámero de la hemoglobina es alcanzado por el cianato de sodio (Cerami, et al.; 1973). En músculo esquelético de perro el cianato de sodio muestra alta afinidad por el oxígeno (O₂) (Kohzuki y Enoki, 1993).

Aunque se desconoce el mecanismo de acción del cianato de sodio, se ha determinado que éste actúa específicamente en células que se encuentran dañadas.

Drosophila melanogaster como sistema de prueba

La mosca de la fruta Drosophila melanogaster es el eucarionte mejor conocido genéticamente, razón por la cual se le emplea en diversos tipos de investigaciones; ofrece numerosas ventajas que permiten utilizarla como un sistema de prueba animal rápido, versátil y eficiente, con el que puede analizarse un amplio espectro de alteraciones genéticas inducidas por agentes ambientales, tanto en células somáticas como en células germinales; se le puede mantener en espacios pequeños y el costo de su manutención es reducido, en comparación con los sistemas de mamíferos. Por la duración de su ciclo de vida, proporciona gran número de generaciones en corto tiempo, tiene un número cromosómico bajo ($2n=8$) y las larvas presentan cromosomas gigantes en sus glándulas salivales, los cuales se han utilizado en estudios

citogenéticos para mutagénesis y evolución (Ramos et al., 1993).

Los compuestos se pueden administrar por diferentes rutas de exposición, además de que permite la detección de virtualmente todos los eventos genéticos inducidos: sustitución de pares de bases en el ADN, mutaciones génicas o puntuales con efecto deletéreo, deleciones pequeñas, rearrreglos cromosómicos como inversiones y translocaciones, no disyunción, recombinación en las células germinales y en las células somáticas, entre otras.

Desde el momento en que la hembra oviposita el huevo hasta que emerge el imago (adulto), el ciclo de vida de Drosophila melanogaster es de 9.5 a 10 días, a 25 ± 1 °C y 60 % de humedad relativa. La larva pasa por tres estadios y dos mudas larvales; la primera de ellas ocurre a las 25 h y la segunda, a las 48 h; el pupario se forma aproximadamente a las 96 h (Demerec, 1965; Roberts, 1986; Ramos et al., 1993) (Fig. 3).

Pasado el desarrollo embrionario, eclosiona del huevo una larva (de primer estadio), la cual se encuentra formada por 12 segmentos no aparentes (Demerec, 1965). La larva presenta dos linajes celulares diferentes; las células larvarias y las imagales. Las células larvarias forman todo el cuerpo de la larva, han perdido su capacidad de división y sólo aumentan de volumen; en algunas se presentan cromosomas politénicos, son poliploides y están determinadas y diferenciadas genéticamente. Las células imagales se localizan en pequeñas estructuras denominadas discos imagales y no están involucradas de manera aparente con alguna función indispensable para la sobrevivencia de la larva, son

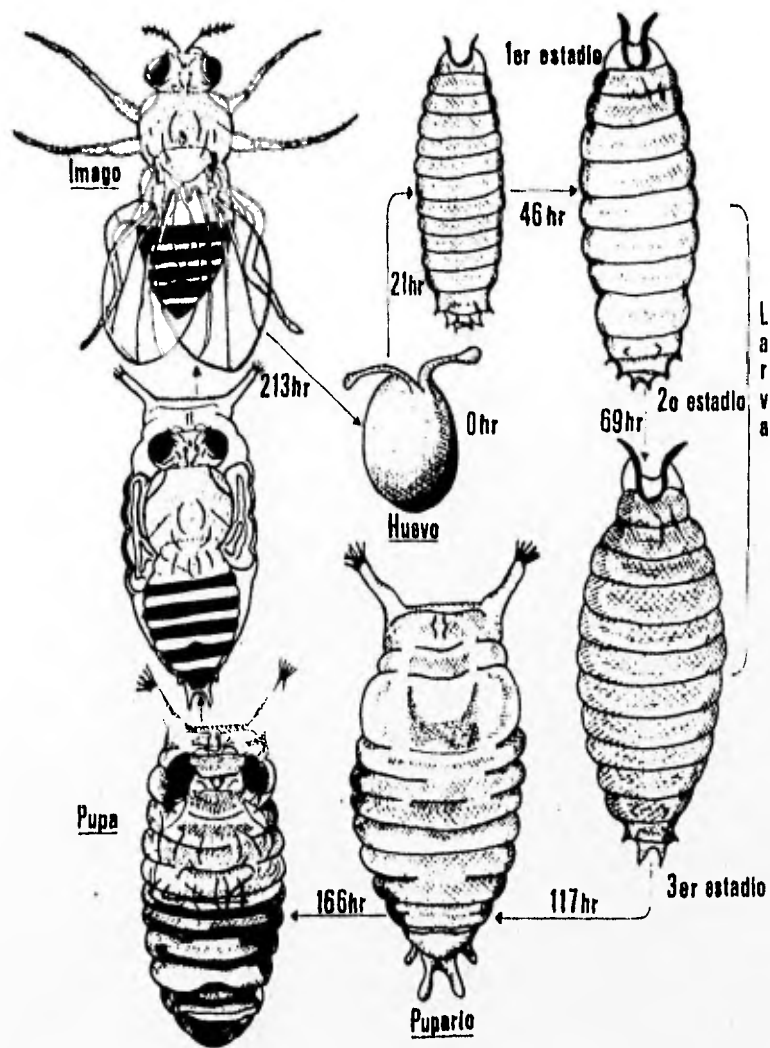


Fig. 3 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*, (25°C).

distinguibles de las células larvales por su menor tamaño, su constitución diploide y la retención de la capacidad de división celular; están determinadas genéticamente, pero sólo alcanzan su diferenciación cuando entran a metamorfosis (Demerec, 1965; Wilkins, 1986; Würzler y Vogel, 1986; Pomerai, 1990; Ramos et al., 1993).

Durante la metamorfosis, la hormona ecdisona desencadena una serie de cambios en el organismo, los cuales involucran la destrucción de ciertos tejidos y órganos larvarios y la organización de las estructuras del adulto a partir de un complejo de células primitivas, los llamados discos imagales. La mayor parte de los órganos del adulto se forman a partir de éstos, o bien por células larvarias que se diferencian al ocurrir la reorganización del estado pupal.

Las extremidades, ojos, antenas, alas y el aparato genital se diferencian a partir de su disco imagal respectivo, que sufre una histogénesis durante el desarrollo pupal dando origen a las distintas partes del cuerpo del adulto (Ramos et al., 1993) (Fig. 4).

Análisis bioquímicos realizados tanto en larvas como en organismos adultos de Drosophila, indican que en ellos se detectan complejos enzimáticos semejantes a los de la fracción S9 del hígado de los mamíferos, razón por la cual Drosophila se ha empleado en mutagénesis como modelo experimental in vivo, ya que la capacidad de biotransformación de promutágenos de este sistema de prueba es similar a la detectada en los mamíferos (Vogel y Zijlstra, 1987).

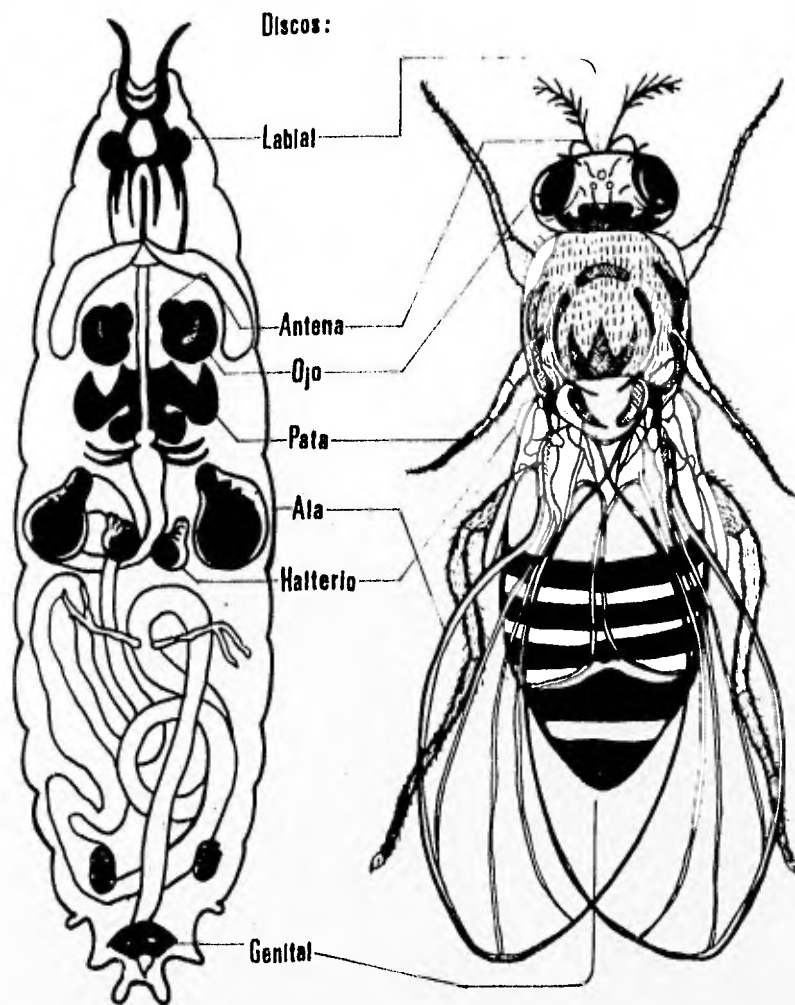


Fig. 4 Los discos imagales de *Drosophila melanogaster* originan diversas estructuras del adulto por una serie de divisiones mitóticas.

Para realizar la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) en células de las alas de Drosophila melanogaster se utilizan larvas transheterocigóticas para dos marcadores fenotípicos recesivos localizados en el tercer cromosoma que controlan el aspecto de los tricomas, o procesos unicelulares que forman las células diferenciadas de la superficie de las alas: pelos múltiples en el ala (multiple wing hair, mwh) y flama (flare, fir²), ubicados a 0.0 y 39.0 unidades de mapa sobre el cromosoma 3, respectivamente; de tal forma que si durante el desarrollo de las alas ocurren cambios en la información de las células, se originarán clones celulares que se harán evidentes como manchas fenotípicas mutantes que podrán distinguirse del resto de las células -de tipo silvestre- a través de la expresión fenotípica de los tricomas en la mosca adulta (García-Bellido y Merriam, 1971). Esta prueba tiene valores más altos de sensibilidad (0.75-0.78) y especificidad (0.83-0.86) que la de letales recesivos ligados al sexo (SLRLT) (0.33-0.79 y 0.50-0.73, respectivamente) cuando se analizan compuestos no alquilantes (Vogel, 1987; Graf y Würigler, 1988; Vogel y Szakmary, 1990).

En la prueba de mutación y recombinación somáticas, aquellos eventos provenientes de mutación puntual, delección, no disyunción y la recombinación entre los marcadores utilizados (fir³ y mwh), originarán una mancha simple en la que las células involucradas expresarán sólo uno de los marcadores mutantes (Fig. 5). Únicamente los eventos de recombinación que ocurren entre el marcador proximal (fir²) y el centrómero, darán origen a manchas gemelas, en las

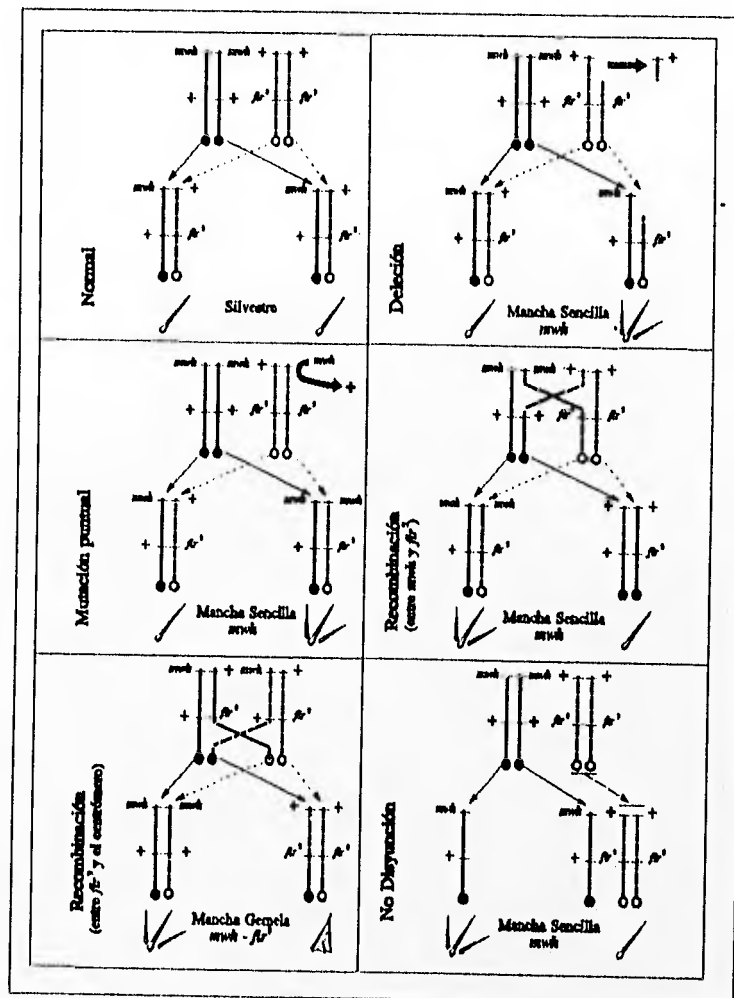


Fig. 5 Eventos genéticos y tipos de manchas detectados en la SMART (Modificado de Graf *et al.*, 1984).

cuales las células expresarán los dos marcadores de manera independiente (Fig. 5). Por su origen, las manchas gemelas son indicadoras de recombinación, por lo que en la prueba SMART puede estimarse la capacidad inductora de recombinación de un compuesto en particular, al distinguirse entre éstos eventos y otros. Se ha determinado que aproximadamente el 80 % de los compuestos que inducen recombinación en bacterias son carcinógenos cuando se prueban en mamíferos (Ames et al., 1973; Vogel et al., 1980; Radman y Kinsella, 1980; Cairns, 1981).

Los tratamientos en la prueba SMART pueden abarcar toda la fase larvaria o sólo una parte de ésta. Los tratamientos agudos pueden seleccionarse para probar compuestos con vida media corta, para exposiciones a altas concentraciones, o cuando se desea localizar específicamente el efecto provocado. En adición a lo anterior, los tratamientos de mayor duración se utilizan para compuestos químicamente estables y exposiciones a bajas concentraciones por períodos prolongados. Debido a la duración de la fase larvaria, es posible exponer a las larvas a más de un tratamiento, de manera que puede determinarse si el orden en que éstos son aplicados modifica su genotoxicidad; o bien, administrar simultáneamente ambos compuestos (co-tratamientos), con lo que es posible estimar si la interacción química entre ellos altera el efecto inducido.

Los tratamientos combinados pueden usarse, por ejemplo, en la determinación de la capacidad antimutagénica de algún compuesto, definida como la disminución del efecto inducido por otros

mutágenos. Este protocolo se ha utilizado exitosamente para probar el potencial antimutagénico de derivados vegetales en Drosophila (Muñoz, 1994). Y para comparar resinas obtenidas de la raíz de tres especies del género Ipomoea en relación con su capacidad para proteger a la mosca del daño inducido por el promutágeno alquilante N-nitrosodimetilamina (DMN). La prueba SMART mostró que una de ellas es antimutagénica, es decir, reduce el daño inducido por la DMN; otra de las resinas probadas no mostró protección alguna y, la tercera potenció el daño inducido por la DMN (Muñoz, 1994).

Es importante continuar con la evaluación de las ventajas de este tipo de protocolos para llegar a establecer su aplicabilidad y limitaciones en el estudio de la antimutagénesis, lo que incrementará la obtención de información en este sentido; así como estudiar otro tipo de compuestos que se utilizan experimentalmente, y de los que no se conoce su mecanismo de acción.

OBJETIVOS

Este trabajo se realizó con un doble objetivo:

- 1) Contribuir a evaluar la eficiencia de la prueba de mutación y recombinación somática (SMART), como una metodología para probar interacción entre diversos compuestos en las células somáticas de Drosophila melanogaster.
- 2) Determinar el efecto del cianato de sodio (NaNCO) sobre la genotoxicidad de la N-nitrosodimetilamina (DMN) y de la azida

de sodio (NaN₃).

MATERIALES Y METODOS

Compuestos químicos :

Las sustancias y compuestos utilizados fueron: azida de sodio (NaN₃) CAS [26628-22-8], N-nitrosodimetilamina (DMN) CAS [62-75-9], Merck y, Cianato de sodio (CNNaO) CAS [917-61-3] Janssen Química.

Cruza y marcadores

Se utilizaron larvas + flr³/mwh + de 72 ± 4 h de edad; las cuales se obtuvieron de la crua progenitora ♀♀ flr³/TM3,Ser X ♂♂ mwh/mwh.

El marcador (flr³/TM3,Ser) "flare" se localiza a 39 unidades de mapa en el cromosoma 3; es letal en condición homocigótica en células germinales, pero puede expresarse en células somáticas produciendo tricomas en forma de flama (García Bellido y Dapena 1974). Para el mantenimiento de esta línea se usa el cromosoma balanceador TM3,Ser (el cual presenta múltiples inversiones que abarcan gran parte del cromosoma 3 y que no permiten recobrar eventos de recombinación, para distinguir a las moscas portadoras del cromosoma balanceador se utiliza el marcador "Serrata" (Ser), un gen letal dominante que produce indentaciones en el borde distal de las alas, de esta manera, las únicas moscas que sobreviven son las heterocigóticas para flr³ y para Ser, por lo que se tiene un sistema de letales balanceados (Russell, 1992). El marcador mwh (múltiples pelos en el ala) se encuentra en el cromosoma 3 a 0.0

unidades de mapa; y se manifiesta fenotípicamente porque altera el número de tricomas por célula; produciendo múltiples tricomas, en lugar de uno como en el fenotipo silvestre (Lindsley y Zimm, 1992).

Sincronización

Después de tres días de realizada la cruce, los progenitores fueron transferidos a frascos con medio de cultivo fresco en los que se colectaron huevos por un período de 8 h.

Tratamiento

En la figura 6 se muestra un resumen del protocolo seguido. Por flotación se recuperaron larvas de 72 ± 4 h utilizando una solución saturada de sacarosa según el procedimiento de Nöthiger (1970), posteriormente se colectaron mediante un embudo de separación de 4 mm de diámetro, en una malla fina de nylon; se enjuagaron y se colocaron grupos de 100 a 200 larvas en tubos homeopáticos que contenían una malla de nylon en un extremo y un tapón de poliuretano en el otro para impedir que las larvas escaparan. Los tubos con las larvas fueron colocados durante 6 h (tratamiento agudo) en vasos de precipitado que contenían 12 mg de celulosa y 0.3 ml de una solución de: sacarosa 5% (testigo negativo), DMN [10 ó 12.5 mM] disuelto en sacarosa al 5%, ó NaN₃ [2.5, 7.5 ó 12.5 mM] disuelto en sacarosa al 5% (testigos positivos), respectivamente. Transcurrido este tiempo las larvas se enjuagaron con agua corriente y se transfirieron a medio de cultivo

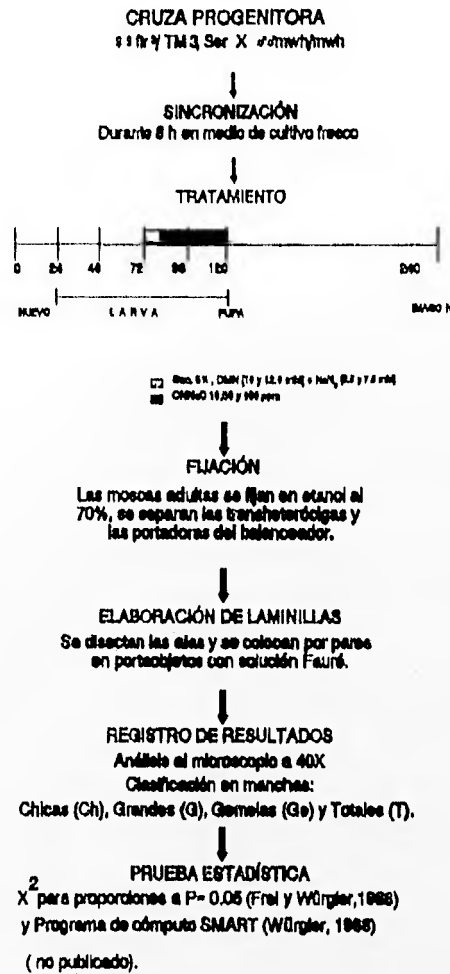


Fig. 6 Diseño experimental para la prueba de SMART en células somáticas del ala de *D.melanogaster*.

fresco que contenía 0, 10, 50 ó 100 ppm de cianato de sodio (CNNaO), el cual se colocó previamente en el medio de cultivo líquido a 60 °C y se dejó enfriar. Las larvas se dejaron en este medio (aproximadamente 48 h) hasta que emergieron como adultos (tratamiento subcrónico).

Cada experimento se repitió dos veces bajo las mismas condiciones para verificar la reproducibilidad de la respuesta, después de determinar estadísticamente que no existían diferencias significativas entre los resultados obtenidos en cada repetición, se procedió a sumar los datos de ambas para aumentar el tamaño de muestra.

Registro de las manchas.

Las moscas adultas transheterocigóticas que se recuperaron de los frascos experimentales y testigos respectivos fueron sacrificadas por sobredosis de éter y se fijaron en alcohol al 70% (Fig. 7). Las alas fueron separadas del organismo con ayuda de pinzas de relojero y se montaron en portaobjetos empleando solución Faure (Graf et al., 1984). En cada laminilla se colocaron 10 pares de alas de hembras y 10 pares de alas de machos. Las alas se revisaron a 40X, cuantificando el número, tipo y tamaño de manchas. Se considera que dos manchas son independientes cuando se separan por más de 2 hileras de tricomas normales (García-Bellido y Merriam, 1971; Graf et al., 1984).

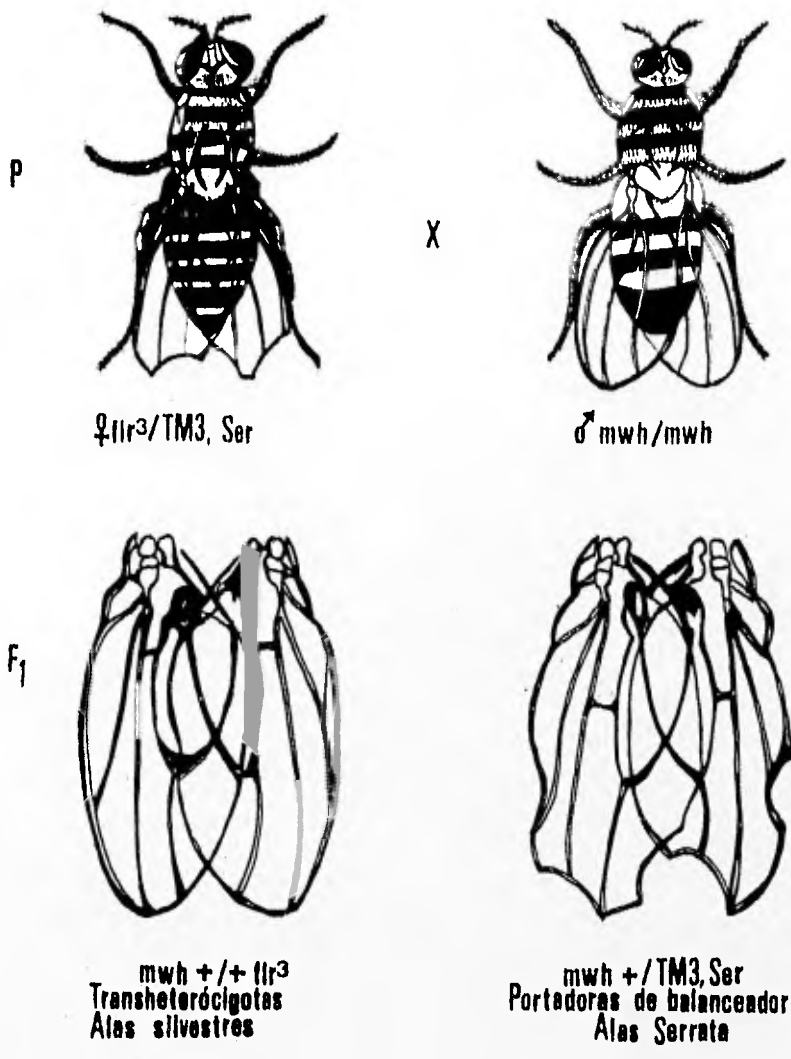


Fig. 7 Progenio de la crucea ♀♀ $11r^3/TM3, Ser$ X ♂♂ mwh/mwh .

Análisis estadístico.

Para determinar si existían diferencias significativas entre las series testigo y tratadas, se comparó la frecuencia de manchas de cada lote mediante el programa de cómputo SMART (Frei y Würgler, no publicado), a un $\alpha = 0.05$, y el procedimiento de decisión múltiple de Frei y Würgler (1988).

La hipótesis nula (H_0), estipula que no existe diferencia entre la frecuencia de mutación de las series testigo y las tratadas; por esta razón, su aceptación indica que el tratamiento no altera la frecuencia de mutación basal. El rechazo de esta hipótesis indica que hay un incremento estadístico significativo en la frecuencia de mutación basal.

La hipótesis alternativa (H_a) propone que el tratamiento incrementa m veces la frecuencia basal de mutación. Su rechazo indica que la frecuencia de mutación inducida no alcanza el incremento de frecuencia postulado (m), mientras que su aceptación señala un efecto positivo del tratamiento. El incremento propuesto m , indica el número de veces que debe aumentarse la frecuencia de mutación del lote testigo. $m = 2$ para manchas simples chicas y manchas totales, debido a que la frecuencia basal de este tipo de manchas es alta; y $m = 5$ para manchas simples grandes y manchas gemelas, debido a que la frecuencia de estos eventos es muy baja. Los resultados que pueden obtenerse del análisis son los siguientes: negativo (-), si se acepta la H_0 y se rechaza la H_a ; positivo (+), si se rechaza la H_0 y se acepta la H_a ; débil positivo (d+), si se rechazan ambas hipótesis, en cuyo caso la frecuencia de

mutación será mayor de la del lote testigo, pero no alcanzará el incremento propuesto; e, indeterminado (i), si se aceptan ambas hipótesis, ya que esto no puede ser cierto simultáneamente.

RESULTADOS

Se realizaron al menos dos repeticiones de cada tratamiento y se compararon los resultados obtenidos en cada una; al no encontrarse diferencias significativas, se procedió a sumar los datos de cada repetición para incrementar el tamaño de muestra.

El cianato de sodio fue probado por separado: 1) en los tratamientos con DMN y 2) en los tratamientos con azida de sodio. La frecuencia de manchas inducidas en larvas de Drosophila melanogaster por DMN y cianato de sodio, sólo y en combinación, se muestra en la tabla II y en la figura 8.

La administración crónica de cianato de sodio en ausencia de DMN, no resultó genotóxica para las larvas en ninguna de las concentraciones probadas. Las frecuencias recobradas en las series tratadas para manchas simples chicas y grandes, manchas gemelas y manchas totales fueron similares a las obtenidas en el testigo negativo (0.25, 0.06, 0.01 y 0.32, respectivamente) (Fig. 8a-8d). En las dos últimas columnas de la tabla II, en las que se estima la frecuencia de clones inducidos por 10^5 células (frecuencia observada y frecuencia corregida -al restar el valor del lote testigo-), no se detectó inducción de clones.

En los tratamientos combinados: La DMN [10 mM] + cianato de

Tabla II. Número y frecuencia de manchas inducidas por DMS (tratamiento agudo) + Cianato de sodio (tratamiento crónico). Exposición: 72 X 6 X 48 hr.

DMS [mM]	CNNaO [ppm]	Núm. de alas	Manchas por ala (Número de manchas) Diagnóstico estadístico*				Núm.de clones m/h	Clase clonal prom.	Frecuencia de formación de clones $\times 10^{-5}$	
			Manchas simples chicas (1-2 cols.) n=2	Manchas simples grandes (> 2 cols.) n=3	Manchas gemelas n=5	Manchas totales n=2			obser- vada	corre- gida
0	0	118	30 (0.25)	7 (0.06)	1 (0.01)	38 (0.32)	38	1.79	1.3	
	10	120	32 (0.27)-	8 (0.07)-	2 (0.02)-	42 (0.35)-	40	1.85	1.4	0.1
	50	120	19 (0.16)-	7 (0.06)-	4 (0.03)-	30 (0.25)-	29	2.38	1.0	-0.3
	100	120	32 (0.27)-	7 (0.06)-	1 (0.01)-	40 (0.33)-	40	2.17	1.4	0.1
10	0	120	158 (1.32)	385 (3.21)	55 (0.45)	598 (4.98)	435	3.30	14.9	
	10	120	180 (1.50)-	412 (3.43)-	157 (1.31)1	749 (6.24)1	622	3.36	21.3	6.4
	50	116	200 (1.72)-	372 (3.21)-	111 (0.96)1	683 (5.89)-	534	3.20	18.9	4.0
	100	120	158 (1.32)-	352 (2.93)-	93 (0.77)1	603 (5.03)-	457	3.20	15.6	0.8
12.5	0	120	146 (1.22)	327 (2.72)	70 (0.58)	543 (4.53)	416	3.34	14.2	
	10	118	147 (1.25)-	341 (2.89)-	94 (0.80)-	582 (4.93)-	435	3.36	15.1	0.9
	50	120	220 (1.83)-	413 (3.44)-	123 (1.02)-	756 (6.30)-	563	3.23	19.2	5.0
	100	118	227 (1.92)-	476 (4.03)-	102 (0.86)-	885 (6.82)-	638	3.29	22.2	6.0

* Análisis estadístico de acuerdo con Frai y Würzler, 1988 (no publicado):+, positivo; -, negativo; 1, inconcluso; con un nivel de probabilidad: alfa = beta = 0.05.

sodio [0, 10, 50 y 100 ppm]; el cianato de sodio no modificó de manera significativa la genotoxicidad inducida por la DMN: las frecuencias de manchas simples chicas y grandes en las combinaciones 10-10, 10-50 y 10-100 fueron similares a la del testigo positivo correspondiente (1.32 y 3.21, respectivamente) (Fig. 8a y b); no así la frecuencia de manchas gemelas, que se incrementó ligeramente y en relación inversa a la concentración de cianato de sodio, aunque el diagnóstico estadístico para el incremento fue indeterminado (Fig. 8c); la frecuencia de manchas totales no fue modificada con ninguna de las concentraciones (Fig. 8d). La frecuencia observada de formación de clones por 10^{-5} se incrementó de manera inversa a la concentración en todas las combinaciones probadas, obteniéndose la mayor inducción en la combinación 10-10 (6.4).

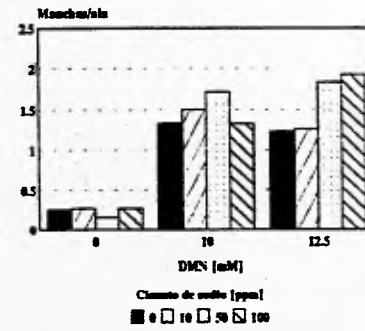
En los tratamientos combinados: DMN 12.5 mM + cianato de sodio [0, 10, 50 ó 100 ppm], la presencia del cianato de sodio incrementó la frecuencia de todos los tipos de manchas conforme se incrementó su concentración, sin embargo, en ningún caso el incremento fue significativo (Tabla II y Figs. 8a-8d). La frecuencia observada de formación de clones $\times 10^{-5}$ se incrementó en relación con la concentración de cianato de sodio, con la mayor inducción de clones en la combinación 12.5-100 (8.0).

En la figura 9 se presentan la frecuencia de manchas totales y la clase clonal promedio obtenidas con los tratamientos combinados: DMN y cianato de sodio. En ausencia de la DMN (Fig. 9a), la frecuencia de manchas por ala no se modifica, sin embargo,

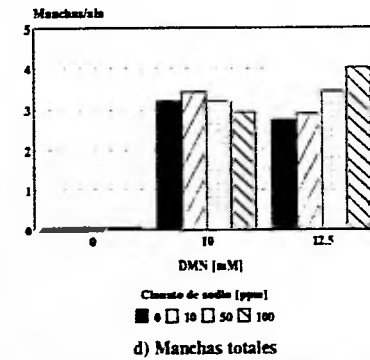
la clase clonal promedio se incrementa a 50 y 100 ppm. En los tratamientos combinados con DMN-cianato (Fig. 9b y c), la administración de cianato de sodio no modificó la clase clonal promedio obtenida con DMN a 10 y 12.5 mM, sin embargo, la frecuencia de manchas por ala fue ligeramente mayor a la del testigo positivo en las combinaciones 10-10 y 10-50, así como en 12.5-50 y 12.5-100. Finalmente, en la figura 10 se compara la distribución de manchas por mosca obtenida para cada una de las combinaciones analizadas. En el testigo negativo [0-0], aproximadamente el 50 % de las moscas no tienen manchas sobre sus alas, una proporción menor de moscas tienen 1 mancha, y aún menos moscas tienen 2 o 3 manchas sobre sus alas. El cianato de sodio sólo incrementó ligeramente el número de manchas por mosca a 50 y 100 ppm, concentraciones en que se encontraron moscas con 4 y 5 manchas (Fig. 10a).

La diferente capacidad metabólica de las moscas utilizadas se hace evidente al ser tratadas con compuestos como la DMN, que requiere ser biotransformada para ser reactiva. La figura 10b muestra que la distribución del número de manchas por ala se modifica drásticamente en las moscas tratadas con DMN, obteniéndose moscas que tienen solamente 1 mancha y otras que presentan hasta 21 manchas en sus alas. Al administrarse las diferentes concentraciones de cianato de sodio se observó mayor heterogeneidad en la distribución de manchas, con un rango de 1 a 28 manchas por mosca en la combinación 10-10; 2 a 19 manchas/mosca en 10-50; y 1 a 26 en 10-100. Al aumentar la concentración de DMN a 12.5 mM el

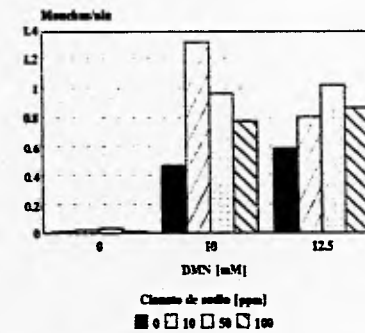
a) Manchas simples chicas



b) Manchas simples grandes



c) Manchas gemelas



d) Manchas totales

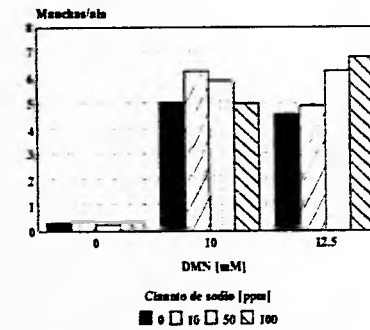
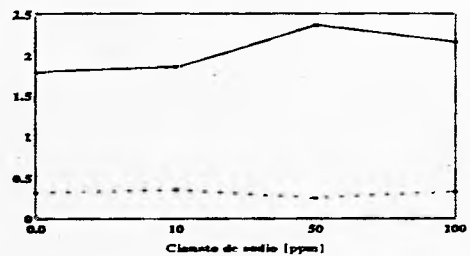
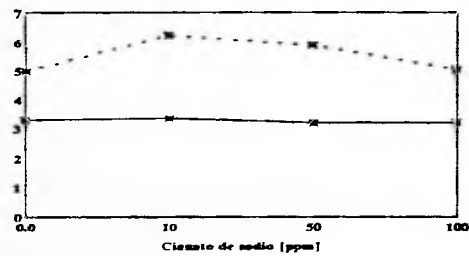


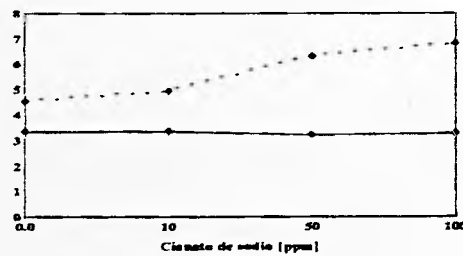
Fig. 8 Frecuencia por tipo de mancha inducida por DMN - Cianato de sodio en larvas de tercer estadio.



a) DMN 0 mM
Frecuencia de manchas/ala—
Clase clonal promedio—

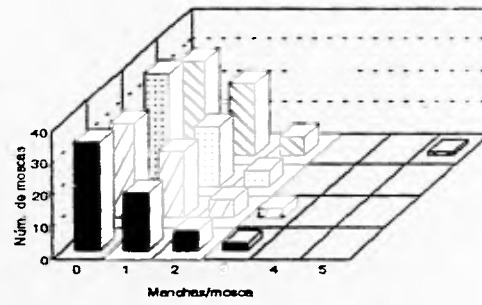


b) DMN 10 mM
Frecuencia de manchas/ala—
Clase clonal promedio—

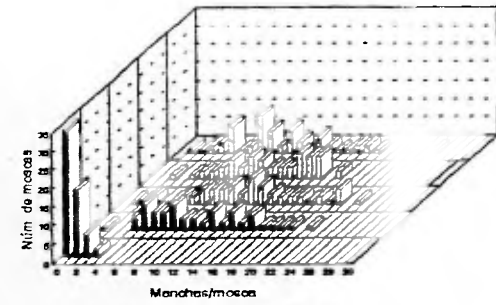


c) DMN 12.5 mM
Frecuencia de manchas/ala—
Clase clonal promedio—

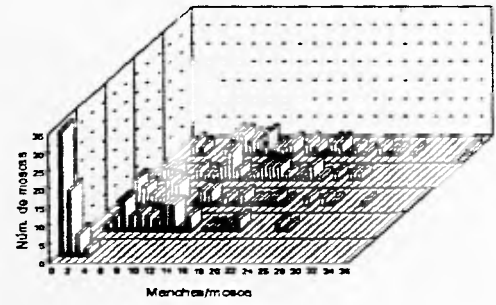
Fig.9 Frecuencia de manchas por ala clase clonal promedio obtenida en los tratamientos con DMN + Cianato de sodio.



a) DMN [mM] - CNNaO [ppm]
 ■ 0-0 □ 0-10 □ 0-50 □ 0-100



b) DMN [mM] - CNNaO [ppm]
 ■ 0-0 □ 10-0 □ 10-10 □ 10-50 □ 10-100



DMN [mM] - CNNaO [ppm]
 ■ 0-0 □ 125-0 □ 125-10 □ 125-50 □ 125-100

Fig. 10 Distribución del número de manchas por mosca obtenido en los tratamientos combinados: DMN [mM] - CNNaO [ppm].

rango de manchas/mosca fue de 2 a 23, y en las diferentes combinaciones fue 0 a 30, 0 a 25 y 2 a 36 manchas por mosca en las combinaciones 12.5-10, 12.5-50 y 12.5-100, respectivamente (Fig. 10c).

En la tabla III se muestran los resultados obtenidos en los tratamientos con cianato de sodio, sólo y en combinación con azida de sodio.

La respuesta obtenida en el tratamiento de cianato de sodio fue similar a la de la serie anterior, sin embargo, se incremento la frecuencia de manchas simples grandes con 0-50 y 0-100 mM de cianato de sodio, sin embargo sólo en la primera combinación la diferencia fue significativa ($P < 0.05$). Las diferentes combinaciones de azida de sodio-con cianato de sodio no indujeron incrementos en la frecuencia de los distintos tipos de manchas, pero sí resultaron tóxicas para las larvas ya que conforme se incrementó la concentración de la azida de sodio, la cantidad de larvas recobradas fue cada vez menor, de manera que en la concentración 12.5 mM de azida de sodio no se dispuso de moscas tratadas en cantidad suficiente para hacer algún análisis, razón por la que no se muestran resultados para esta combinación. En la figura 11a-d se muestra la frecuencia de todos los tipos de manchas obtenidas en esta parte de los experimentos, aunque se observan variaciones en el número de manchas, es importante aclarar que en ninguna de las concentraciones las diferencias fueron significativas. En la figura 12 se comparan la frecuencia de manchas y la clase clonal promedio de las tres combinaciones de azida-cianato de sodio. En esta serie

Tabla III. Número y frecuencia de manchas inducidas por NaN_3 (tratamiento agudo) + Cianato de sodio (tratamiento crónico). Exposición: 72 X 6 X 48 hr.

NaN_3 [mM]	CNO ₂ O [ppm]	Núm. de alas	Manchas por ala (Número de manchas) Diagnóstico estadístico*				Núm.de clones swn	Clase clonal prom.	Frecuencia de formación de clones X 10 ⁻⁵	
			Manchas simples chicas (1-2 cele.) n=2	Manchas simples grandes (> 2 cele.) n=5	Manchas gemelas n=5	Manchas totales n=2			obser- vada	corre- gida
0	0	80	26 (0.32)	1 (0.01)	1 (0.01)	28 (0.35)	28	1.50	1.4	
	10	80	26 (0.32)-	3 (0.04)1	0 (0.00)1	29 (0.36)-	29	1.55	1.5	0.1
	50	80	19 (0.24)-	7 (0.09)+	4 (0.05)1	30 (0.37)-	29	2.31	1.5	0.1
	100	80	20 (0.25)-	6 (0.08)1	1 (0.01)1	27 (0.34)-	27	2.52	1.4	-0.1
2.5	0	80	23 (0.29)	8 (0.10)	2 (0.03)	33 (0.41)	33	2.03	1.7	
	10	80	22 (0.28)-	2 (0.03)-	0 (0.00)-	24 (0.30)-	24	1.83	1.2	-0.5
	50	80	14 (0.17)-	3 (0.04)-	0 (0.00)-	17 (0.21)-	17	1.76	0.9	-0.8
	100	80	25 (0.31)-	4 (0.05)-	1 (0.01)-	30 (0.37)-	30	1.73	1.5	-0.2
7.5	0	80	23 (0.29)	4 (0.05)	2 (0.03)	29 (0.36)	29	1.97	1.5	
	10	80	17 (0.21)-	4 (0.05)-	2 (0.03)-	23 (0.29)-	23	2.35	1.2	-0.3
	50	80	16 (0.20)-	5 (0.06)-	1 (0.01)-	22 (0.28)-	22	2.45	1.1	-0.4
	100	80	11 (0.14)-	1 (0.01)-	1 (0.01)-	13 (0.16)-	13	1.77	0.7	-0.8

* Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würzler no publicado (1988). +, positivo; -, negativo; i, inconcluso; con un nivel de probabilidad: alfa = beta = 0.05.

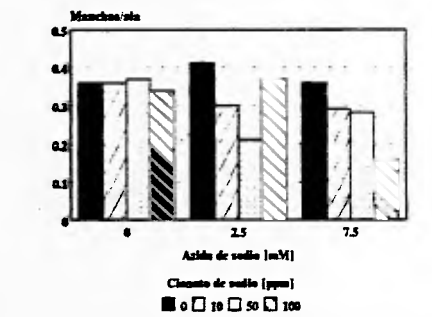
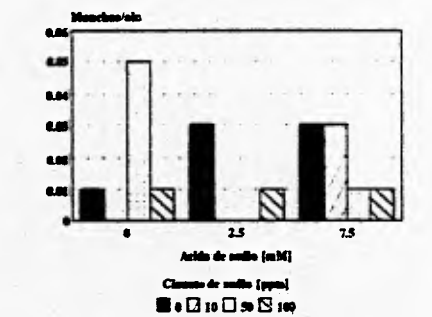
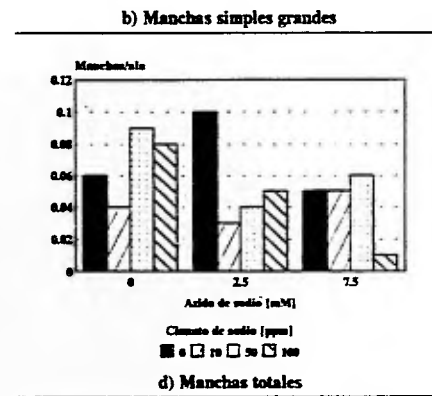
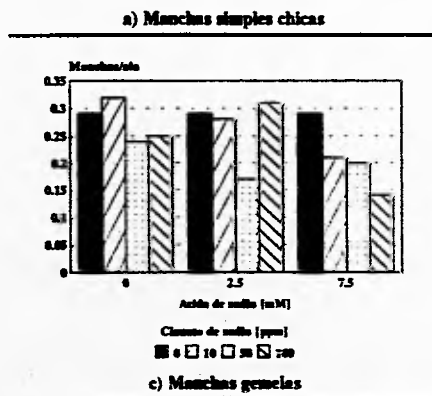
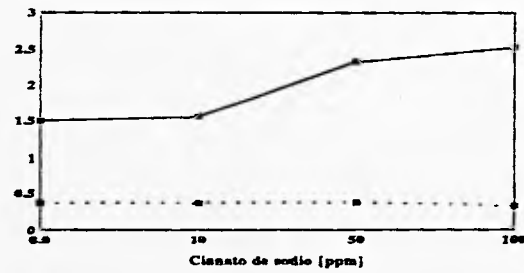
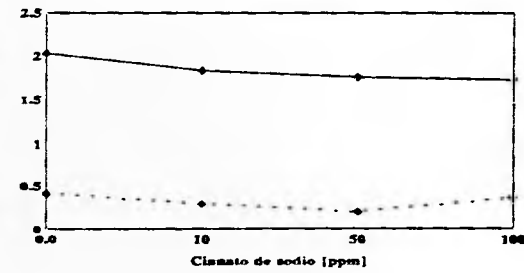


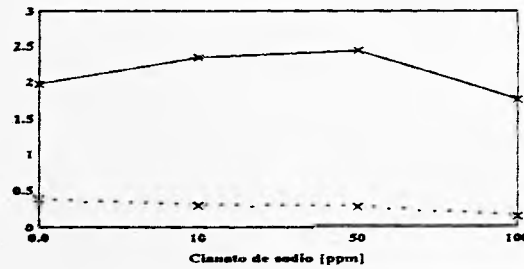
Fig. 11 Frecuencia por tipo de mancha inducida por azida de sodio- cianato de sodio en larvas de tercer estadio.



a) NaN₃ 0 mM
Frecuencia de manchas/ala—
Clase clonal promedio—

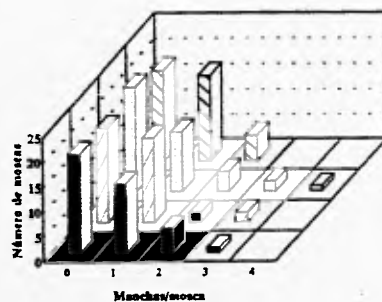


b) NaN₃ 2.5 mM
Frecuencia de manchas/ala—
Clase clonal promedio—

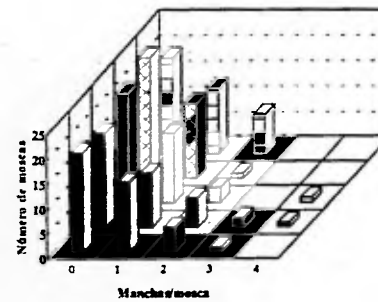


c) NaN₃ 7.5 mM
Frecuencia de manchas/ala—
Clase clonal promedio—

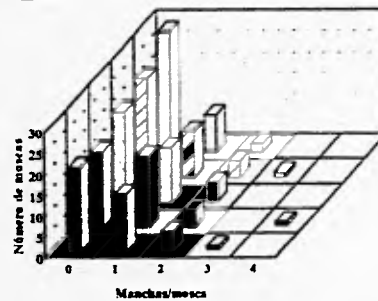
Fig.12 Frecuencia de manchas por ala y clase clonal promedio obtenida en los tratamientos con NaN₃ + Cianato de sodio.



a) NaCN [mM] - CNNaO [ppm]
 ■ 0-0 □ 0-10 □ 0-50 □ 0-100



b) NaCN [mM] - CNNaO [ppm]
 ■ 0-0 ■ 2.5-0 □ 2.5-10 □ 2.5-50 □ 2.5-100



c) NaCN [mM] - CNNaO [ppm]
 ■ 0-0 ■ 7.5-0 □ 7.5-10 □ 7.5-50 □ 7.5-100

Fig.13 Distribución del número de manchas por mosca obtenido en los tratamientos combinados NaCN [mM]- Cianato de sodio [ppm].

de experimentos se observó un ligero aumento en la clase clonal promedio en 0-50 y 0-100 mM de cianato de sodio, sin modificación en la frecuencia de manchas totales; la presencia del cianato de sodio disminuyó ligeramente ($p>0.05$) la frecuencia de manchas totales por ala (Fig. 12b y 12c); por su parte, la clase clonal promedio tendió a disminuir en las combinaciones con 2.5 mM de azida de sodio, pero aumentó en los tratamientos combinados 7.5-10 y 7.5-50. Finalmente, la figura 13 muestra la distribución de manchas por mosca obtenida en los tratamientos combinados anteriores. En todos los casos, la distribución resultó similar a la de su lote testigo correspondiente.

DISCUSION

La investigación enfocada a combatir o prevenir el cáncer ha explorado diversas alternativas, intentando encontrar compuestos menos tóxicos y mas efectivos que contribuyan a alcanzar este objetivo. Así, históricamente se han utilizado compuestos con actividad anticancerígena que se asocian con mecanismos de acción variados. Los hay alquilantes, como la mitomicina-C; antimetabolitos, como las aminopterinas; hormonas, como propionato de testosterona; enzimas, como L-asparaginasa; antibióticos, como la bleomicina; y productos extraídos de las plantas, como vinblastina y vincristina (Stock, 1970; Hellman, 1972; Carter y Livingston, 1976; Pratt y Ruddon, 1979; Adler, 1981).

En ocasiones se recurre al uso de sustancias a las que se les ha encontrado un efecto particular, aunque se desconozca en general, su forma de acción. Tal es el caso del cianato de sodio, un antineoplásico utilizado en el tratamiento de hepatomas, mielomas y leucemia, del cual se ignora el mecanismo relacionado con su efecto antineoplásico.

En forma paralela a la búsqueda de alternativas útiles en la terapia del cáncer se han desarrollado modelos biológicos que aceleren el análisis de antineoplásicos potenciales, proporcionando información sobre estos compuestos con una inversión de tiempo y costo menores a los requeridos en sistemas de mamíferos. Además de los requisitos anteriores, un modelo debe reproducir los eventos biológicos relacionados con el desarrollo de procesos malignos.

La iniciación de procesos cancerosos se asocia con cambios en la información genética de las células afectadas, de manera que aproximadamente el 80 % de los compuestos carcinogénicos son además, mutágenos activos (Cairns., 1981). Otro de los eventos relacionados con la carcinogénesis es la capacidad de los compuestos químicos para inducir recombinación.

La prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) que utiliza células de las alas de Drosophila fue propuesta originalmente como una alternativa para estudiar la actividad genotóxica de los diversos compuestos sobre células somáticas (Graf et al., 1984). A medida que se ha acumulado información relacionada con la sensibilidad y reproducibilidad de este sistema de prueba, se ha aceptado con esta metodología se puede determinar de manera

preliminar la genotoxicidad de sustancias pertenecientes a grupos diversos de compuestos químicos.

El cianato de sodio fue probado en dos ocasiones mediante la prueba SMART, en ambos casos la respuesta obtenida para este compuesto indicó que no resulta genotóxico para Drosophila, no obstante que en la segunda serie de experimentos se incrementó la frecuencia de manchas grandes a 50 y 100 ppm, siendo el incremento significativo sólo en el primer caso (aunque en el límite de decisión) e inconcluyente en el segundo. Es importante mencionar que en los experimentos realizados en combinación con azida de sodio el tamaño de muestra fue de 80 alas (Tabla III) y no de 120 como en los experimentos realizados con la DMN (Tabla II), la diferencia en el tamaño de muestra utilizado se debió a que en los experimentos con azida de sodio no se recobraron suficientes organismos, probablemente debido a la toxicidad de este compuesto. Por otro lado, se ha determinado que el tamaño de muestra óptimo para tomar decisiones estadísticas en la prueba SMART es de 55 moscas (110 alas) (Frei y Würgler, 1995), de manera que no se descarta la posibilidad de que al aumentar el tamaño a 120 alas el resultado pudiera modificarse, esto basado en que Jiménez et al. (1995) estudiando la interacción entre la exposición a sulfato de níquel y cianato de sodio, trataron larvas de Drosophila en las mismas condiciones que las referidas para este trabajo pero utilizando 10, 100 y 1000 ppm de cianato de sodio y no encontraron incremento en la frecuencia de ningún tipo de manchas ($P > 0.05$).

En los experimentos combinados DMN-cianato de sodio no se

registraron incrementos significativos en la frecuencia de los diferentes tipos de manchas, sin embargo las manchas gemelas (surgen por recombinación) y las manchas totales fueron más frecuentes en relación inversa a las concentraciones probadas, en las combinaciones con cianato que en tratamiento con la DMN a 10 mM. Al incrementar la concentración de DMN a 12.5, nuevamente la frecuencia de todos los tipos de manchas fue mayor en las moscas tratadas con DMN-Cianato, pero ahora el incremento fue, en general, dependiente de la concentración (excepto en la combinación 12.5-100). Allfrey et al (1977) probaron que el cianato de sodio requiere ser biotransformado para ser reactivo (acción indirecta) aunque se ha determinado que la activación de este compuesto ocurre específicamente en células dañadas, se desconoce la forma en que dicha activación se lleva al cabo, aunque se ha asumido que podría estar relacionada con la actividad diferencial de las células tumorales, particularmente en relación con los niveles de proteínas que son sintetizados (Cerami et al. 1973; Kohzuki y Enoki., 1993). Debido a que la actividad de la DMN también es dependiente del metabolismo, es posible que el efecto observado en los tratamientos combinados DMN-cianato de sodio se deba al efecto aditivo de los dos compuestos sobre el metabolismo, si bien se requiere de más evidencia experimental que determine si en el caso de Drosophila esta activación se produce de manera específica en células alteradas.

Rivera et al. en 1991 reportaron que la administración crónica de cianato de sodio puede traer consigo efectos tóxicos. En el caso

de Drosophila este compuesto no ha mostrado inducir toxicidad aún a 1000 ppm (Jiménez et al., 1995), sin embargo es posible que en combinación con otros compuestos sí resulte tóxica. En el caso de DMN no se observó mortalidad aparente en las larvas tratadas, no así en el caso de los tratamientos combinados con azida de sodio en los que la toxicidad se hizo evidente en todas las combinaciones, incrementándose ésta en relación con la concentración de ambos compuestos, razón por la que no se recobraron moscas en cantidad suficiente para realizar algún análisis de genotoxicidad en la combinación 12.5-100.

La azida de sodio, un veneno de la cadena respiratoria, potente inductor de estrés químico y atrapador de oxígeno exitado (oxígeno singulete, 1O_2), ha probado ser un mutágeno recombinogénico en Drosophila a concentraciones tan bajas como 0.25 mM, con un efecto localizado en la inducción de manchas grandes, cuando se alimenta crónicamente (durante 48 h) a larvas de tercer estadio (González y Ramos, 1996). En tratamientos agudos (6 h) incrementa la frecuencia de manchas simples chicas a 9.8 mM y la de manchas grandes a 14.7 mM, no tiene efecto sobre las manchas gemelas (Delgado, 1990).

En este trabajo se decidió probar el efecto combinado de azida de sodio y cianato de sodio debido a la afinidad por el oxígeno de ambos compuestos. Los resultados obtenidos muestran que la presencia del cianato de sodio no sólo no incrementó la genotoxicidad de azida, sino que disminuyó la frecuencia de manchas recobradas (Fig. 11). La reducción en la frecuencia de manchas en

tratamientos combinados usando la prueba SMART se ha interpretado como un posible efecto antimutagénico, sin embargo, en este caso, no puede explicarse como un efecto protector sino probablemente sea debida a la incapacidad de las células para reparar el daño inducido por la azida de sodio, esto se comprobó con la escasa viabilidad de las larvas tratadas conforme se incrementó la intensidad de los tratamientos. A partir de estos resultados se sugiere que la toxicidad, mas no la genotoxicidad de azida de sodio se incrementa en presencia de cianato de sodio. Lo anterior sugiere dos posibilidades: 1) en la genotoxicidad de la azida de sodio estan implicados otros factores además de su afinidad por oxígeno ya que la demanda de éste en las larvas tratadas con la azida y el cianato de sodio no se expresó en mayor daño en las células de las alas, 2) que en el efecto recombinogénico inducido por la azida de sodio el tiempo puede ser un factor importante para que el daño se exprese, lo que no excluye que la demanda de oxígeno sea el factor primario en la inducción de daño. Ambas posibilidades requieren ser investigadas.

En las moscas adultas, las manchas constituyen la expresión fenotípica de alteraciones genotípicas en las células precursoras de las alas (células del disco imagal del ala); se ha determinado que para alcanzar el número de células que forman cada ala se requiere el concurso de 15.6 divisiones celulares, asumiendo que la duración del ciclo celular de las células precursoras es de 8 h (García-Bellido y Merriam, 1971; Szabad et al., 1983). Así, una célula precursora (sólo se ejemplifica con 1 célula) que inicia la

serie de divisiones mitóticas para la formación del ala se encontraría en 2^0 ciclos = 1 célula; después de la primera división se tendrían 2^1 ciclos = 2 células; en la siguiente división, 2^2 ciclos = 4 células, y así sucesivamente, de manera que se puede estimar cuántos ciclos de división pasaron desde que se originó el cambio en la información genética de la célula precursora, ya que esto determinará el tamaño de la mancha en la mosca adulta, este valor recibe el nombre de clase clonal promedio (Tabla IV).

No obstante lo anterior, en la mosca adulta el tamaño de la mancha no siempre corresponde con el valor que puede esperarse con base en la edad de la larva al momento del tratamiento y con el tipo de acción de un agente mutagénico (mutágeno o promutágeno), de manera que variaciones en la clase clonal promedio pueden indicar interferencia en la proliferación de las células precursoras.

Cuando en las series tratadas se obtienen valores menores a los del testigo correspondiente es posible que el efecto del tratamiento provoque atraso o impida la proliferación; por otra parte, valores mayores podrían resultar por ejemplo, de la inducción de más ciclos de división (compuestos mitogénicos). El análisis de la clase clonal promedio debe realizarse en combinación con otros parámetros, como la frecuencia de manchas totales y la frecuencia de inducción $\times 10^{-5}$ células.

La frecuencia de inducción $\times 10^{-5}$ células, estima cuántos clones nuevos se inducen con base en un número de células constante. En la frecuencia de inducción corregida $\times 10^{-5}$ se restan los clones del lote testigo, de manera que el resultado es

Tabla IV . Número de células por clon y número de ciclos celulares
precursores de un ala de Drosophila melanogaster.

No. de Ciclos Celulares	No. de Células por clon
2^0	1
2^1	2
2^2	4
2^3	8
2^4	16
2^5	32
2^6	164
2^7	128
2^8	256
2^9	512
2^{10}	1024
2^{11}	2048
2^{12}	4096
2^{13}	8192
2^{14}	16384
2^{15}	32768
2^{16}	65536

indicativo de los clones producidos sólo por el tratamiento.

En las dos series de experimentos, cianato de sodio incrementó la clase clonal promedio en 50 y 100 ppm, sin incrementar la frecuencia de manchas, ésto implica que sin que se produzcan nuevos clones, el tamaño de éstos tiende a ser mayor. La frecuencia de inducción por 10^{-5} indica que el cianato de sodio no induce la formación de clones extras a los que surgen de manera espontánea. La ocurrencia de divisiones celulares extras, han sido reportadas para células en cultivo (Murray y Hunt, 1993) y mediante el uso de líneas mutantes en Drosophila (Lawrence, 1992) cuando, por muerte de células afectadas o ciclos de división de mayor duración, las células vecinas tienen 1 a 2 divisiones celulares extras (Szabad, 1983). Otra posibilidad implicaría el tiempo utilizado en la reparación del daño inducido, es decir, que la reparación se realizara en menor tiempo, lo que evitaría el retraso en la entrada a la siguiente mitosis, de esta manera las células que forman parte de una clona mutante no se retrasarían de manera importante en relación con las células vecinas no afectadas. Así, el cianato de sodio parece tener un efecto mitogénico a partir de 50 ppm, sin embargo en los tratamientos combinados no se encontraron evidencias de inducción mitogénica, ya que aunque en la serie de experimentos con la azida de sodio a 7.5 mM se incrementó la clase clonal promedio con 10 y 50 ppm de cianato, este incremento estuvo acompañado con disminución en la frecuencia de manchas por lo que otros factores como la pérdida de algunas clonas afectadas, debido a la toxicidad alcanzada en estos tratamientos podría estar

produciendo un falso efecto mitogénico, se recomienda estudiar este aspecto con una o varias metodologías diseñadas para determinar este tipo de efecto.

Los organismos utilizados en mutagénesis, al igual que en áreas experimentales similares, deben reunir una serie de atributos que les definen como pertenecientes a la población de interés. Sin embargo, desde los primeros resultados obtenidos en los estudios de toxicología genética ha sido evidente la diferente capacidad de respuesta de organismos pertenecientes a la misma especie y aún aquellos del mismo sexo, edad y dote genética similar. Esta variabilidad inherente a las poblaciones biológicas constituye un atributo adicional de las mismas y podría relacionarse parcialmente con la capacidad que tiene cada organismo para biotransformar xenobióticos. La heterogeneidad en la detección de un xenobiótico está en relación directa con los requerimientos de activación metabólica por parte del organismo, por lo que ante la presencia de un promutágeno como la DMN, compuesto que requiere ser biotransformado para ser reactivo (Nouso et al., 1992) una proporción de los organismos mostrarán indicios del efecto inducido aún a bajas concentraciones, mientras que otros requieren de cantidades considerables para mostrar daño alguno; teóricamente, la distribución de los niveles de detección que se obtendría involucrando grandes cantidades de organismos adquirirá la forma de una distribución normal, con la mayor proporción de los organismos respondiendo a valores intermedios.

En la prueba SMART, cada mancha sobre las alas indica la

inducción de una alteración, de manera normal, la mayoría de las moscas no presentarán manchas mutantes, sin embargo, algunas mostrarán 1 o varios eventos que se han producido sin que las moscas hayan sido expuestas. La distribución del número de manchas por mosca sigue una distribución de tipo Poisson. Se ha observado que en las moscas tratadas esta distribución se modifica y principalmente ante la exposición a promutágenos la dispersión de la distribución se incrementa notablemente, lo que probablemente es una manifestación de los diferentes niveles de respuesta que pueden existir en esa población (Muñoz y Ramos, 1995).

En los tratamientos combinados, el cianato de sodio incrementó la dispersión de la distribución de manchas por mosca producida por las dos concentraciones de DMN utilizadas, probablemente lo anterior puede deberse a que el cianato de sodio también es biotransformado (Cerami et al., 1973) por lo que su presencia induciría la producción de enzimas involucradas en la desintoxicación, las cuales al sumarse a las inducidas por la DMN podrían facilitar la conversión de este último a su forma reactiva, de manera que habría mayor cantidad de compuesto reactivo disponible lo que incrementaría el número de manchas totales en los tratamientos combinados.

En cambio, en combinación con azida de sodio, compuesto que también requiere ser biotransformado (Kleinhofs et al., 1975) el cianato de sodio no mostró efectos aparentes sobre la distribución del número de manchas por mosca. Al respecto, hay que considerar que los dos compuestos referidos presentan afinidad por oxígeno

(Cerami et al., 1973; Kohzuki y Enoki., 1993) y son inductores enzimáticos probados (Conger y Carabia, 1977; La Velle y Mangold, 1987) y a la vez, inhibidores de síntesis de proteínas (Shenouda y Hutchinson., 1993), por lo que el efecto sobre las larvas expuestas pudo haberse expresado como interferencia en la reparación del daño inducido por la azida de sodio lo que podría llevar a la no viabilidad de las células afectadas. En la figura 13b y 13c se muestra que a medida que aumenta la concentración de cianato en presencia de azida, la dispersión de la distribución del número de manchas por mosca se reduce, siendo inclusive menor que la del testigo negativo, en consecuencia, el número de moscas que no presentan manchas se incrementa lo que podría indicar que en estas moscas las células afectadas al no poder reparar el posible daño inducido no proliferan o mueren y por esa razón no se recobran.

La prueba SMART es una alternativa valiosa para estudios de mutagénesis en células somáticas porque proporciona información sobre distintos eventos genéticos, sin embargo, en el análisis de los efectos recobrados es importante que se consideren diversos aspectos para obtener información consistente con todos ellos. Es necesario continuar utilizando los protocolos combinados para determinar si este sistema logra distinguir entre la genotoxicidad particular de los compuestos utilizados, así como la producida por la interacción entre éstos. El análisis de la susceptibilidad individual vista a través del número de manchas por mosca requiere ser validada utilizando compuestos con diferentes mecanismos de acción para comprender la utilidad de su aplicación en el estudio

del impacto de xenobióticos en las poblaciones analizadas.

CONCLUSIONES

1. El cianato de sodio administrado crónicamente por alimentación no induce mutación y recombinación somáticas en larvas de Drosophila melanogaster.
2. En apariencia, el cianato de sodio es un compuesto mitogénico en concentraciones superiores a 50 ppm.
3. El cianato de sodio potencia la genotoxicidad de la DMN en tratamientos combinados.
4. El cianato de sodio incrementa la proporción de moscas con manchas sobre sus alas producida por DMN.
5. La interferencia negativa del cianato de sodio con la genotoxicidad de azida de sodio, podría estar asociada con la toxicidad alcanzada en los tratamientos combinados con estos compuestos.
6. La SMART es una metodología sensible y versátil para estudiar el efecto combinado de compuestos de interés.

REFERENCIAS

ADLER, I. D. 1981. Comparative mutagenicity of mitomycin C. En: Comparative chemical mutagenesis (F. J. De Serres y M. D. Shelby, eds.) Plenum Press. Nueva York, pp. 993-1014.

ALLFREY, V. G., L. C. Boffa y G. Vidali. 1977. Selective inhibition with sodium cyanate of protein synthesis in colon cancer cells. *Cancer*. 40: 2692- 2698.

AMES, B., W. Durston., E. Yamasaki y F. Lee. 1973. Carcinogens are mutagens; A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70(80): 2281-2285.

BEYER, H. 1987. Manual de química orgánica. Ed. Reverté. España, 287-289 pp.

BRUMER, C., y H. M. Rabes. 1992. Morphology and proliferation kinetics of early tumor stages induced by dimethylnitrosamine in rat kidneys. *Virchows-Arch-B-Cell-Pathol*. 62(3): 133-142.

BRUSICK, D. 1987. Principles of Genetic Toxicology, 2a. ed; Plenum Press, Londres, pp. 69-129.

CAIRNS, J. 1981. The origin of human cancers. *Nature*, 289: 353-357.

CARTER, S. K. y R. B. Livingston. 1976. Plant products in cancer chemotherapy. *Cancer Treat. Rep*. 60: 1141-1156.

CERAMI, A., y J. M. Manning. 1973. Potassium cyanate as an inhibitor of the sickling of erythrocytes in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 68: 1180-1183.

CERAMI, A., T. A. Allen., y J. H. Graziano. 1973. Pharmacology of cyanate. I. General Effects on experimental animals. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 185(3): 653-666.

CLAYSON, D. 1980. Comparison between in vitro and in vivo test for carcinogenicity. Mutation Res; 75: 205-213.

CONGER, B.V., y J.V. Carabia. 1977. Mutagenic and efficiency of sodium azide versus ethyl methane sulfonate in maize: induction of somatic mutations at the yg2 locus by treatment of seeds differing in metabolic state and cell population. Mutation Res. 46: 285-296.

DE FLORA, S. y C. Ramel. 1988. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview. Mutation Res. 202: 285-306.

DELGADO, R. A. 1990. Daño inducido por mutágenos positivos en células de ala de Drosophila melanogaster. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 75 pp.

DEMEREK, M. 1965. Biology of Drosophila. Hafner Publishing Co. Nueva York, 633 pp.

DE SERRES, F. J. 1979. Evaluation of test for mutagenicity as indicator of environmental mutagens and carcinogens. Ann. N.Y. Acad. Sci. 84: 75-84.

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.

FREI, H. y F. E. Würzler. 1995. Optimal experimental design

and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in Drosophila. Mutation Res. 334: 247-258.

GARCIA-Bellido, A. y J. R. Merriam. 1971. Parameters of the wing imagal disc development of Drosophila melanogaster. Dev. Bio. 24: 61-87.

GARCIA-Bellido, A. y J. Dapena. 1974. Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in Drosophila melanogaster, Molecular Genetics. 128: 117-130.

GICHNER, T., J. Veleminsky., E. D. Wagner., y M. J. Plewa. 1993. Inhibitory effects of acetaminophen, 7,8-benzoflavone and methimazole towards N-nitrosodimethylamine mutagenesis in Arabidopsis thaliana. Mutation Res. 300(1): 57-61.

GONZALEZ, C. E. 1994. Efecto del metabolismo en la respuesta genotóxica de azida de sodio en células del ala de Drosophila melanogaster. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 69 pp.

GONZALEZ, C. E. y P. M. Ramos. 1996. Sodium azide induced mitotic recombination in Drosophila melanogaster. Mutation Res. (en prensa).

GORDON, S. M., J. Drachman., L. A. Bland., M. H. Reid., M. Favero., y W. R. Jarvis. 1990. Epidemic hypotension in a dialysis center caused by sodium azide. Kidney International. 37: 110-115.

GRAF, U. y F. E. Würzler. 1988. The sex-linked recessive lethal assay and recombination test in Drosophila melanogaster. En: Evaluation of short term test for carcinogens (J. Ashby et al.

Eds.). Cambridge UK-WHO/Cambridge University Press. 2: 301-309.

GRAF, U., F. Würgler., A. Katz., H. Frei., H. Juan., C. Hall y P. Kale. 1984. Somatic mutation and recombination test in Drosophila melanogaster, Environ. Mutagen; 6: 153-188.

HELLMAN, K. 1972. Anticancer drugs, Chem. Brit. 8: 69-72.

INDEX MERCK. 1989. Encyclopedia of chemical and drugs. Published by Merck and Co. 1606 pp.

JEONG, T. C., y K. H. Yang. 1992. Importance of hepatocyte culture conditions in dimethyl nitrosamine induced suppression of antibody response in the mixed cultures of murine hepatocytes and splenocytes. Toxicology. 72(3): 315-327.

JIMENEZ, M. I., P. G. S. Orozco., y P. M. Ramos., 1995. Efecto del cianato de sodio (CNNaO) sobre la genotoxicidad del sulfato de níquel (NiSO₄) en la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en alas de Drosophila melanogaster. Memorias del VI Congreso Nacional de Genética, Xalapa, Ver. México. pp. 106-107.

KADA, T., y T. Inoue. 1978. Antimutagenic actions of vegetable factors on mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. Mutation Res. 53: 351-353.

KAMRA, O. P., y B. Gollapudi. 1979. Mutagenic effects of sodium azide in Drosophila melanogaster. Mutation Res. 66: 381-384.

KLEINHOF, A., M. Kleinschmidt., D. Sciak., S. von Broembsen. 1975. Azide mutagenesis. Mutation Res. 41: 233-240.

KLEINHOF, A., W. M. Owais., y R. A. Nilan. 1978. Azide. Mutation Res. 55: 165-195.

KOHZUKI, H., y Y. Enoki. 1993. High blood O₂ affinity and

relationship of O₂ uptake and delivery in resting muscle. *Respir. Physiol.* 92(2): 197-208.

KOUSSOULAKOS, S. 1992. Evidence that chemical carcinogens interfere with specific regenerations-controlling mechanisms of urodeles. *Tumor Biol.* 13(4):189-194.

LAVAL, J., S. Boiteux y T. R. O'Connor. 1990. Physiological properties and repair of apurinic-apyrimidic sites and imidazolering opened guanine in DNA. *Mutation Res.* 233: 73-79.

LA VELLE, J. M., y J. B. Mangold. 1987. Structure-activity relationships of the azide metabolite, azidoalanine, in Salmonella typhimurium. *Mutation Res.* 177:27-40.

LAWRENCE, P. A. 1992. The making of a fly: The genetics of animal design. Blackwell Scientific Publications. Londres. pp. 78-106.

LINDSLEY, D. L., y G. G. Zimm. 1992. The genome of Drosophila melanogaster. Academic Press, San Diego California. pp. 1-491.

LOPRIENO, N. 1980. General principles of genetic toxicology and methods for mutagenesis assessment. En: The principles and methods in modern toxicology. (C.L. Galli; S.D. Murphy y R. Paoletti, Eds.), Elsevier, Holanda.

MARGISON, G. P. y P. J. O'Connor. 1979. Nucleic acid modification by N-Nitroso compounds, En: Chemical carcinogens and DNA (P. L. Grover, Ed) CRC Press, Boca raton (Florida), Vol. I, 111-160.

MIRSALIS, J. C., G. S. Provost., C. D. Matthews., R. T. Hamner., J. E. Schindler., K. G. O'Loughlin., J. T. Mac Gregor., y

J. M. Short. 1993. Induction of hepatic mutations in lacI transgenic. *Mutagenesis* 8(3): 265-271.

MOUTSCHEN, J. 1985. Introduction to genetic toxicology. John Wiley and Sons. Nueva York. 184 pp.

MUÑOZ, M. J. A. 1994. Caracterización del potencial genotóxico y protector de Ipomoea orizabensis en células somáticas de Drosophila melanogaster. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 65 pp.

MUÑOZ, M. J. A. y P. M. Ramos. 1995. Estudio comparativo del potencial protector de tres resinas del género Ipomoea en la prueba de mutación y recombinación somáticas de Drosophila melanogaster. Memorias del VI Congreso Nacional de Genética, Xalapa, Ver. México. pp. 141-142.

MURRAY A. y T. HUNT. 1993. The cell cycle. Oxford, New York, pp. 153-166.

NILAN, R. A., E. G. Siders., A. Kleinhofs., C. Sander., C. F. Konzak. 1973. Azide a potent mutagen. *Mutation Res.* 17: 142-144.

NÖTHIGER, J. 1970. Sucrose density separation: a method for collecting large numbers of Drosophila larvae, *Dros. Inf. Ser.* 45:177.

NOUSO, K., S. S. Thorgeirsson., y N. Battula. 1992. Stable expression of human cytochrome P450IIE1 in mammalian cells: metabolic and formation of adducts with cellular DNA. *Cancer Res.* 52(7): 1796-800.

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 (Ed). Sister chromatid exchange test. Thieme stratton Inc. Nueva York. pp. 1-5.

ORDAZ, T. M. G. 1991. Valoración de la prueba para detección de mutación y recombinación somática (SMART) en células del ojo de Drosophila melanogaster. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 96 pp.

OWAIS, W. M., A. Kleinhofs., R. C. Ronald., R. A. Nilan. 1981 b. Isolation of an azide mutagenic metabolite in Salmonella typhimurium. Mutation Res. 91: 155-161.

POMERAI, D. D. 1990. From gene to animal: An introduction to the molecular development. Cambridge University Press. 2 ed. Nueva York. 417 pp.

PRATT, W. y M. Ruddon. 1979. The anticancer drugs. Nueva York Oxford University Press. Nueva York. 323 pp.

RADMAN, M. y A. Kinsella. 1980. Chromosomal events in carcinogenic initiation and promotion: Implications for carcinogenicity testing and cancer prevention strategies. En R. Montesano, H. Bartsch, L. Tomatis (Eds.): Molecular and Cellular Aspects for Carcinogen; Lyon, pp. 75-90.

RAMOS, M. P., M. H. M. Abundis., O. J. C. Gaytan., T. M. G. Ordaz., S. P. G. Orozco., L. J. Maldonado., A. J. Hernández., C. E. González., M. P. Reyes., M. E. M. Galicia y M. A. Muñoz. 1993. Manual de laboratorio de genética para Drosophila melanogaster. Mc Graw-Hill. México. 131 pp.

RIVERA, M., O. D. Borkowski., V. F. Leon., M. Vargas., C. Monge. 1991. Metabolic effects of cyanate on mice at sea level and

chronic hypobaric hypoxia. *Life Sci.* 49(6):439-445.

ROBERTS, D. B. 1986. Drosophila a practical approach. IRL Press. Oxford. England. 295 pp.

RUSSELL, P. J. 1992. Genetics. Harper Collins Publishers. New York. pp. 543-551.

SHENOUDA, G., y M. Hutchinson. 1993. Alteration of the systemic antitumor activity of melphalan by sodium cyanate in MOPC-460D myeloma bearing BALB/c mice. *J. Surg. Oncol.* 32(2): 110-114.

SLAMENNOVA, D., y A. Gabelova. 1980. The effects of sodium azide on mammalian cells cultivated in vitro. *Mutation Res.* 71:253-261.

STOCK, J. A. 1970. Chemotherapy of cancer. *Chem. Brit.* 6 (1): 11-16.

SZABAD, J., I. Soós., G. Polgár y G. Héjja. 1983. Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the Drosophila mosaic and the sex-linked recessive lethal test, *Mutation Res.* 113: 117-133.

TIMBRELL, J. A. 1989. Introduction to toxicology. Taylor and Francis Ltd. USA. 155 pp.

TOMLINSON, C. R. 1980. Effects of pH on the mutagenicity of sodium azide in Neurospora crassa and Salmonella typhimurium. *Mutation Res.* 70: 179-191.

VEGA, A. S. 1985. Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales, *Toxicología IV, Carcinogénesis química*; Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Organización Mundial de la Salud. 10:1-47.

VOGEL, E. W. 1987. Somatic cell mutagenicity in Drosophila melanogaster in comparison with genetic damage in early germ cell states. Mutation Res. 180: 189-200.

VOGEL, E. W. 1991. Genotoxic chemicals an introduction into basic principles of genetic toxicology. Laboratorium voor Stralengenetica en Chemische Mutagenese, R.U. Leiden Sylvius Laboratoria. 66 pp.

VOGEL, E. W. 1992. Genotoxic chemicals an introduction into the basic principles of genetic toxicology. Laboratorium voor Stralengenetica en Chemische Mutagenese. RU Leiden, Sylvius Laboratoria. (Curso).

VOGEL, E. W. y F. H. Sobels. 1976. The function of Drosophila in genetic toxicology testing. En: Chemical mutagens, principles and methods for their detection. (A. Hollander Ed.), Plenum Press, Nueva York, Vol. 4. pp. 93-142.

VOGEL, E. W. y A. Szakmary. 1990. Basic principles and evaluation of results of assay measuring genotoxic damage in somatic cells of Drosophila. En: Mutation and the environment. Part. B, pp 149-158.

VOGEL, E. W. y J. A. Zijlstra. 1987. Mechanistic and metodological aspects of chemically-induced somatic mutation and recombination in Drosophila melanogaster. Mutation Res. 182: 243-264.

VOGEL, E. W., Blijleven., P. Klapwijk y J. Zijlstra. 1980. Some current perspectives of the application of Drosophila in the evaluation of carcinogens. En: G.M.Williams; R. Kroes; H. Waaijers

y K. Van de Poll (Eds.) The Predictive value of short-term Screening Test in Carcinogenicity. Elsevier, Amsterdam, pp.125-147.

WATERS, M. D., A. L. Brady., H. F. Stack y H. E. Brokman. 1990. Antimutagenicity profiles for some model compounds. Mutation Res. 238: 57-85.

WATTENBERG, L. W. 1980. Inhibition of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-induced Neoplasia by Sodium Cyanate. Cancer Research, 40: 232-234.

WILKINS, A. S. 1986. Genetic analysis of animal development. Willey. Nueva York. 546 pp.

WÜGLER, F. E. y E. W. Vogel. 1986. In vivo mutagenicity testing using somatic cells of Drosophila melanogaster. En: Chemical mutagens principles and methods for their detection. (De Serres, F.J. Eds.). Plenum Press. Nueva York 10: 1-71.

ZIJLSTRA, J. A. 1984. Bioactivation and inactivation of mutagens in Drosophila. Mutation Res. 130: 276-322.

ZIJLSTRA, J. A. 1987. Pharmacological and metodological aspects of chemically induced somatic mutation and recombination in Drosophila melanogaster. Mutation Res. 182: 243-264.