

00361

4
207



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO DE LA RECOMBINACION SOMATICA
INDUCIDA POR DIFERENTES AGENTES EN
Drosophila.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P R E S E N T A :

MARTHA PATRICIA CRUCES MARTINEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. PEDRO MORALES RAMIREZ

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

27-2972

1999



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

Dedico esta tesis con todo mi amor a:

Mi hijo: Alejandro: la luz que ilumina mi vida

**Porque el mundo es más bello
desde el día que naciste.**

Mi Madre:

**María de Lourdes Martínez Carrillo
Por el inagotable amor que tiene
para todos nosotros**

Mi esposo:

**Emilio Pimentel Peñaloza
Por todo lo que hemos compartido juntos**

Mi hermana:

María Esther Cruces Martínez
Con la esperanza de que siempre estaremos juntas
disfrutando tiempos mejores.

Dora luz Barrón Manrique

Por el placer de compartir
cada día con alguien tan especial
Muchas gracias Doris.

Mis tíos, tías y sobrinos

A Lulú, Jose y Citlali
por la sonrisa de cada mañana

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento
al Dr. Pedro Morales Ramírez
gracias por su apoyo, por sus palabras de aliento
pero sobre todo por su confianza en mi.

Al Dr. Stanley Zimmering
Mi gran maestro

Al Dr. Víctor M. Salceda
Gracias por todo.

A la M. en C. Matilde Breña Valle
Su apoyo y sus consejos
han sido muy valiosos para mi.

Mi agradecimiento al comité de sinodales

**Dra. Sandra Gómez Arroyo
Dra. Judith Guzmán Rincón
Dra. Patricia Ramos Morales
Dr. Perdo Morales Ramírez
Dr. Manuel Uribe Alcocer
M. en C. Alfredo Delgado Rodríguez
M. en C. Juan Carlos Gaytán Oyarzún**

Gracias por sus comentarios y sus sugerencias

A mis amigos:

Es tiempo de agradecer, mis más querido amigos
los momentos compartidos, los buenos ratos y más
por todas aquellas horas que toleraron mis iras,
que soportaron mis riñas y supieron perdonar.

Hoy quiero darles las gracias por lo que juntos logramos
porque es más corto el camino cuando los tengo a mi lado
y quiero pedirles hoy, desde el fondo de mi ser
que nunca dejen de ser
Mis más queridos amigos

A todos ustedes, Gracias.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Drosophila del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.

Agradezco a las autoridades del Instituto las facilidades otorgadas para la realización del mismo

INDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1 Recombinación mitótica	2
2.2 Tipos de recombinación	2
2.3 Mecanismo de la recombinación	4
2.4 Significado biológico de la recombinación	6
2.5 Recombinación mitótica en <i>Drosophila</i> .	8
2.6 Recombinación inducida	10
2.7 Recombinación inducida por agentes químicos	12
2.8 Factores que modifican la frecuencia de recombinación inducida	18
3.0 Objetivo	21
4.0 Material y Métodos	22
4.1 Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas en <i>Drosophila</i> (SMART)	22
4.2 Cepas utilizadas	22
4.3 Colecta de huevos	23
4.4 Tratamiento de larvas	23
4.5 Preparación de las alas	24
4.6 Análisis de las manchas	24
4.7 Determinación del número de manchas considerando el tamaño del blanco	24
4.8 Determinación de la proporción mutación/ recombinación	25
4.9 Recombinación en las distintas regiones del cromosoma	25
5.0 Resultados	29
5.1 Rayos Gamma	29
5.2 EMS	31
5.3 MMS	33
6.0 Discusión	66

6.1 Comparación entre la frecuencia de manchas por ala y la inducción de manchas en relación al tamaño del blanco	66
6.2 Mecanismo para la inducción de manchas	69
6.3 Proporción de manchas por mutación / recombinación	70
6.4 Proporción mutación / recombinación en las diferentes etapas	74
6.5 Recombinación en las diferentes regiones del cromosoma	75
6.6 Distribución del tamaño de las manchas	78
7.0 Conclusiones	82
7.1 Frecuencia de manchas por ala “vs” número de manchas en relación al tamaño del blanco	82
7.2 Proporción mutación Recombinación.	82
7.3 Proporción de la recombinación en relación a la etapa de desarrollo	82
7.4 Recombinación en las diferentes regiones del cromosoma.	82
7.5 Tamaño de las manchas inducidas por los diferentes agentes.	83
8.0 Referencias	84

1. Resumen

La recombinación mitótica representa un evento muy importante desde el punto de vista biológico ya que funciona como un mecanismo de tolerancia al daño inducido al ADN, que permite que una célula sobreviva a pesar de la modificación de su material genético. En vista de que existe evidencia experimental que indica que la frecuencia de recombinación entre dos genes puede ser modificada por factores genéticos y no genéticos, el objetivo de esta investigación fue determinar si el tipo de agente, o la etapa de desarrollo, tenían algún efecto sobre la recombinación inducida en la región proximal (flr^3 -centrómero) del cromosoma 3 de *Drosophila melanogaster*.

Se trataron larvas mwh/flr^3 y $mwh/TM3$, Ser de 24, 48, 72,96 y 120 h con rayos gamma, metil y etil metano sulfonato.

Se estimó la cantidad total de células presentes en el disco imagal en el momento del tratamiento, dado que es la principal diferencia entre las etapas de desarrollo y se determinó el número de manchas inducidas por los agentes en relación al tamaño del blanco. A partir de estos datos, se calculó la proporción mutación / recombinación producida por los tres agentes, comparando la frecuencia de manchas en los individuos portadores del cromosoma $TM3$, Ser con la frecuencia de manchas en los individuos libres de inversión.

Los resultados obtenidos indicaron que los rayos gamma produjeron el porcentaje más alto de recombinación y el MMS el más bajo. En cuanto a la proporción de recombinación en la región distal del cromosoma, los resultados obtenidos indican que se incrementó significativamente en relación a la etapa de desarrollo con los tres agentes utilizados, esto podría estar relacionado con un cambio en la accesibilidad del mutágeno a esa región del cromosoma para cumplir requerimientos específicos de cada etapa del desarrollo.

2.0 INTRODUCCION

2.1 Recombinación mitótica

La recombinación mitótica, se define como el proceso que genera células diploides con una combinación de genes diferente a la de la célula que le dio origen. Es el resultado de la interacción entre dos cromosomas (generalmente dos cromosomas homólogos) y puede ser identificada por un cambio en la secuencia del ADN o un cambio en el alineamiento alélico (Würgler y Vogel, 1986; Würgler, 1992). La recombinación mitótica no es un simple mecanismo de ruptura y reunión de fragmentos de ADN, es un proceso celular esencial catalizado por enzimas específicas que las células codifican y regulan para este propósito (Watson y col., 1987).

Los términos recombinación mitótica y recombinación somática son frecuentemente utilizados como sinónimos, sin embargo es más correcto referirse al evento como recombinación mitótica, ya que además de las células somáticas, incluye a las células pre- meióticas de la línea germinal, las cuales también se dividen mitóticamente (Darras y Francke, 1987).

2.2 Tipos de recombinación

Würgler, 1992 distingue diferentes tipos:

Recombinación homóloga

Recombinación recíproca

Conversión génica

Recombinación sitio - específica

Recombinación ilegítima

2.2.1 Recombinación homóloga

Ocurre entre dos dúplex de ADN con la misma o casi la misma secuencia de bases. La influencia de la longitud de las secuencias que se intercambian se ha estudiado en diferentes organismos, y

se ha determinado que existe un número mínimo de bases requerido para el éxito de la recombinación (Würgler, 1992). Al parecer, estas longitudes mínimas de reconocimiento, representan un mecanismo para evitar la recombinación en las secuencias altamente repetidas distribuidas a lo largo del genoma de los eucariontes superiores.

El término de recombinación homóloga, se ha usado para caracterizar la recombinación dependiente de *recA* en *E. coli* (Porter, 1988).

2.2.2 Recombinación recíproca

Es un intercambio simétrico entre dos dobles hélices de ADN, en el que básicamente suceden tres eventos:

1. - Rompimiento de las 4 hebras de ADN.
2. - Reasociación de las hebras rotas en un complejo denominado Chi por la letra griega χ .
3. - Resolución del complejo Chi formando dos hebras dobles con un intercambio de segmentos de doble banda o un intercambio completo (Würgler, 1992).

2.2.3 Conversión génica

Se define como una transferencia no recíproca de información genética, en este caso se presentan también 3 eventos.

1. - Se copia un segmento de un dúplex de ADN.
2. - Se elimina un segmento homólogo en otro dúplex de ADN.
3. - El segmento eliminado se reemplaza por el segmento copiado.

Al igual que en la recombinación recíproca, está regulada por enzimas específicas. El tamaño de los segmentos de ADN intercambiados varía entre las diferentes especies, en los mamíferos por ejemplo se ha demostrado que abarca menos de 350 pares de bases, mientras que en *Saccharomyces cerevisiae*, se ha observado que puede abarcar hasta 10 Kilobases (Kb).

2.2.4 Recombinación sitio - específica

Está representada por eventos que ocurren preferentemente en lugares altamente específicos. Un ejemplo clásico es la integración del bacteriófago lambda dentro del genoma de la bacteria y la subsecuente escisión, en donde se requieren sitios de unión específicos en ambas moléculas de ADN (Watson y col., 1987).

2.2.5 Recombinación ilegítima

En este tipo no se requiere homología entre las moléculas de ADN, básicamente se trata de un mecanismo de corte y de unión y no precisa por lo tanto de las enzimas que promueven la recombinación homóloga o la sitio - específica, este evento ha sido reportado en procariontes, eucariontes superiores y aún en células de mamíferos. En contraste con las bacterias, en donde la frecuencia de recombinación ilegítima es más baja que la recombinación general o la sitio específica, en las células somáticas de mamíferos domina la recombinación ilegítima. Se ha calculado por ejemplo que por cada caso de recombinación homóloga, suceden entre 100 y 1000 integraciones ilegítimas (Würgler, 1992).

2.3 Mecanismo de la recombinación

La mayor parte del conocimiento que se tiene acerca del proceso de recombinación, proviene de los estudios realizados en *E. coli* (Watson y col., 1987).

Se ha demostrado que la proteína RecA juega un papel muy importante en este proceso. Esta enzima, promueve rápidamente la sinapsis de dos moléculas homólogas de ADN y posteriormente genera el intercambio de dos hebras, creando un heteroduplex (Radding, 1988).

Un punto interesante sobre la iniciación de la recombinación, es el hecho de que las rupturas en el ADN estimulan el evento. De forma tal, que los agentes que las producen de doble cadena de manera directa como los rayos X o indirecta como la luz ultravioleta y los agentes químicos estimulan la recombinación. Las mutaciones de los genes que codifican para la ADN ligasa y la polimerasa I en bacterias y que dan lugar a rupturas o huecos, evitando el "sellado" del ADN

durante la replicación o la reparación, tienen el mismo efecto (Radding, 1988). Se piensa que de manera similar las enzimas celulares inducen activamente el entrecruzamiento meiótico creando rupturas ocasionales a lo largo de dos cromosomas que se encuentren en sinapsis (Kowalczykowski y Eggleston 1994).

Las rupturas y los huecos en el ADN inician la recombinación, porque proveen sitios para que actúen las nucleasas que degradan una parte del dúplex, o permiten que las topoisomerasas entren en acción, exponiendo al ADN para que actúe RecA (Kowalczykowski y Eggleston 1994).

La enzima RecA reconoce específicamente ADN de una sola hebra y lo reúne con una secuencia complementaria en un dúplex homólogo, desplazando simultáneamente a la hebra residente. Después de que se ha conseguido el apareamiento, las moléculas deben de intercambiar hebras. Conceptualmente el apareamiento de los homólogos y el intercambio son eventos separados, pero ocurren simultáneamente (Kowalczykowski y Eggleston 1994).

El intermediario de recombinación que une dos ADN dúplex contiene 4 hebras de ADN que se intercambian en el punto de unión formando una estructura que se conoce como configuración de Holliday. La existencia de esta estructura fue sugerida originalmente por experimentos que detectaron regiones de heterodúplex en ambos ADN recombinantes y ha sido confirmada por estudios de microscopía electrónica en ADN de bacterias (Radding, 1988).

El concepto heterodúplex, se refiere a regiones en las moléculas de ADN recombinante donde las dos hebras no son exactamente complementarias. La construcción de modelos muestra que la rotación del esqueleto permite a una hebra moverse desde una doble hélice a otra en la estructura de Holliday sin perder bases (Watson y col., 1987).

Una vez que las dos hélices se asocian, el punto de unión, puede ser fácilmente deslizado mediante una acción parecida a una cremallera en la que las bases equivalentes en las dos moléculas originales, intercambian lugares en un proceso llamado "migración de las bandas". De esta manera, grandes longitudes de una cadena pueden moverse desde una hélice hasta la otra

generando frecuentemente grandes secciones de ADN híbrido que podría contener regiones heteroduplex (Watson y col., 1987).

Aun cuando RecA lleva a cabo un paso fundamental de la recombinación que es el apareamiento, otras proteínas están involucradas en otros puntos de este proceso, entre estas, una de las más importantes es la enzima RecBC que tiene actividades de topoisomerasa y de nucleasa que se combinan para exponer un extremo libre de ADN de hebra sencilla para que RecA se una y comience la reacción de apareamiento. En *E. coli* además de recA, recB y recC, existen numerosos genes cuyos productos son necesarios para llevar a cabo de manera eficiente el proceso (van Gool y col., 1998).

Dos pasos clave en el proceso de la recombinación son la migración de las bandas en la estructura de Holliday y la separación de los productos de la recombinación. En *E. coli* la migración de las bandas es catalizada por la enzima RuvB que es una helicasa, mientras que la resolución de la estructura de Holliday se lleva a cabo por la endonucleasa RuvC (van Gool y col., 1998).

Muchas de las proteínas necesarias para la síntesis del ADN también intervienen en la recombinación, como es el caso de la proteína que se une al ADN de una sola banda, y que facilita la síntesis de ADN manteniéndolo de una manera lineal de tal manera que las enzimas encargadas de la replicación puedan tener acceso a la molécula. La ADN polimerasa, llena los huecos que quedan cuando se cortan y se separan los ADN's recombinantes y finalmente una ADN ligasa, sella las uniones. La extrapolación de este mecanismo a los eucariontes, esta basado en una gran lista de proteínas aisladas en otros organismos y que son estructuralmente similares a RecA (Kowalczykowski y Eggleston 1994).

2.4 Significado biológico de la recombinación

La recombinación entre cromosomas homólogos en células somáticas, tiene consecuencias comparables a las del entrecruzamiento en las células germinales ya que se cambia el patrón de la segregación de los alelos (Würgler y Vogel, 1986).

Uno de los resultados de la recombinación es la pérdida de la heterocigocidad. En las células que son heterocígas para dos alelos de un gen marcador en los cromosomas homólogos, la recombinación recíproca en el segmento entre el gen marcador y el centrómero, conducirá a la pérdida de la heterocigocidad (Würgler,1992). Como consecuencia de esto en un tejido en proliferación, se desarrollarán dos células homocigóticas para un gen marcador (Becker, 1976, (Würgler y Vogel, 1986). Si el gen produce un fenotipo fácilmente distinguible, se podrán detectar grupos de células fenotípicamente alteradas.

La recombinación no solamente provee variación genética, las enzimas que intervienen en este proceso, permiten a las células el retribuir las secuencias perdidas cuando el ADN es alterado por errores en la duplicación o por agentes físicos y químicos, reemplazando las secuencias modificadas por otras, tomando como molde el cromosoma homólogo. De esta manera el significado biológico de la recombinación es el de funcionar como un mecanismo de tolerancia al daño inducido por diferentes agentes, aún más, se sabe que algunos tipos especiales de recombinación, regulan la expresión genética, activando segmentos específicos dentro de los cromosomas, es decir que se colocan genes inactivos en sitios en donde puedan ser activados para cumplir con requerimientos específicos de la célula (Watson y col., 1987). Aunque las pruebas para detectar recombinación mitótica y conversión génica con hongos, fueron introducidas desde hace muchos años en la genética toxicológica, las consecuencias de la actividad recombinogénica de los agentes químicos pasaron inadvertidas y la atención se centró más bien en torno a las mutaciones génicas y a las aberraciones cromosómicas. Actualmente se sabe que la recombinación inter e intra cromosomas y otros puntos genéticos asociados con ella, tales como la amplificación de genes y las transposiciones, pueden desempeñar un papel muy importante en las alteraciones genéticas que conducen a la formación de una célula cancerosa. Por ejemplo la amplificación de genes implica un medio importante para su activación (Ramel y col., 1996).

Uno de los hallazgos más importantes en la genética molecular en los últimos años, ha sido la asociación entre la amplificación de los mini y micro satélites de ADN y algunas enfermedades, entre las que se incluye al cáncer. Los mecanismos responsables de esas alteraciones del ADN, incluyen eventos de recombinación (Ramel y col., 1996).

Otro punto asociado con recombinación, es la movilización y transposición de elementos de ADN. El papel de las transposiciones para la mutagenicidad *in vivo*, varía entre los diferentes organismos aunque aparentemente los humanos y otros mamíferos no se encuentran entre las especies más susceptibles. En las bacterias existe evidencia que indica que el daño al ADN, estimula significativamente la transposición (Ramel y col., 1996).

2.5 Recombinación mitótica en *Drosophila*

En 1936, Stern demostró que el intercambio de material genético no estaba restringido a la meiosis, ya que se observaba también durante la mitosis (Becker, 1976). La recombinación mitótica puede darse en las células somáticas, donde la consecuencia son mosaicos somáticos, o bien en las células germinales donde el resultado es la formación de gametos recombinantes.

El descubrimiento de la actividad de la enzima RecA en *E. coli*, estimuló la búsqueda de proteínas con una actividad similar en otros organismos. Dada la importancia de la recombinación, no fue una sorpresa que se encontraran enzimas similares en otras especies.

En *D. melanogaster* se ha aislado una proteína de 105 kDa cuya actividad es independiente de ATP. La enzima se denominó Rrp1 (Recombination repair protein 1). Rrp1 pertenece a una familia de nucleasas de reparación que incluye a la exonucleasa III de *E. coli*, la exonucleasa A de *Streptococcus pneumoniae*, la BAP bovina, la exonucleasa APEX del ratón y la APE humana (Nugent y col., 1993). Este grupo de enzimas repara el daño ocasionado por agentes oxidantes y alquilantes. Se ha demostrado que la actividad de la enzima es más eficiente en ADN aislado, de hebra sencilla en regiones ricas en purinas, más que en las regiones ricas en pirimidinas (Sander, 1996).

Rrp1 tiene asociadas diferentes actividades enzimáticas entre las que se incluyen exonucleasa 3', endonucleasa apurinica/apirimidica, 3' fosfatasa y 3' fosfodiesterasa. Un tercio carboxi-terminal que es homólogo a la exonucleasa III de *E. coli* es suficiente para reparar el daño oxidante y el provocado por agentes alquilantes.

La actividad para transferir hebras de ADN y para renaturalizarlo está asociada con la región N-terminal de Rrp1, lo que sugiere que esta proteína tiene funciones adicionales que incluyen reparación por recombinación. (Szakmary y col., 1996).

2.5.1 Recombinación no inducida

En *Drosophila* la diferencia entre el entrecruzamiento meiótico y la recombinación mitótica es que la segunda se da con igual frecuencia en ambos sexos, mientras que el entrecruzamiento meiótico sucede solamente en las hembras. Otro punto importante es que la recombinación mitótica puede llevarse a cabo tanto en la región eucromática como en la heterocromática de los cromosomas (Haendle, 1979).

A este respecto, se ha postulado que la recombinación mitótica sucede preferentemente en las regiones heterocromáticas de los cromosomas (Haendle, 1979). La frecuencia de mosaicos generados por recombinación mitótica, ha sido expresada por muchos autores en porcentaje; esto es el número de clones en 100 moscas. Actualmente este porcentaje es referido a la cantidad de clones por mosca (Frei y Würgler, 1995). La frecuencia de los clones inducidos por recombinación, depende principalmente de la distancia física entre los marcadores, pero puede ser modificada por factores ambientales y genéticos y por la dinámica de proliferación del tejido en el cual se están analizando.

Las variaciones en la frecuencia de recombinación mitótica espontánea se conocen desde hace mucho tiempo (Becker, 1976). La suma de los recombinantes en un cromosoma determinado está controlada por el contenido genético de dicho cromosoma.

Uno de los factores genéticos que afectan la recombinación, es la existencia de un grupo de genes, denominados Minute, los cuales son letales recesivos con un efecto sobre el desarrollo de los individuos y que incrementan significativamente la frecuencia de recombinación inducida en el cromosoma en el que se encuentran (Ashburner, 1989).

Entre los factores no genéticos que han sido más estudiados con respecto a su efecto en la recombinación mitótica, se encuentran la temperatura y la edad de los individuos (Becker, 1976). El efecto de la temperatura en el mosaicismo somático, fue estudiado por primera vez por Stern y Reustschler en 1936 (Ashburner, 1989). En los trabajos realizados, encontraron que a temperaturas cercanas a los 30 ° C la frecuencia era más baja que a temperaturas entre los 17 y 25° C (Ashburner, 1989)

La edad de las hembras es una factor que también afecta la frecuencia de recombinación, existiendo una relación directa entre la frecuencia de recombinación y la edad materna (Abbadessa y Burdick,1963). En estudios realizados combinando la edad de los individuos y cambios bruscos de temperatura se determinó que la recombinación varió en las diferentes etapas del desarrollo (Walen,1963).

2.6 Recombinación inducida

Aunque la recombinación mitótica puede ocurrir espontáneamente (esto es sin que los individuos hayan sido tratados), su frecuencia es mucho muy baja, sin embargo la tasa de recombinación de una célula puede ser incrementada por su exposición a agentes que causan daño al ADN. A este tipo de agentes, se les conoce comúnmente como recombinógenos (Würgler, 1992).

2.6.1 Recombinación inducida por radiación ionizante

Poco tiempo después de la descripción de la recombinación mitótica en *Drosophila*, los experimentos realizados por Friesen demostraron que la radiación ionizante, específicamente los rayos X, inducían recombinación mitótica en la línea germinal de los machos de *Drosophila* (Ashburner, 1989).

Uno de los estudios más completos sobre la recombinación mitótica inducida por rayos X en *Drosophila*, fue el realizado por Haendle (1979). En estos estudios se estableció que la recombinación producida por rayos X es dosis y espectro dependiente. Este autor, observó una

pendiente discontinua en la curva dosis - efecto, de los individuos que habían sido irradiados con 100 kV durante 30 segundos. Cuando la velocidad de dosis se disminuyó, la curva dosis respuesta fue lineal.

En *Drosophila*, se ha observado la inducción de recombinación mitótica después del tratamiento con rayos X, (Haendle, 1979) rayos gamma (Würgler y Vogel, 1986; Cruces, 1989; Zimmering y col., 1990), partículas alfa (Pimentel y col., 1997) y neutrones de fisión (Ayaki y col., 1990). Los rayos gamma son actualmente muy utilizados como inductores de recombinación mitótica en *Drosophila*.

2.6.2 Efectos biológicos de la radiación.

El deposito de la energía de la radiación ionizante sobre la materia, genera la formación de moléculas excitadas y radicales libres. El daño inducido por la radiación ionizante se atribuye tanto al efecto directo, (resultado de la interacción de la energía de la radiación con el ADN) como al indirecto causado por la ionización y producción de radicales libres (Arena, 1971).

La predominancia del agua en los sistemas biológicos, determina que las especies reactivas formadas por su radiólisis, sean la mayor fuente de radicales libres generados por radiación ionizante. Estas especies han sido bien caracterizadas e incluyen peróxido de hidrogeno, átomos de hidrógeno, electrones y radicales hidroxilo (Friedberg, 1984).

Entre los eventos producidos por la radiación ionizante se encuentra la formación de rupturas cromosómicas. La mayor parte de éstas, son causadas por el rompimiento de las uniones de los fosfodiésteres en una de las cadenas de polinucleótidos, pero la destrucción del anillo de desoxirribosa puede también conducir a interrupciones de la estructura desoxirribosa - fosfato. La formación de rupturas simples por radiación ionizante, puede incrementar la probabilidad de unión de radicales libres en el sitio donde ocurrió. Estos rompimientos son producidos tanto por el efecto directo como por el indirecto. Se ha determinado que los radicales hidroxilo son los que contribuyen en mayor parte a este tipo de eventos (Friedberg, 1984).

En todos los organismos, con excepción de los virus que poseen cadenas simples de ADN, las rupturas simples no son letales para las células. La mayor parte de los efectos letales asociados con la exposición a radiación ionizante han sido atribuidos a rompimientos de la doble cadena, estos, se originan a partir de rupturas simples de origen independiente que se encuentren muy cercanas entre si pero en cadenas opuestas, o bien como resultado de un evento simple: la hidrólisis de los forfodiésteres en las dos cadenas. Al igual que las rupturas simples, pueden ser creadas por efecto directo o indirecto.

2.7 Recombinación inducida por agentes químicos

Muchas sustancias al igual que la radiación ionizante, producen rupturas en el ADN, y tienen por lo tanto la posibilidad de inducir recombinación.

La observación de que la recombinación mitótica puede ser provocada por un agente químico fue reportada en 1945 por Charlottee Aurebach, utilizando el gas mostaza, un agente alquilante que indujo mosaicos somáticos en individuos tratados en diferentes etapas del desarrollo (Becker, 1976).

Hasta finales de los años 70, el único agente químico que se había estudiado de manera sistemática era la trietil melamina (TEM). A partir de la década de los 80's se ha evaluado la capacidad recombinogénica de gran cantidad de compuestos con tres ensayos que utilizan células somáticas de *Drosophila*: el ensayo del ala (Graf y col., 1983; Graf y col., 1984; Vogel, 1985; Vogel y col., 1999), el ensayo white/ white coral (Vogel, 1985) y el ensayo white- zeste (Rasmuson y col., 1978; Vogel, 1985)

Con estos ensayos se ha podido determinar la capacidad mutagénica y recombinogénica de muchos agentes. Graf y col. (1992) demostraron mediante el uso de las células somáticas del ala de *Drosophila* que más del 90% de las manchas recuperadas después del tratamiento con trióxido de cromo fueron originadas por recombinación. Se ha postulado que este compuesto, crea rupturas en al ADN, a través de la acción de los radicales libres que son generados en los pasos que llevan a la conversión del cromo hexavalente en cromo trivalente.

Ramel y col. (1996) determinaron la actividad recombinogénica de diferentes agentes químicos que representaron las siguientes categorías: agentes alquilantes monofuncionales, inductores de puentes cruzados (cross-linking), agentes intercalantes, venenos de las topoisomerasas I y II productores de aductos pesados, y dihaloalquenos entre otros. Los resultados obtenidos en esta investigación demostraron que los agentes alquilantes monofuncionales EMS, ENU y MMS son buenos recombinógenos en *Drosophila*, los mismos resultados se obtuvieron para los agentes que producen puentes cruzados, los dihaloalquenos y todos los venenos de las topoisomerasas excepto la amsacrina. Se encontraron datos inconclusos con los agentes generadores de estrés oxidante y los que causan aductos pesados.

Por medio de los ensayos somáticos se ha demostrado que muchos de los agentes que se han clasificado como cancerígenos, son inductores de recombinación (Vogel, 1991). Entre estos agentes se encuentran muchos de los que se utilizan en la terapia del cáncer como el metotrexato, la mitomicina C, el cisplatino y la ciclofosfamida entre muchos otros. Con respecto a este último agente se ha demostrado que más del 70% de todos los eventos inductores de manchas en el ensayo del ala fueron recombinación mitótica (Graf y col., 1992; Cruces y Linares, 1996).

2.7.1 Agentes alquilantes

A pesar de que los agentes alquilantes monofuncionales, no son considerados contaminantes ambientales, dada su capacidad para reaccionar directamente con el ADN tanto **in vitro** como **in vivo**, han sido muy utilizados para estudiar diferentes aspectos del efecto genotóxico (Vogel y Natarajan, 1979 a y b; Beranek, 1990; Vogel, 1990).

Los agentes alquilantes producen diferentes eventos de gran importancia desde el punto de vista genético, entre estos se incluyen las mutaciones puntuales, la pérdida de cromosomas, la inducción de aberraciones cromosómicas, los intercambios de cromátidas hermanas, la recombinación mitótica y la muerte celular (Natarajan y col., 1984; Rasmuson, 1985; Beranek, 1990; Vogel, 1992). Estos agentes deben su nombre a que poseen un grupo alquilante que puede ser fácilmente transferido a otras moléculas, esto es particularmente relevante en el caso del ADN en donde las reacciones secundarias pueden conducir a la eliminación de bases, rupturas y

enlaces cruzados. Dependiendo del número de grupos alquil transferibles, se puede distinguir entre agentes monofuncionales, bifuncionales o polifuncionales, estos dos últimos son los responsables de los enlaces cruzados.

Los agentes alquilantes han sido divididos en tres grupos:

Alquil sulfatos: que incluye al dietil (DES) y dimetil sulfato (DMS).

Alquil alqueno sulfonatos: al que pertenecen el metil (MMS) y etil metano sulfonato (EMS).

Nitrosamidas: aquí se encuentran la metil y etil nitrosourea (ENU), metil (MNNG) y etil -N - nitrosoguanidina (ENNG) y el agente indirecto dimetil nitrosamida (Beranek, 1990).

Estos agentes, difieren tanto en su estructura como en la distribución de las lesiones causadas en el ADN y las proteínas. Mientras que la frecuencia relativa de los aductos, en los distintos sitios de la molécula de ADN, varía mucho entre los diversos mutágenos, casi todos los sitios son alquilados en la misma medida por cada mutágeno (Lee y col., 1990).

Muchos sitios en el ADN, son susceptibles a la acción de los agentes alquilantes. Todos los oxígenos y los nitrógenos (excepto el que está unido al azúcar) pueden ser alquilados, en total representan alrededor de 20 sitios nucleofílicos diferentes (Vogel, 1991).

Los estudios comparativos realizados por Ehrenberg y col. (1966) en diferentes sistemas de prueba, revelaron que es posible correlacionar los efectos biológicos de los agentes alquilantes, tales como muerte celular e producción de mutaciones, con sus patrones de reacción primaria.

La reactividad de los agentes alquilantes con los diversos sitios nucleofílicos puede ser definida en términos de mecanismos de reacción y la dependencia de las tasas de reacción sobre la fuerza nucleofílica de los átomos receptores. (Osterman- Golkar y col., 1970).

Una expresión muy útil que denota la reactividad de los agentes alquilantes es la constante de substrato k_s , de la ecuación de Swain - Scott que es una medida de la sensibilidad de los agentes alquilantes a los cambios en la fuerza del nucleófilo con el que reaccionan. Esto significa que los agentes alquilantes con un valor alto de k_s , muestran una muy alta selectividad en sus reacciones. Estos agentes reaccionan preferentemente con los átomos de nitrógeno en el ADN y las proteínas que son los átomos que tienen una fuerza nucleofílica relativamente alta, en contraste con su pobre eficiencia para reaccionar con los átomos de oxígeno que tienen una fuerza nucleofílica relativamente baja. (Vogel y Natarajan, 1979 a y b; Beranek, 1990; Vogel, 1991).

2.7.2. Agentes alquilantes como recombinógenos

Dada la habilidad que tienen los agentes alquilantes para reaccionar con el ADN, ha surgido el interés por determinar su capacidad para inducir recombinación así, Rodríguez - Arnaiz y col., (1996) determinaron el porcentaje de recombinación mitótica inducida por seis agentes alquilantes con diferentes mecanismos de acción, los cuales fueron MMS, DMN, DEN, MMC, Clorambucil y Monocrotalina. Los resultados de esta investigación, demostraron que todos los agentes excepto la DEN causaron altas frecuencias de recombinación. El porcentaje más alto correspondió al agente alquilante mono- funcional MMS. Los autores de este trabajo sugieren que existe una relación directa entre la alquilación de los nitrógenos en la molécula de ADN y la eficiencia de los agentes alquilantes para inducir recombinación mitótica.

2.7.3 EMS Y MMS

Entre los agentes alquilantes monofuncionales, el etil metano sulfonato (EMS) y el metil metano sulfonato (MMS), se encuentran entre los que han sido más ampliamente estudiados en *Drosophila melanogaster* (Ashburner, 1989). Las fórmulas de los dos compuesto se muestran en la figura 1.

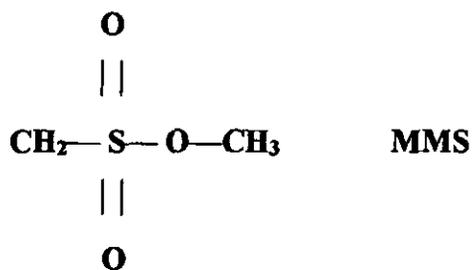
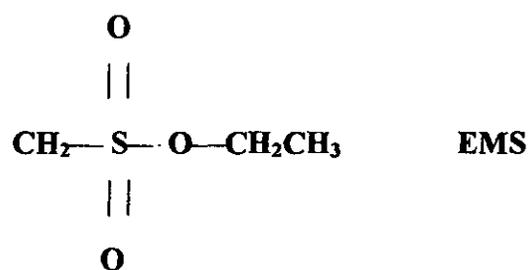


Figura 1. Fórmulas de los compuestos EMS Y MMS

El EMS, ha sido desde su introducción por Lewis y Bacher, (1968), el mutágeno químico más utilizado en la investigación con *Drosophila*, las razones para ello son su gran eficiencia y su baja toxicidad en comparación con otros agentes químicos.

En *Drosophila* se ha demostrado que el MMS también es un mutágeno eficiente, aunque no tanto como el EMS (Ashburner, 1989). Esto se debe a que aunque parece ser más efectivo para inducir rupturas en el ADN, es substancialmente más tóxico (Vogel y Natarajan, 1979 a). En la tabla 1 se presentan los valores de la Dosis Letal 50 inducida por estos agentes en *Drosophila* (Vogel y Natarajan 1979a).

Tabla I. Dosis Letal 50 (mM) calculada para algunos agentes alquilantes (Vogel y Natarajan (1979a).

MUTAGENO	ALIMENTACION	INYECCION
EMS	45.0	197.0
MMS	2.9	7.8

Los valores de \underline{g} calculados para cada compuesto, son de 0.84 para el MMS y 0.67 para EMS. Tomando en cuenta lo anterior, se espera que los dos agentes presenten mayor selectividad por los sitios más nucleofílicos en el ADN.

En la Tabla II, se presenta la distribución relativa de los productos de metilación y etilación en diferentes sitios en el ADN.

Tabla II. Distribución de los productos de etilación y metilación

	MMS	EMS
N7- ALOQUILGUANINA	80-90 %	60-70 %
N-3 ALOQUILADENINA	7-15 %	± 5 %
O ⁶ ALOQUILGUANINA	< 1 %	± 2 %
FOSFOTRIESTERES	No detectable	12-20 %
TOTAL N-ALOQUILACION	99 %	80 %
TOTAL O ALOQUILACION	< 1 %	20 %

En Vogel (1991).

La alquilación de la guanina en O⁶, uno de los aceptores de un hidrógeno en la guanina, fija un tautómero anormal, se bloquea entonces un sitio importante en la estructura del ADN. La modificación en el O⁶ de la guanina, es una lesión pre - mutagénica, cuya consecuencia es una

inhabilidad para formar un par específico C - G, y si no es reparada, puede conducir a la incorporación errónea de una timina en lugar de una citosina, durante la replicación del ADN. Se ha determinado de esta manera que las lesiones producidas por los agentes alquilantes que muestran selectividad por los oxígenos, son buenos inductores de mutaciones. Por otra parte se ha observado que las lesiones producidas por los agentes alquilantes que tienen afinidad por los nitrógenos, se relacionan con la inducción de rompimientos en el ADN (Vogel, 1986).

2.8 Factores que modifican la frecuencia de recombinación inducida

Además de los factores ya mencionados para la recombinación no inducida, los estudios realizados han puesto de manifiesto que la frecuencia de recombinación inducida está relacionada con el tipo de célula en la que ocurre el evento.

Morales - Ramírez y col. (1994) demostraron que la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (los cuales son eventos de recombinación con homología máxima), tanto basales como inducidos por rayos gamma, fue mayor en las células de la médula ósea y en la glándula salival que en las espermatogonias. Este hecho podría tener consecuencias evolutivas ya que las células germinales, las responsables de transmitir la información genética de una generación a otra, en teoría tendrían que contar con mecanismos de reparación más eficientes, o como apuntan los autores, ser el objeto de una preferente reparación por recombinación de regiones donde se encuentran genes transcripcionalmente activos.

En *Drosophila* una de las diferencias más importantes entre el entrecruzamiento meiótico y la recombinación mitótica es que el primero sólo ocurre en las regiones eucromáticas del cromosoma, mientras que la última se lleva a cabo tanto en la eucromatina como en la heterocromatina (Haendle, 1979). Debido a esto surgió el interés por establecer si ambas regiones del cromosoma tenían igual sensibilidad. Los trabajos realizados a este respecto sugieren que en *Drosophila*, la mayor parte de la recombinación inducida se lleva a cabo en las regiones proximales de los cromosomas, generalmente en la heterocromatina centromérica (Olvera y col., 1993). Este hecho no parece ser exclusivo de la recombinación, la evidencia experimental, sugiere que también la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) es mayor en la

heterocromatina del cuello del cromosoma X del ciervo hindú (Carrano y Johnston, 1977). Por otra parte, los diferentes agentes químicos al parecer muestran cierta selectividad para producir rompimientos en alguna de las zonas del cromosoma. Se ha demostrado experimentalmente que el etil metano sulfonato, induce rupturas preferentemente en la región heterocromática del cromosoma 2 de *Drosophila* (Hilliker, 1976).

Tokunaga y Arnheim (1966) concluyeron a partir de los resultados obtenidos al tratar larvas de *Drosophila* de edades distintas que la irradiación de las larvas de *Drosophila* en una etapa temprana del desarrollo inducía la recombinación en la región distal del brazo izquierdo del cromosoma 2, mientras que si los individuos se irradiaban en una etapa tardía del desarrollo, se obtenía una alta frecuencia de recombinantes entre los genes que se encontraban más cerca del centrómero. El hecho de que haya zonas especialmente recombinogénicas, y que varíen en las diferentes etapas del desarrollo, podría ser explicado por alteraciones estructurales de la cromatina o por modificaciones funcionales a la misma, tal como la expresión selectiva de genes. A este respecto Hanawalt, demostró que la reparación del daño al ADN producido por los dímeros de pirimidina fue reparado más eficientemente en la región transcripcionalmente activa del gen dihidrofolato reductasa que en las regiones no codificantes, de la misma manera los resultados obtenidos por Lommel y col. (1995), demostraron que la reparación de los dímeros de pirimidina inducidos por luz ultravioleta fue mayor en las hebras de ADN transcripcionalmente activas, considerando lo anterior se podría esperar que también la frecuencia de recombinación fuera más elevada en las regiones que se están transcribiendo activamente.

En vista de que, hay evidencia experimental indicadora de que la frecuencia de recombinación entre dos genes no depende solamente de la distancia entre ellos, da pie al objetivo de la presente investigación.

3.0 OBJETIVO:

Determinar la frecuencia de recombinación inducida en las regiones distal (mwh-flr³) o proximal (flr³-centrómero) del cromosoma 3 de *Drosophila melanogaster*, causada por rayos gamma, EMS y MMS en diferentes etapas del desarrollo larvario.

3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

3.1.1 Evaluar el número de manchas inducidas por cada uno de los agentes.

3.1.2 Determinar la sensibilidad de cada etapa del desarrollo respecto a la inducción de manchas sencillas y gemelas.

3.1.3 Determinar la proporción mutación / recombinación inducida por rayos gamma, EMS y MMS.

3.1.4 Relacionar la recombinación inducida con la región del cromosoma donde ocurrió el intercambio.

4.0 MATERIALES Y METODOS

4.1 Prueba de mutación y recombinación somáticas en *Drosophila* (SMART)

Para realizar la siguiente investigación se utilizó la prueba de mutación y recombinación somáticas en el ala de *Drosophila* (Graf y col., 1984), la cual, consiste en exponer a un agente larvas heterocigóticas para un marcador fácilmente distinguible en la cutícula de la mosca adulta. Dado que las células de los discos imagales están destinadas a dividirse en una manera constante, si se produce una mutación en una de las células expuestas esta dará lugar a una alteración del fenotipo que se expresará como un grupo de células mutantes (mancha) distinguibles en la cutícula de la mosca adulta (Würgler y Vogel, 1986).

4.2 Cepas utilizadas

Se emplearon las cepas *mwh / mwh* y *flr³/TM3, Bd^s*.

Tanto *mwh* como *flr³*, son marcadores recesivos que modifican la forma de las cerdas en las células del ala. Ambos marcadores se encuentran en el brazo izquierdo del cromosoma 3.

El marcador *mwh* (múltiple wing hair), está localizado en posición 0.03, afecta los tricomas de todas las regiones del cuerpo, incrementado el número de elementos, lo cual está relacionado con una reducción en la longitud y modificaciones en su orientación. En el ala, la mutación genera células con 3 a 7 tricomas en lugar de uno por célula que es la condición normal (Lindsley y Zimm, 1990).

El gen *flr³*, modifica la forma del tricoma, produciendo un engrosamiento en la base que esta asociado con una reducción en el tamaño del tricoma confiriéndole la apariencia de una flama; en condición homocigótica, el gen es letal y por ello en la cepa está balanceado con el cromosoma TM3, Ser, un cromosoma que porta inversiones múltiples y funciona como balanceador. La presencia de las múltiples inversiones en el cromosoma balanceador, impide la recombinación entre los cromosomas homólogos (Würgler y Vogel, 1986; Graf y col., 1992).

Los cromosomas balanceadores, fueron introducidos por Müller en la genética con la finalidad de mantener las mutaciones letales de una manera tal que no requieran selección (Ashburner, 1989).

4.3 Colecta de huevos

Se cruzaron hembras vírgenes de la línea mwh/mwh con machos de la cepa $flr^3/TM3, Bd^s$. Una vez cruzados, se colectaron huevos durante 6 h solamente para sincronizar la edad de los individuos. La colecta se realizó en frascos lecheros de 250 ml de capacidad que contenían medio de cultivo normal, transcurrido ese tiempo, los huevos se incubaron en el cuarto de cultivo. Se repitió este procedimiento durante 5 días para obtener larvas de 5 edades distintas.

4.4 Tratamiento de larvas

En el día destinado para el tratamiento las larvas correspondientes a las edades de 24, 48, 72, 96, y 120 h, se separaron del medio de cultivo por densidad de sacarosa al 20 % y se trataron con los diferentes agentes.

4.4.1 Rayos gamma

Para el tratamiento con rayos gamma, larvas de cada una de las diferentes edades, se colocaron en tubos homeopáticos de vidrio y se irradiaron con 20 Gy de rayos gamma en el irradiador Gammacell 250, a continuación se trasladaron a medio de cultivo normal y se introdujeron al cuarto de cultivo hasta completar su desarrollo.

4.4.2 Agentes químicos

En el caso de los agentes químicos, una vez separadas las larvas del medio en el que se encontraban se pusieron en tubos homeopáticos de plástico que en uno de sus extremos, estaba cubierto con una malla de nilón para permitir que las larvas estuvieran en contacto con el mutágeno. Los tubos se colocaron en una caja de petri con 1.5 g de polvo de celulosa y 10 ml de la solución de mutágeno (EMS o MMS) y permanecieron en el tratamiento durante 6 h (tratamiento agudo). Se utilizó la concentración de 46.1 mM para el EMS y 12 mM para el MMS, estas se eligieron dado que en trabajos anteriores produjeron frecuencias altas de manchas (Würgler y Vogel, 1986; Graf, 1995).

4.5 Preparación de las alas

Una vez concluido el tratamiento, las larvas se lavaron perfectamente al chorro del agua para eliminar cualquier rastro del mutágeno y se sembraron en tubos homeopáticos con medio de cultivo normal, posteriormente se introdujeron al cuarto de cultivo para que completaran su desarrollo. Cuando los adultos emergieron, se fijaron en etanol al 70 %, se les disectaron las alas y se montaron en preparaciones fijas, de acuerdo con la técnica descrita por Graf y col. (1984).

4.6 Análisis de manchas

Como resultado de la cruce de las dos cepas utilizadas en esta investigación, se obtienen dos tipos de descendientes (Figura 2). Las alas de los dos tipos se analizaron al microscopio óptico a 400 aumentos. Para cada ala se registró el número y el tipo de las manchas (grupos de células mutantes) clasificándolas de la siguiente forma:

4.6.1 Manchas sencillas:

Son aquéllas que expresan un solo tipo celular (mwh ó flr^3) y dependiendo de su tamaño, se pueden subclasificar en:

4.6.1.1 Chicas: 1 ó 2 células mutantes.

4.6.1.2Grandes: más de dos células mutantes.

4.6.2 Manchas gemelas: En estas se observan los dos tipos celulares mwh y flr^3 , en células adyacentes.

4.7 Determinación del número de manchas considerando el tamaño del blanco.

Dado que el número de células en el disco imagal es diferente en cada una de las etapas del desarrollo, para tener una idea más precisa sobre las manchas inducidas en relación al blanco celular, se calculó la cantidad de células expuestas en cada una de las etapas del desarrollo. El número teórico de células presentes en el disco imagal en cada etapa se obtuvo por la

interpolación de los tiempos sobre la curva a partir de los datos obtenidos por García Bellido y Dapena (1974). El número de células expuestas en cada etapa, se obtuvo multiplicando el número de alas analizadas por la cantidad de células presentes en el disco imagal en esa etapa del desarrollo. Para estimar el número real de manchas causado por cada agente se restó la frecuencia basal de manchas sencillas (0.29), gemelas (0.08) o totales (0.30) a la obtenida en cada etapa. La frecuencia de manchas en relación al tamaño del blanco se estableció entonces dividiendo el incremento de manchas en cada etapa entre el número de células presentes en el disco imagal en el momento del tratamiento. Para obtener la frecuencia relativa se tomo como referencia a las larvas de 120 h.

4.8 Determinación de la proporción mutación / recombinación

Con la finalidad de determinar el porcentaje de recombinación inducido por cada uno de los diferentes agentes se analizaron las alas de los individuos *mwh* /*TM3*, Ser *Bd*^s. Las manchas sencillas *mwh* producidas en los individuos *mwh/flr*³, pueden ser el resultado de mutación o recombinación, mientras que en los individuos que portan la inversión, se asume que todas las manchas observadas serán el resultado de eventos mutacionales (Frei y Würigler, 1995). El porcentaje de recombinación inducido por cada uno de los agentes, se calculó entonces, obteniendo la relación entre la frecuencia de manchas obtenidas en los organismos que llevan el cromosoma balanceador entre la frecuencia de las manchas producidas en los organismos *mwh/flr*³. Estos cálculos se realizaron empleando las frecuencias determinadas a partir del número de manchas en relación al tamaño del blanco.

4.9 Recombinación en las distintas regiones del cromosoma

Dada la posición en el cromosoma de los dos marcadores utilizados en la prueba de mutación y recombinación somáticas en el ala de *Drosophila*, existen dos posibilidades de recombinación (Figura 3). Si la recombinación ocurre en la región donde se encuentran *flr*³ y el centrómero se formarán células hijas que presentan los dos tipos celulares (mancha gemela) Fig. 3 (a). La

recombinación en la región del cromosoma comprendida entre los marcadores mwh y flr³ produce la formación de dos células hijas una de las cuales es homocigótica para el marcador distal, (mwh) y genera una mancha simple mwh, Fig. 3 (b).

4.9.1 Análisis estadístico

Se aplicó la prueba de Chi² para proporciones, con la finalidad de determinar si existían diferencias significativas en la frecuencia de manchas por ala entre el grupo testigo y los tratados; se utilizó la misma prueba para distinguir diferencias significativas en el número de manchas en 1000 células y la prueba de Chi² mediante tablas de contingencia para comparar la proporción mutación / recombinación y la recombinación en las dos regiones del cromosoma en las distintas etapas.

Progenitores :

mwh / mwh

flr³ / TM3, Ser



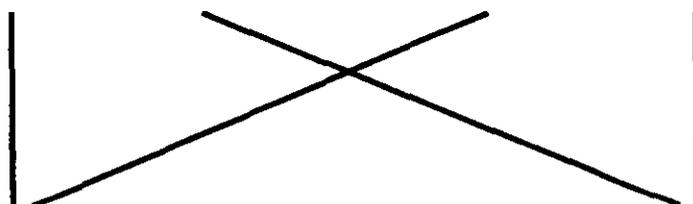
GAMETOS :

mwh

mwh

flr³

TM3, Ser



F₁

a) mwh/ flr³

b) mwh/TM3,Ser

Figura 2. Tipos de descendientes obtenidos de la cruz original.

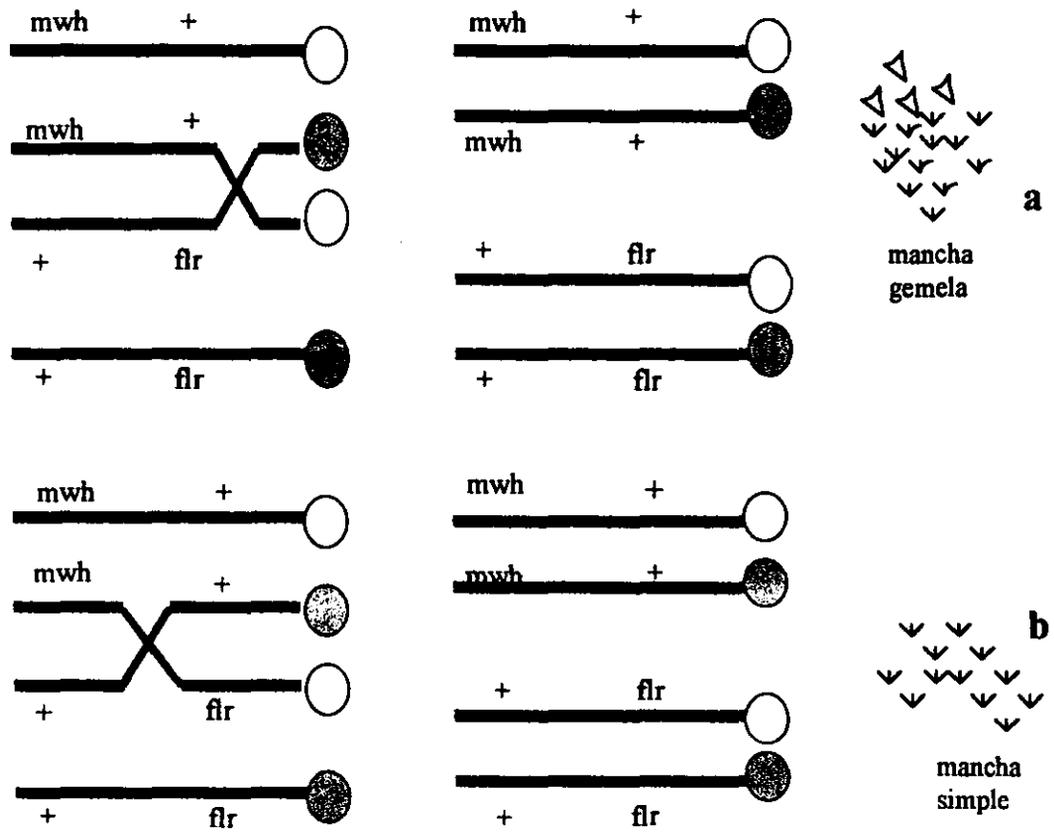


Figura 3. Posibilidades de recombinación en el cromosoma 3 de *D. melanogaster*

5.0 RESULTADOS

Para cada uno de los agentes se construyeron tablas en las que se incluyó el número de manchas sencillas (chicas y grandes), el de manchas gemelas y el total.

Dado que las manchas flr^3 son importantes para calcular la proporción mutación / recombinación, en las tablas las manchas sencillas se separaron en mwh y flr^3 .

Los resultados obtenidos para la frecuencia basal de manchas sencillas gemelas y totales en los individuos $\text{mwh} / \text{flr}^3$, se presentan en la tabla III A y la frecuencia de manchas sencillas observadas en los individuos $\text{mwh}/\text{TM3}$, Ser se muestran en la tabla III B. Estos valores corresponden con lo reportado por otros autores (Würgler y Vogel, 1986; Cruces, 1989; Zimmering y col., 1990).

5.1 Rayos gamma

5.1.1 Frecuencia de manchas por ala.

En la tabla IV, y la figura 4 aparecen el número de manchas simples, gemelas y totales inducidas por 20 Gy de rayos gamma en relación a la edad de las larvas, se aprecia claramente que la cantidad de manchas se incrementó con la etapa de desarrollo. Al aplicar el análisis estadístico en todos los casos la frecuencia de manchas por ala fue significativamente mayor a la encontrada en el grupo testigo, con excepción de las larvas de 24 y 48 h en los individuos $\text{mwh} / \text{TM3}$, Ser.

5.1.2 Número de manchas inducidas en relación al tamaño del blanco

Al analizar las manchas en relación al tamaño del blanco, los resultados, indican que el número de manchas en 1000 células resultó ser inversamente proporcional a la edad de las larvas (Fig. 5 y 6) esto es: las más jóvenes (24 y 48 h) fueron más sensibles ya que en ellas se produjo un mayor número de manchas en 1000 células, mientras que en las etapas tardías, la eficiencia para inducir manchas fue mucho menor (Tabla V). Al aplicar el análisis estadístico, en todos los casos, se

observó que el número de manchas obtenidas en las larvas de 24 h fue significativamente mayor con respecto a las otras edades ($p < 0.001$).

Como ya se mencionó, la frecuencia de manchas obtenidas en las larvas de 120 h, se tomó como referencia para determinar la frecuencia relativa y se observó que en las larvas mwh/flr³ de 24 h se indujeron 34.32 veces más manchas totales que en las de 120 h (Tabla V C). En los individuos, mwh/TM3; Ser (Tabla VI), no se observó un incremento en las larvas de 24 y 48 h, pero en las de 72 se produjeron 5.17 veces más manchas con respecto a las de 120.

5.1.3 Proporción Mutación/ Recombinación

Una vez obtenida la frecuencia de manchas en 1000 células tanto en los individuos mwh/flr³, como en los mwh/TM3, Ser, se procedió a determinar que proporción de estas fueron inducidas ya sea por mutación o recombinación. Para realizar este cálculo, se descartaron las manchas simples flr³, en los individuos mwh/flr³. El número de manchas mwh se presenta en la parte D de la tabla V.

La proporción mutación/recombinación provocada por los rayos gamma en las diferentes etapas, se obtuvo dividiendo la frecuencias de manchas mwh de los individuos mwh/flr³, (tabla V D) entre la de los organismos mwh/TM3, Ser. Esta proporción se presenta en la tabla VII y la figura 7.

El porcentaje de recombinación se modificó en relación a la etapa de desarrollo (Fig. 7) en las larvas de 24 y 48 h, el 100 % de las manchas observadas fueron el resultado de recombinación, mientras que el valor mas bajo correspondió las larvas de 120 h (79.26 %). Al aplicar el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas ($p < 0.01$) en la proporción de recombinación en las larvas de 24 y 48 h con respecto a las otras etapas.

5.1.4 Recombinación inducida en las diferentes regiones del cromosoma

Una vez establecido el porcentaje de recombinación para cada una de las etapas de desarrollo, se procedió a determinar en qué región del cromosoma había ocurrido el intercambio partiendo de la base que las manchas simples mwh se generan por la recombinación en la región del cromosoma comprendida entre mwh y flr³, mientras que las manchas gemelas indican que la recombinación se llevó a cabo en el segmento delimitado por flr³ y el centrómero, los resultados se presentan en la tabla VIII y en la figura 8. En las larvas de 24 y 48 h el 100 % de la recombinación se llevó a cabo en la región mwh-flr³, sin embargo el porcentaje de recombinación en la región flr³-centrómero, se elevó de 22.25% en las larvas de 72 h hasta 36.8% en las de 120 h, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.001$) en estas etapas en relación las etapas tempranas.

5.1.5 Distribución del tamaño de las manchas

Las manchas se agruparon de acuerdo al número de células que presentaban. Los intervalos en que se dividieron fueron los establecidos por Graf y col. (1984). La distribución del tamaño de las manchas sencillas y gemelas, se muestran en las figuras 9 y 10 respectivamente, se aprecia que a medida que se incrementa la edad de los individuos se observaron más manchas de 1 y 2 células aunque aún en las etapas más tardías se encontraron manchas grandes. Con relación a las manchas gemelas, en la figura 10 se nota que en las etapas en las que se indujeron este tipo de manchas se aprecia una distribución de tipo normal.

5.2 EMS

5.2.1 Frecuencia de manchas por ala

Se realizó el mismo procedimiento para los resultados obtenidos con el EMS. La tabla IX, secciones A y B corresponde al número de manchas inducidas por el tratamiento agudo con EMS (46.1 mM). La figura 11 presenta la frecuencia de manchas por ala en las distintas etapas de

desarrollo. Al aplicar el análisis estadístico en todos los casos se encontraron diferencias significativas con respecto al grupo testigo.

5.2.2 Número de manchas inducidas en relación al tamaño del blanco

Al analizar, las manchas considerando el tamaño del blanco, la relación es entonces inversamente proporcional (Figuras 12 y 13).

Debido al tratamiento con EMS, se observaron manchas gemelas en todos los estadios larvarios (Figura 13) la mayor cantidad se produjo en las larvas de 24 h. En cuanto a la frecuencia relativa de manchas, en las larvas de 24 h se indujeron 134.97 veces más manchas totales que en las de 120 h (Tabla X C). Al igual que con los rayos gamma, al aplicar el análisis estadístico, en todos los casos la cantidad de manchas totales en 1000 células fue significativamente mayor en las etapas tempranas con respecto a las tardías ($p < 0.0001$).

5.2.3 Proporción mutación / recombinación

La proporción de manchas debidas a mutación o a recombinación se obtuvo siguiendo el mismo procedimiento descrito para los rayos gamma, los resultados se presentan en la tabla XII y en la figura 14. Esta proporción se modificó en las diferentes etapas larvarias, se observaron diferencias significativas ($p < 0.5$) entre las larvas de 24 y 48 h con respecto al resto de los individuos ya que presentaron los porcentajes de recombinación mas alto (68.06) y más bajo (45.5) respectivamente (Tabla XII).

5.2.4 Recombinación inducida en las diferentes regiones del cromosoma

La recombinación inducida en la región flr^3 -centrómero, se incrementó consistentemente con respecto a la edad, los datos aparecen en la tabla XIII. En la figura 15 se aprecia claramente la tendencia, en las larvas de 24 h la proporción de recombinación en esa región del cromosoma fue de 13.08 % y en las de 120 h fue 39.04 %. Se encontraron diferencias significativas a partir de las larvas de 72 h.

5.2.5 Distribución del tamaño de las manchas

En las figuras 16 y 17 se presenta la distribución del tamaño de las manchas sencillas y gemelas respectivamente. Se observó que el tamaño de las manchas sencillas decreció con la edad, pero al igual que con los rayos gamma, aun en las larvas de 120 h se obtuvieron manchas grandes. En cuanto a las manchas gemelas se observó nuevamente una distribución normal.

5.3 MMS

5.3.1 Frecuencia de manchas por ala

En las tablas XIV A y B se muestra el número de manchas inducidas por el tratamiento agudo con MMS 12 mM, en los individuos mwh/flr³, y mwh /TM3, Ser. La frecuencia de manchas se incrementó con la edad de los individuos. Estos datos se observan más claramente en la figura 18. Cabe mencionar que en las larvas de 24 h, no se produjeron manchas gemelas.

5.3.2 Número de manchas inducidas en relación al tamaño del blanco

En la tabla XV incisos A, B, C y D y en las figuras 19 y 20, se muestran los datos del número de manchas en relación al tamaño del blanco.

Las manchas totales en 1000 células decrecieron con el tamaño del blanco celular, en las larvas de 24 h por ejemplo, se produjeron casi 119 veces mas manchas que en las de 120 h. Se encontraron diferencias significativas a partir de las larvas de 72 h. (Tabla XV C).

En la tabla XVI se presenta la frecuencia de manchas en 1000 células en los individuos mwh / TM3, Ser la tendencia de los resultados fue el mismo que para los mwh / flr³.

5.3.3 Proporción mutación / recombinación

La tabla XVII y la figura 21, muestran la proporción mutación recombinación inducida por MMS, ésta se modificó entre las diferentes etapas, se encontraron diferencias significativas entre

porcentaje el más alto que correspondió a las larvas de 120 h (59.94) y los más bajos (43.27 y 43.66) correspondientes a los organismos de 48 y 72 h respectivamente.

5.3.4 Recombinación inducida en las diferentes regiones del cromosoma

La recombinación inducida por MMS en la región del cromosoma entre la que se encuentran los marcadores flr^3 y el centrómero se incrementó en relación con la etapa de desarrollo, estos datos se presentan en la tabla XVIII y en la figura 22. En larvas de 24 h el total de la recombinación se llevó a cabo en la región comprendida entre mwh y flr^3 , mientras que en las larvas de 120 h correspondió al 34.72 del total de la recombinación, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.001$) entre las larvas de 24 h y el resto de las etapas.

5.3.5 Distribución del tamaño de las manchas

Las manchas fueron clasificadas según su tamaño de acuerdo a los intervalos que fueron descritos anteriormente. La distribución del tamaño de las manchas sencillas se presenta en la figura 23, en esta se puede apreciar que la frecuencia de las manchas de una y dos células, se incrementó en relación directa con la edad, sin embargo en las etapas tardías se observan también manchas grandes. En la figura 24, se puede apreciar que el comportamiento de las manchas gemelas sigue una distribución normal.

TABLA III FECUENCIA BASAL DE MANCHAS EN EL ENSAYO DEL ALA

A) mwh-flr³

Edad	No. Alas	Chicas		Grandes		Simples		Sencillas Totales		Gemelas		Totales					
		mwh	flr	mwh	flr	mwh	Flr	%	#	%	#	%	#				
		%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#				
24	80	0.22	(18)	0	0.08	(7)	0	0.31	(25)	0	0.31	(25)	0.01	(1)	0.32	(26)	
48	100	0.16	(16)	0	0.05	(5)	0.01	(1)	0.22	(22)	0.01	(1)	0.23	(23)	0	0.23	(23)
72	100	0.29	(29)	0	0.06	(7)	0	0.36	(36)	0	0.36	(36)	0.01	(1)	0.37	(37)	
96	106	0.22	(24)	0	0.03	(4)	0	0.26	(28)	0	0.26	(28)	0.009	(1)	0.27	(29)	
120	120	0.20	(25)	0	0.06	(8)	0	0.27	(33)	0	0.27	(33)	0.016	(2)	0.29	(35)	
Total	506	0.22	(112)	0	0.06	(33)	0	0.28	(145)	0	0.28	(145)	0.009	(5)	0.31	(150)	

B) mwh- TM3, Ser

Edad	No. Alas	Chicas		Grandes		Simples		Total		Gemelas		Totales	
		mwh	flr	mwh	flr	mwh	flr	%	#	%	#	%	#
		%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#
24	60	0.29	(7)	0	0	0	0	0.29	(7)	0	0.29	(7)	
48	60	0.23	(9)	0	0	0	0	0.23	(9)	0	0.23	(9)	
72	60	0.22	(9)	0	0	0	0	0.22	(9)	0	0.22	(9)	
96	60	0.25	(16)	0	0	0	0	0.25	(16)	0	0.25	(16)	
120	60	0.15	(6)	0	0	0	0	0.15	(6)	0	0.15	(6)	
Total	206	0.22	(47)	0	0	0	0	0.22	(47)	0	0.22	(47)	

TABLA IV NUMERO DE MANCHAS INDUCIDAS POR 20 GY DE RAYOS GAMMA

A) mwh-flr³

Edad	No. Alas	Chicas				Grandes				Simples				Total		Gemelas		Totales	
		mwh		flr		mwh		flr		mwh		flr		%	#	%	#	%	#
		%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#
24	110	0.37	(41)	0		31	.28	0.009	(1)	0.65	(72)	0.009	(1)	0.66	(73)***	0	n.s	0.66	(73) ***
48	120	0.35	(42)	0		66	0.55	0.008	(1)	0.90	(108)	0.008	(1)	0.92	(110) ***	0	n.s	0.92	(110) ***
72	120	0.55	(66)	0		206	1.72	0.120	(14)	2.26	(272)	0.12	(14)	2.38	(286) ***	0.59	(71) ***	2.97	(357) ***
96	82	2.26	(186)	0.061	(5)	274	3.34	0.31	(26)	5.61	(460)	0.37	(31)	5.98	(491) ***	2.37	(195) ***	8.36	(686) ***
120	68	4.90	(333)	0.089	(6)	272	4.00	0.38	(26)	8.90	(605)	0.47	(32)	9.36	(637) ***	3.85	(262) ***	13.2	(899) ***

B) mwh- TM3, Ser.

Edad	No. Alas	Chicas				Grandes				Simples Chicas				Total		Gemelas		Totales	
		mwh		flr		mwh		flr		mwh		flr		%	#	%	#	%	#
		%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#
24	60	0.125	(8)	0		0	0	0.125	(8)	0		0.125	(8)	0		0.125	(8)	n.s	
48	60	0.20	(12)	0		0	0	0.20	(12)	0		0.20	(12)	0		0.20	(12)	***	
72	60	0.48	(29)	0		0	0	0.48	(29)	0		0.48	(29)	0		0.48	(29)	***	
96	60	1.0	(60)	0		0.45	(27)	0		1.0	(60)	0		1.45	(87)	0		1.45	(87) ***
120	60	1.86	(112)	0		0.93	(56)	0		1.86	(112)	0		2.80	(168)	0		2.80	(168) ***

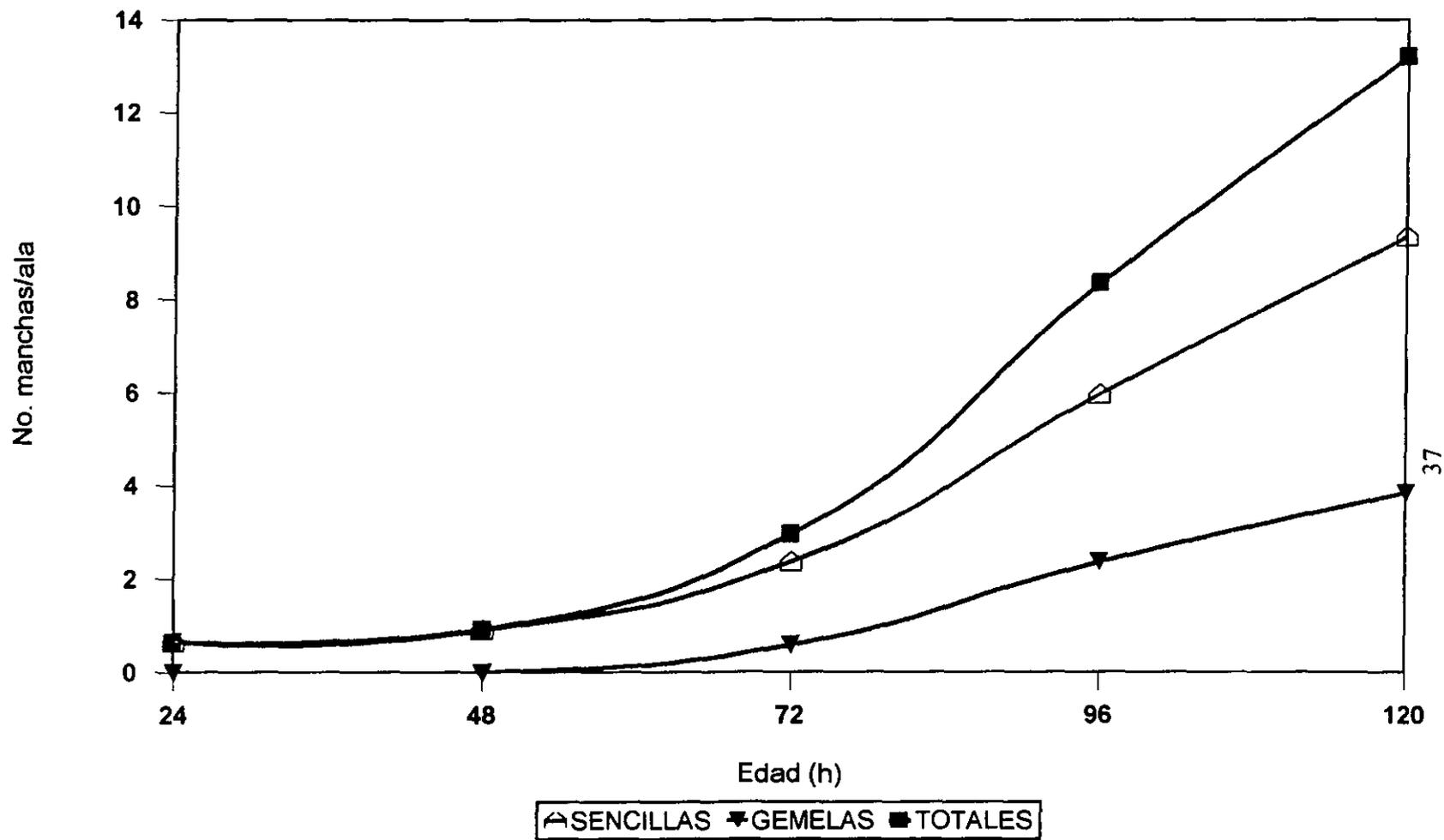


FIG. 4. Frecuencia de manchas por ala inducidas por Rayos Gamma

**TABLA V NUMERO DE MANCHAS INDUCIDAS POR RAYOS GAMMA EN
RELACION AL TAMAÑO DEL BLANCO EN INDIVIDUOS mwh /flr³**

A		Sencillas					
Edad	N	C	NC	Δm	m/C	m/1000	FR
24	110	21	2310	42	0.018	18.18	48.89
48	120	67	8040	76	0.009	9.45	25.41
72	120	487	58440	252	0.004	4.31***	11.59
96	82	3492	286344	467	0.001	1.63***	4.38
120	68	24400	1659200	617	0.0003719	0.371***	1

B		Gemelas					
Edad	N	C	NC	Δm	m/C	m/1000	FR
24	110	21	2310	0	0	0	0
48	120	67	8040	0	0	0	0
72	120	487	58440	70	0.0011	1.19	7.61
96	82	3492	286344	193	0.0006	0.67***	4.28
120	68	24400	1659200	261	0.0001	0.15***	1

C		Totales					
Edad	N	C	NC	Δm	m/C	m/1000	FR
24	110	21	2310	42	0.018	18.18	34.32
48	120	67	8040	74	0.009	9.45	17.83
72	120	487	58440	321	0.008	5.49***	10.36
96	82	3492	286344	661	0.002	2.30***	4.35
120	68	24400	1659200	879	0.0005	0.52***	1

D		mwh					
Edad	N	C	NC	Δm	m/C	m/1000	FR
24	110	21	24400	39	0.016	16.88	33.07
48	120	67	21	73	0.0090	9.07	17.78
72	120	487	67	307	0.0052	5.25***	10.29
96	82	3492	286344	630	0.0022	2.20***	4.30
120	68	24400	1659200	847	0.0005	0.510***	1

N= número de alas C= número de células Δ = incremento de manchas

m/C= manchas por célula m/1000= manchas en 1000 células FR= frecuencia relativa

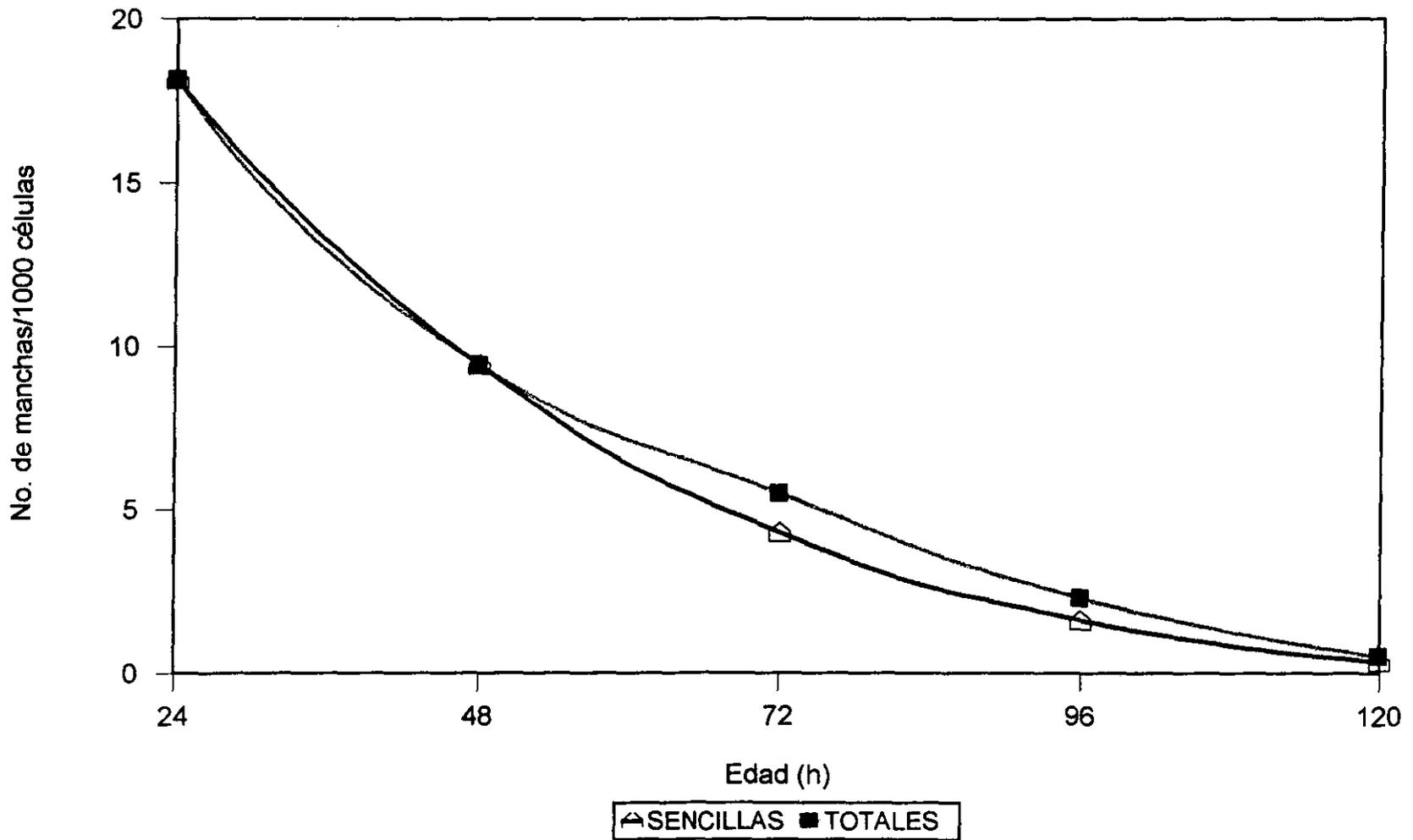


FIG. 5. Número de manchas sencillas y totales inducidas por rayos gamma en 1000 células

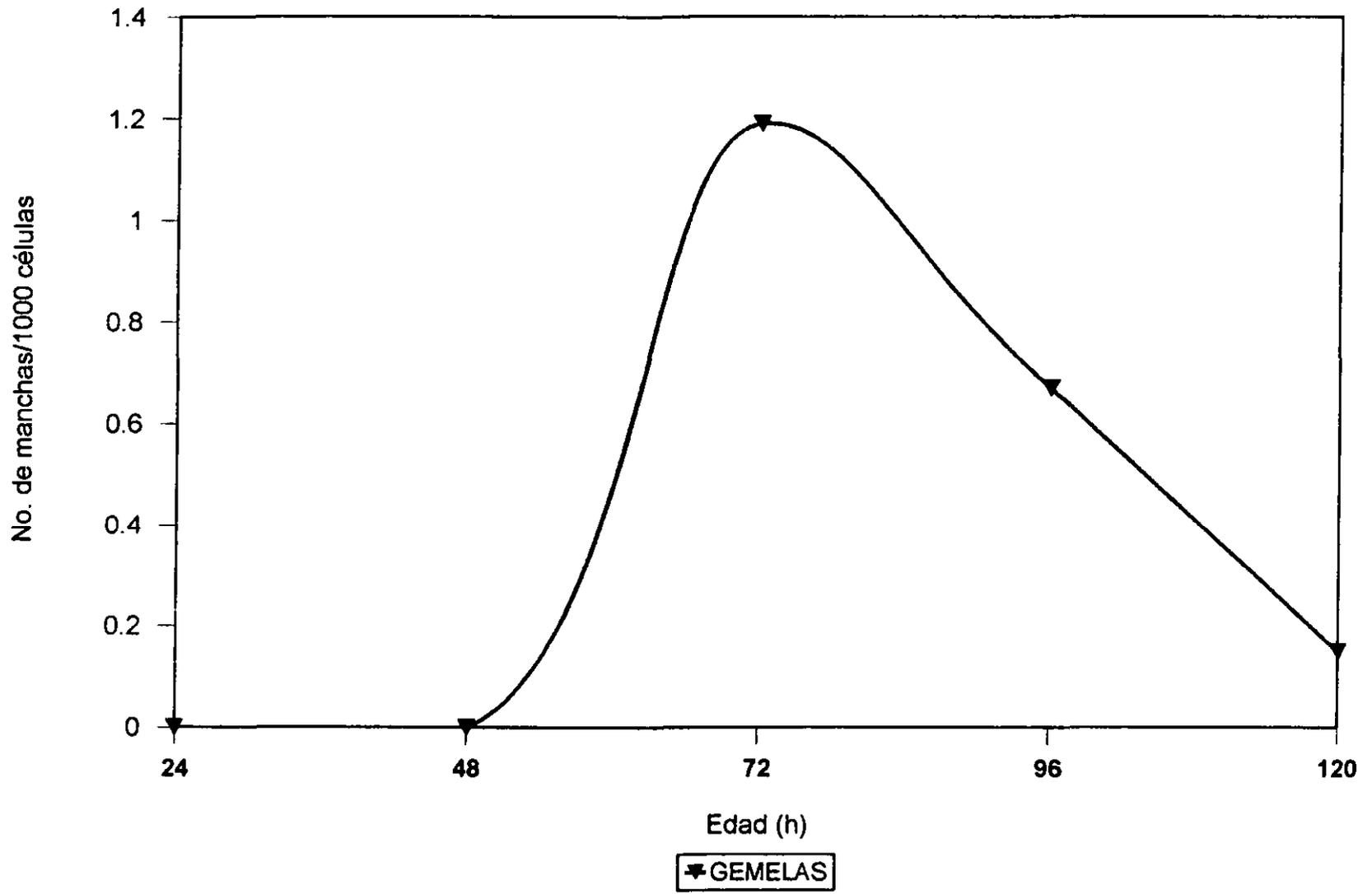


FIG. 6. Número de manchas gemelas inducidas por rayos gamma en 1000 células

TABLA VI NUMERO DE MANCHAS INDUCIDAS POR RAYOS GAMMA EN RELACION AL TAMAÑO DEL BLANCO EN INDIVIDUOS mwh /TM3, Ser.

Edad	N	C	NC	Δm	m/C	m/1000	FR
24	60	21	1260	0	0	0	0
48	60	67	4020	0	0	0	0
72	60	487	29220	16	0.0005476	0.5475 ***	5.1718893
96	60	3492	209520	74	0.0003532	0.3531***	3.3359204
120	60	24400	1464000	155	0.0001059	0.1058***	1

TABLA VII PROPORCION MUTACION RECOMBINACION INDUCIDA POR RAYOS GAMMA

Edad	Mutación	Recombinación
Testigo	76.96	23.04
24	0.00	100.00
48	0.00	100.00 n.s.
72	10.42	89.58 **
96	16.05	83.95 ***
120	10.73	79.26 ***

TABLA VIII PROPORCION DE RECOMBINACION EN LAS DIFERENTES REGIONES DEL CROMOSOMA

Edad	mwh-flr ³	flr ³ -centrómero
Testigo	86.85	13.15
24	100	0***
48	100	0***
72	77.75	22.25***
96	66.15	33.85***
120	63.20	36.80***

* p < 0.01

** p < 0.001

*** p < 0.001

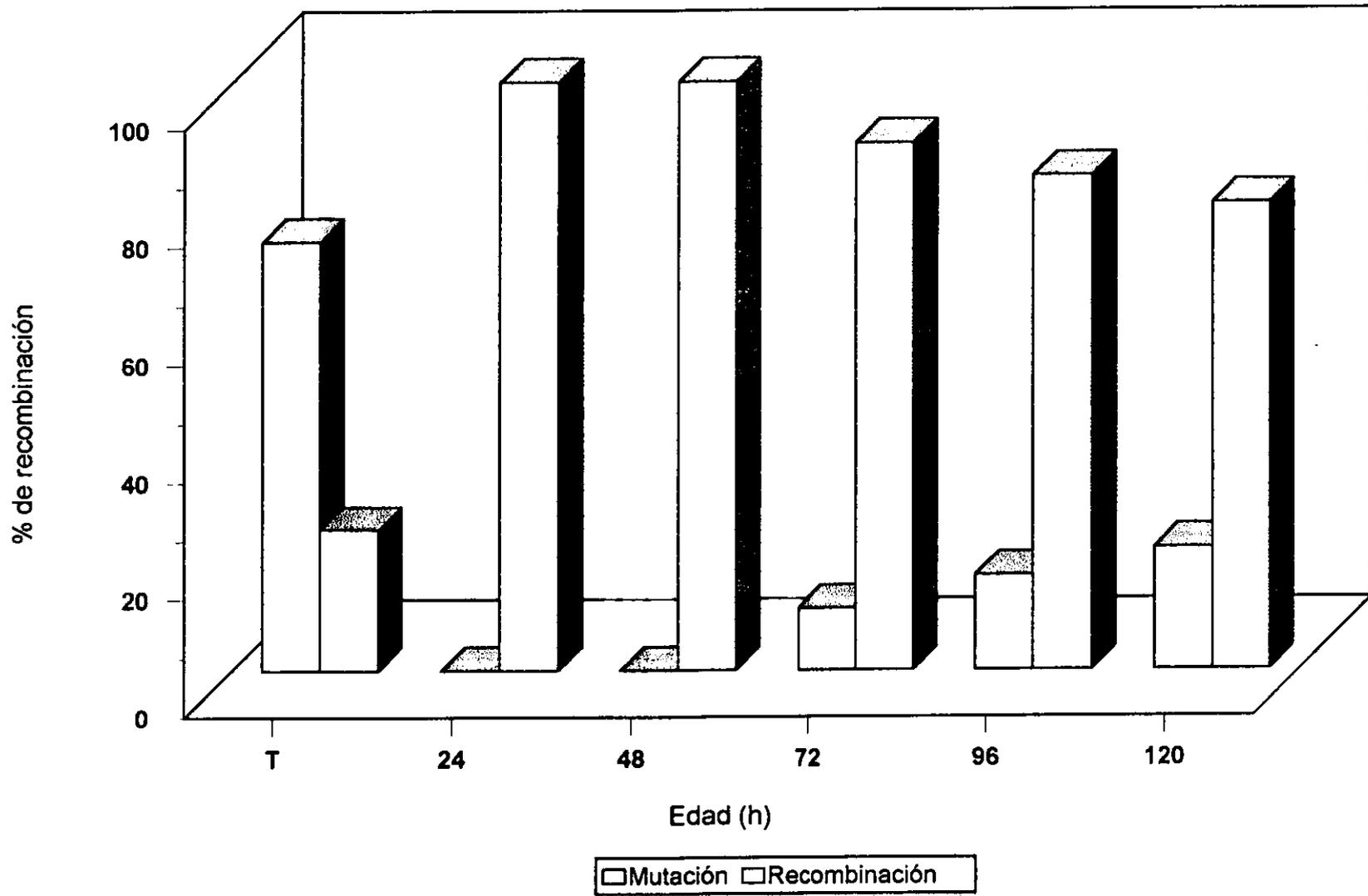


Fig.7. Proporción Mutación / Recombinación
Rayos Gamma



FIG. 8. Proporción de la recombinación en las diferentes regiones del cromosoma Rayos Gamma

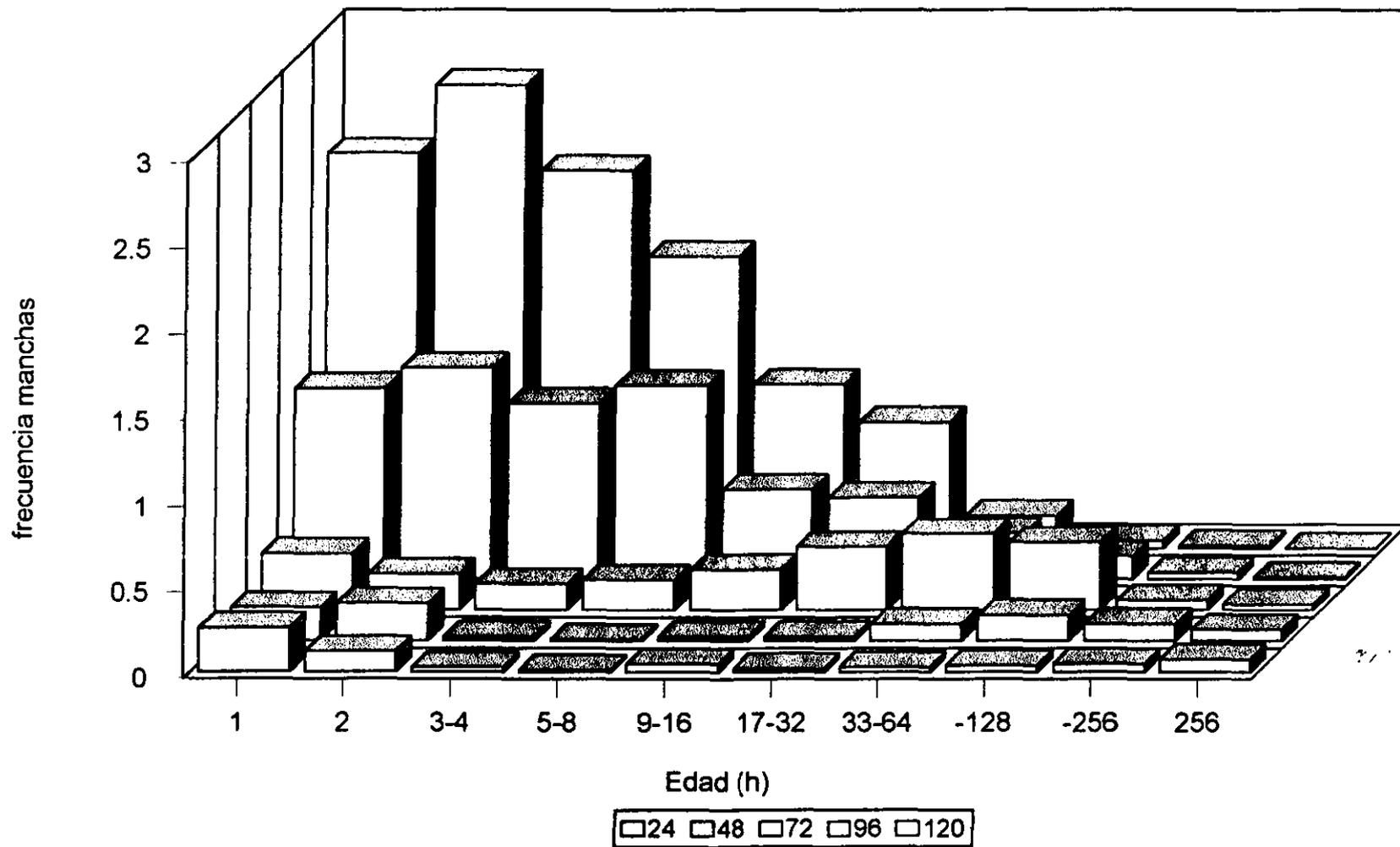


Fig. 9. Distribución del tamaño de las manchas sencillas Rayos Gamma

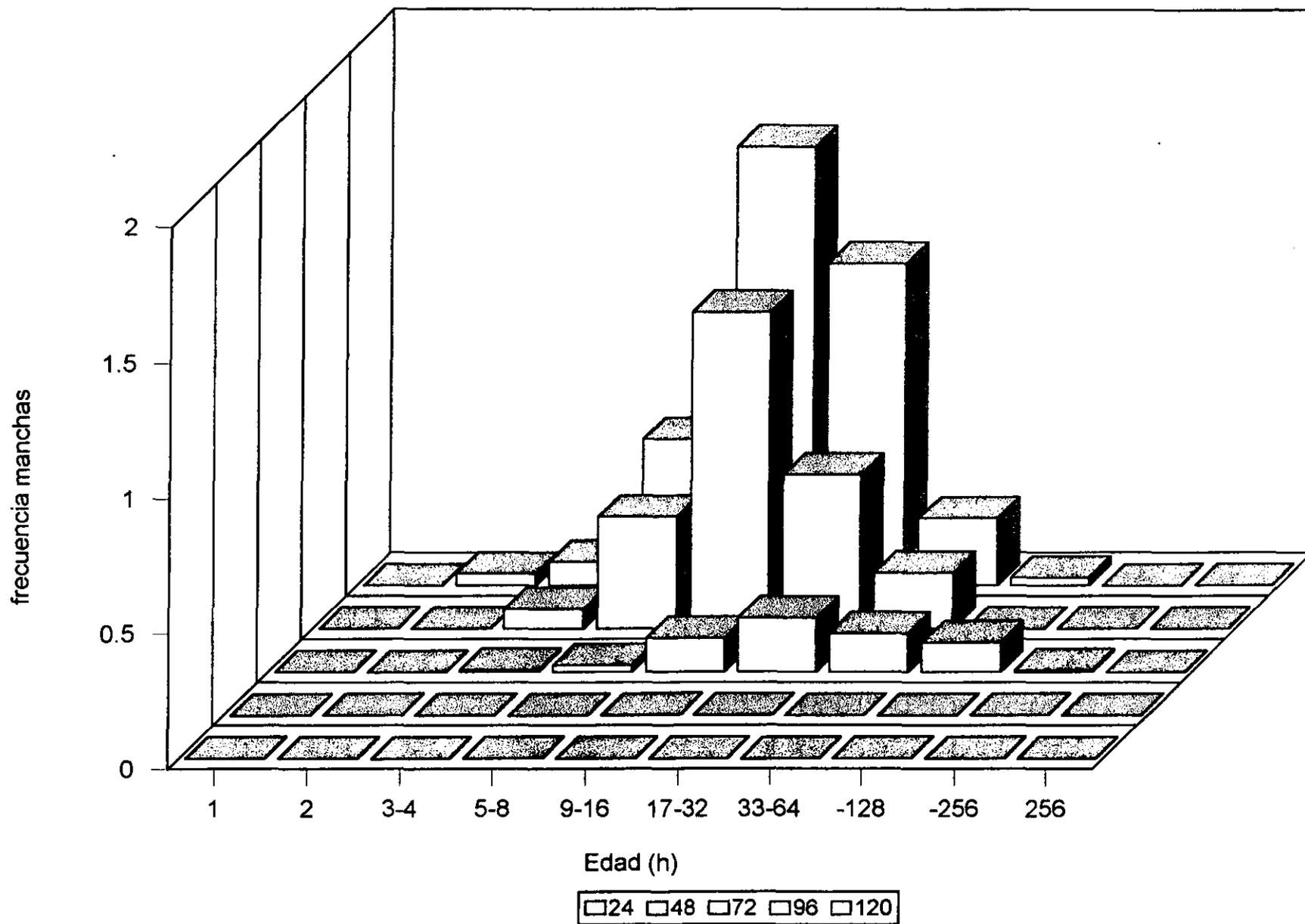


Fig. 10. Distribución del tamaño de las manchas gemelas Rayos Gamma

TABLA IX NUMERO DE MANCHAS INDUCIDAS POR EL EMS

(46.1 Mn x 6 h)

A) mwh / flr³

Edad	No. Alas	Chicas				Grandes				Simples				Simples Totales		Gemelas		Totales	
		mwh		flr		mwh		flr		mwh		flr		%	#	%	#	%	#
		%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#
24	110	0.53	(58)	0		0.43	(48)	0.24	(27)	0.96	(106)	0.24	(27)	1.21	(133)***	0.11	(13)***	1.32	(146)***
48	120	0.57	(68)	0.008	(1)	1.02	(122)	0.50	(60)	1.58	(190)	0.51	(61)	2.09	(251)***	0.16	(20)***	2.25	(271)***
72	80	0.91	(73)	0.012	(1)	1.53	(123)	0.55	(44)	2.45	(196)	0.56	(45)	3.05	(241)***	0.47	(38)***	3.48	(279)***
96	120	1.85	(222)	0.16	(20)	1.80	(216)	1.18	(141)	3.65	(438)	1.34	(161)	4.99	(599)***	1.5	(180)***	6.40	(779)***
120	70	2.05	(144)	0.28	(20)	2.71	(190)	1.90	(133)	4.77	(334)	2.18	(153)	6.95	(487)***	2.18	(153)***	9.14	(640)***

B) mwh/TM3, Ser

Edad	No. Alas	Chicas				Grandes				Simples				Total		Gemelas		Totales	
		mwh		flr		mwh		flr		mwh		flr		%	#	%	#	%	#
		%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#
24	82	0.25	(21)	0		0.20	(17)	0		0.25		0		0.46	(38)	0		0.46	(38)***
48	70	0.40	(33)	0		0.52	(37)	0		0.40		0		1.00	(70)	0		1.00	(70)***
72	36	0.78	(28)	0		0.44	(16)	0		0.78		0		1.22	(44)	0		1.22	(44)***
96	40	1.30	(52)	0		1.12	(45)	0		1.30		0		2.42	(92)	0		2.42	(92)***
120	40	1.15	(46)	0		1.60	(64)	0		1.15		0		2.80	(110)	0		2.80	(110)***

* p < 0.01

** p < 0.001

*** p < 0.001

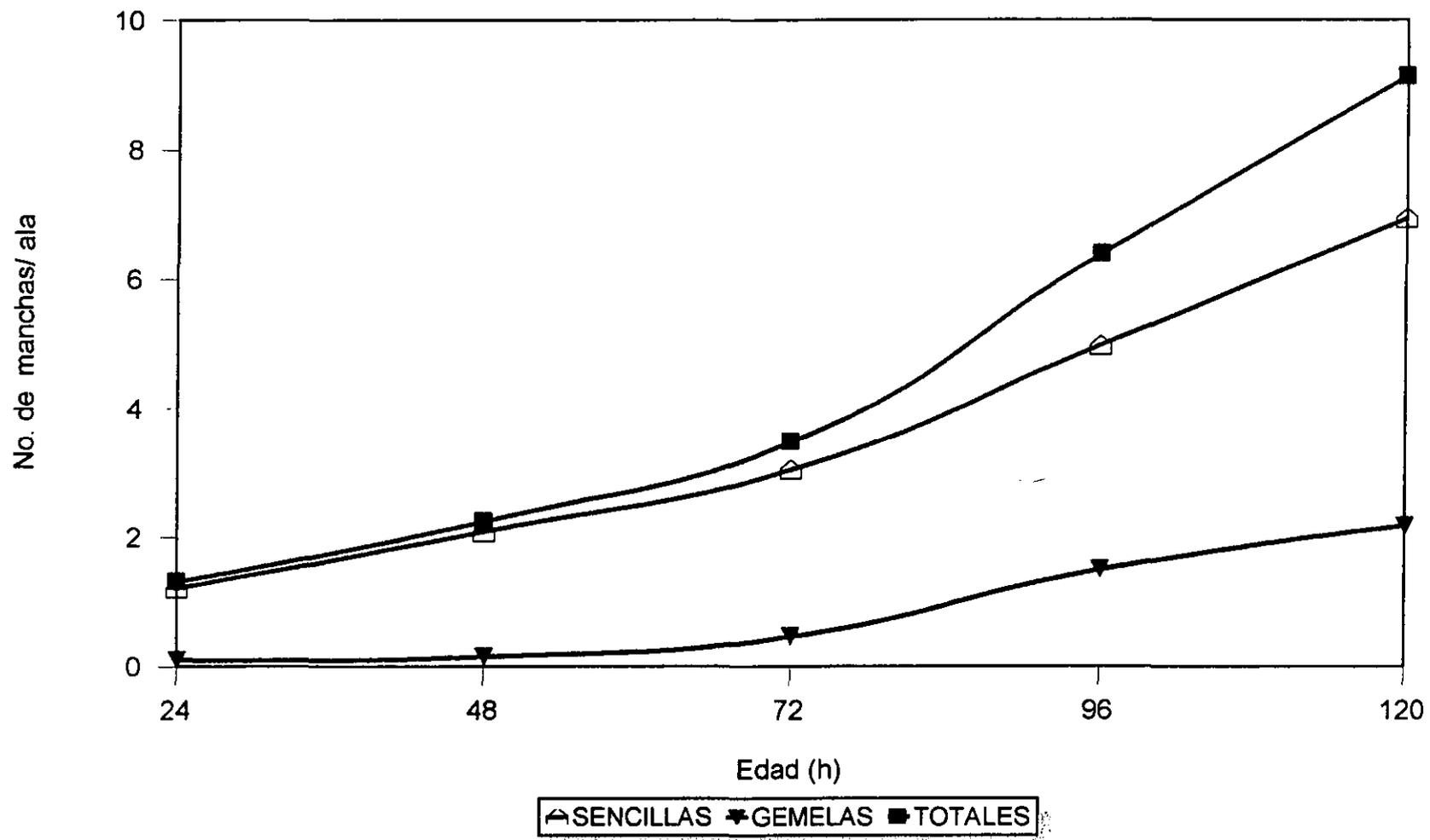


Fig. 11. Frecuencia de manchas por ala inducidas por EMS

**TABLA X NUMERO DE MANCHAS INDUCIDAS POR EMS EN RELACION AL
TAMAÑO DEL BLANCO EN INDIVIDUOS $mwh / \mu r^3$**

A							
			Sencillas				
Edad	N	C	NC	Δm	m/C	m/1000	FR
24	110	21	2310	102	0.044	44.15*	161.49
48	120	67	8040	217	0.027	27.00***	98.71
72	80	487	38960	221	0.0056	5.67***	20.74
96	120	3492	419040	565	0.0013	1.34***	4.93
120	70	24400	1708000	467	0.002	0.27***	1

B							
			Gemelas				
Edad	N	C	NC	Δm	m/C	m/1000	FR
24	110	21	2310	5	0.004	4.76	53.50
48	120	67	8040	11	0.0022	2.23**	25.15
72	80	487	38960	37	0.0094	0.94***	10.67
96	120	3492	419040	179	0.0004	0.42***	4.8
120	70	24400	1708000	152	0.00008	0.088***	1

C							
			Totales				
Edad	N	C	NC	Δm	m/C	m/1000	FR
24	110	21	2310	113	0.048	48.91	134.97
48	120	67	8040	235	0.029	29.22 *	80.65
72	80	487	38960	258	0.0066	6.622***	18.27
96	120	3492	419040	744	0.0017	1.77***	4.899
120	70	24400	1708000	619	0.00036	0.36***	1

D							
			mwh				
Edad	N	C	NC	Δm	m/C	m/1000	FR
24	110	21	2310	84	0.036	36.36	132.14
48	120	67	8040	173	0.02	21.51	78.19
72	80	487	38960	214	0.005	5.49	19.96
96	120	3492	419040	580	0.001	1.38	5.02
120	70	24400	1708000	465	0.0002	0.27	0.98

N= número de alas C= número de células Δ = incremento de manchas

m/C= manchas por célula m/1000= manchas en 1000 células FR= frecuencia relativa

* $p < 0.01$ ** $p < 0.00$ *** $p < 0.001$

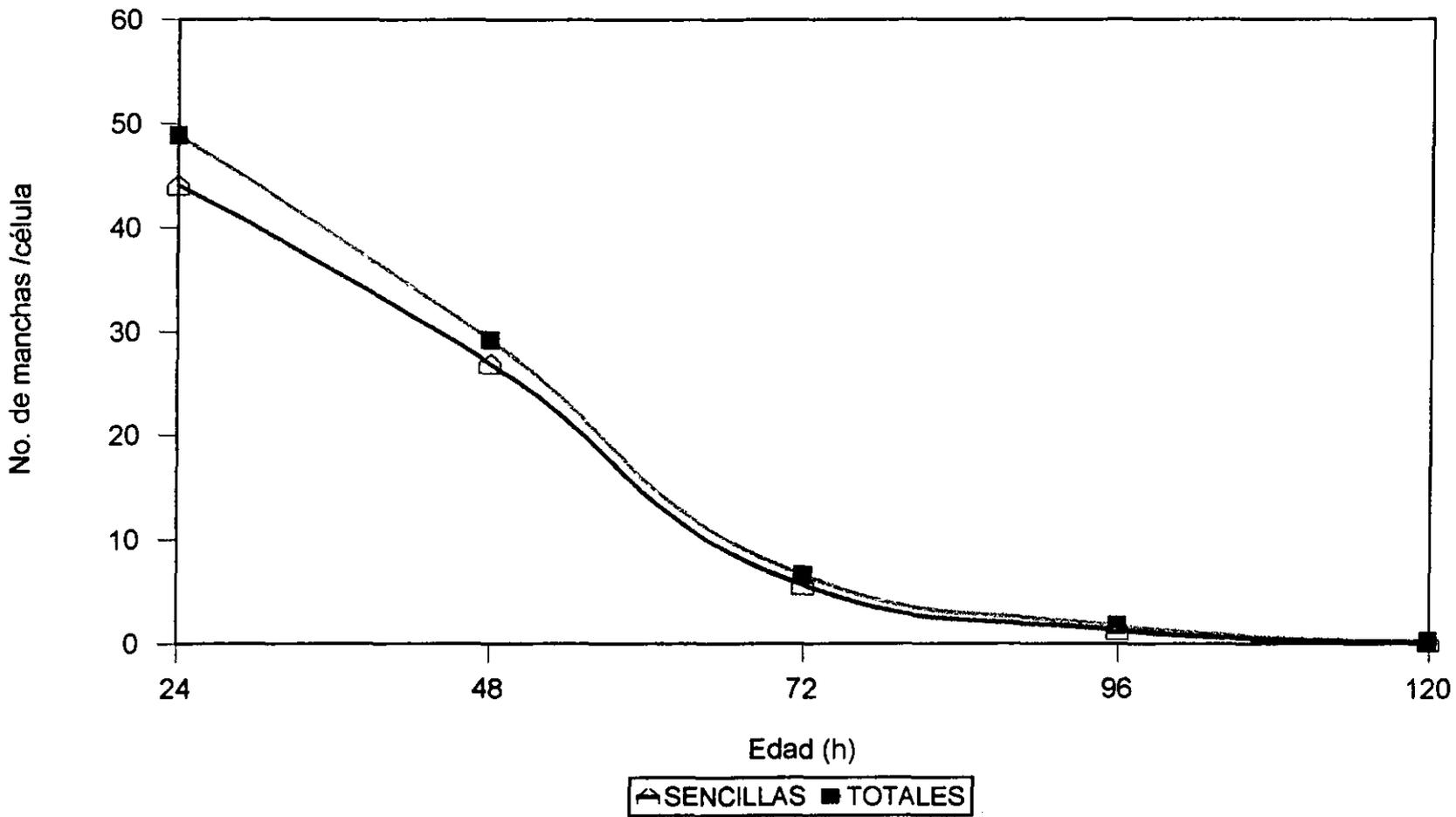


Fig. 12. Número de manchas sencillas inducidas por EMS en 1000 células

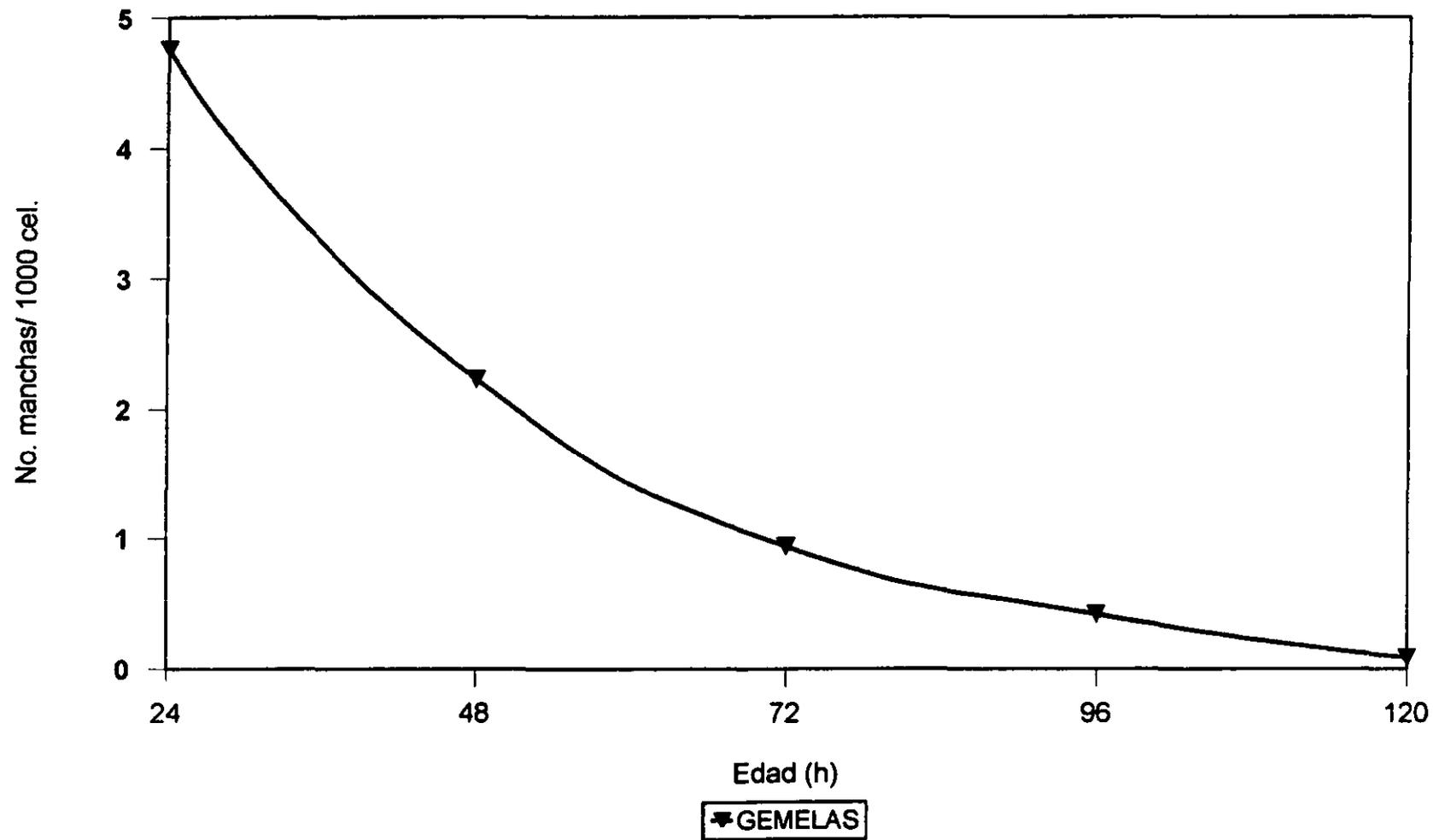


Fig.13. Número de manchas gemelas inducidas por EMS en 1000 células

TABLA XI NUMERO DE MANCHAS INDUCIDAS POR EMS EN RELACION AL TAMAÑO DEL BLANCO EN INDIVIDUOS mwh /TM3, Ser

Edad	N	C	NC	Δm	m/C	m/1000	FR
24	82	21	1722	20	0.011	11.61	110.1
48	70	67	4690	55	0.01172	11.72	111.12
72	36	487	17532	36	0.002	2.05**	19.45***
96	40	3492	139680	88	0.0006	0.63***	5.96***
120	40	24400	976000	103	0.0001	0.105***	1***

TABLA XII. PROPORCION MUTACION RECOMBINACION INDUCIDA POR EMS

Edad	Mutación	Recombinación
Testigo	76.96	23.04
24	31.93	68.06 ^a
48	54.55	45.49 *
72	37.38	62.61 ^a
96	45.51	54.48 *
120	38.76	61.23 ^a

*significativo respecto a las larvas de 24 h

^a significativo respecto a las larvas de 48 h

TABLA XIII PROPORCION DE RECOMBINACION EN LAS DIFERENTES REGIONES DEL CROMOSOMA

Edad	mwh- flr ³	flr ³ - centrómero
Testigo	86.85	13.15
24	87.62	13.08
48	88.50	16.22
72	78.00	21.75
96	65.61	42.41 ***
120	63.98	39.04 ***

* $p < 0.01$ ** $p < 0.00$ *** $p < 0.001$

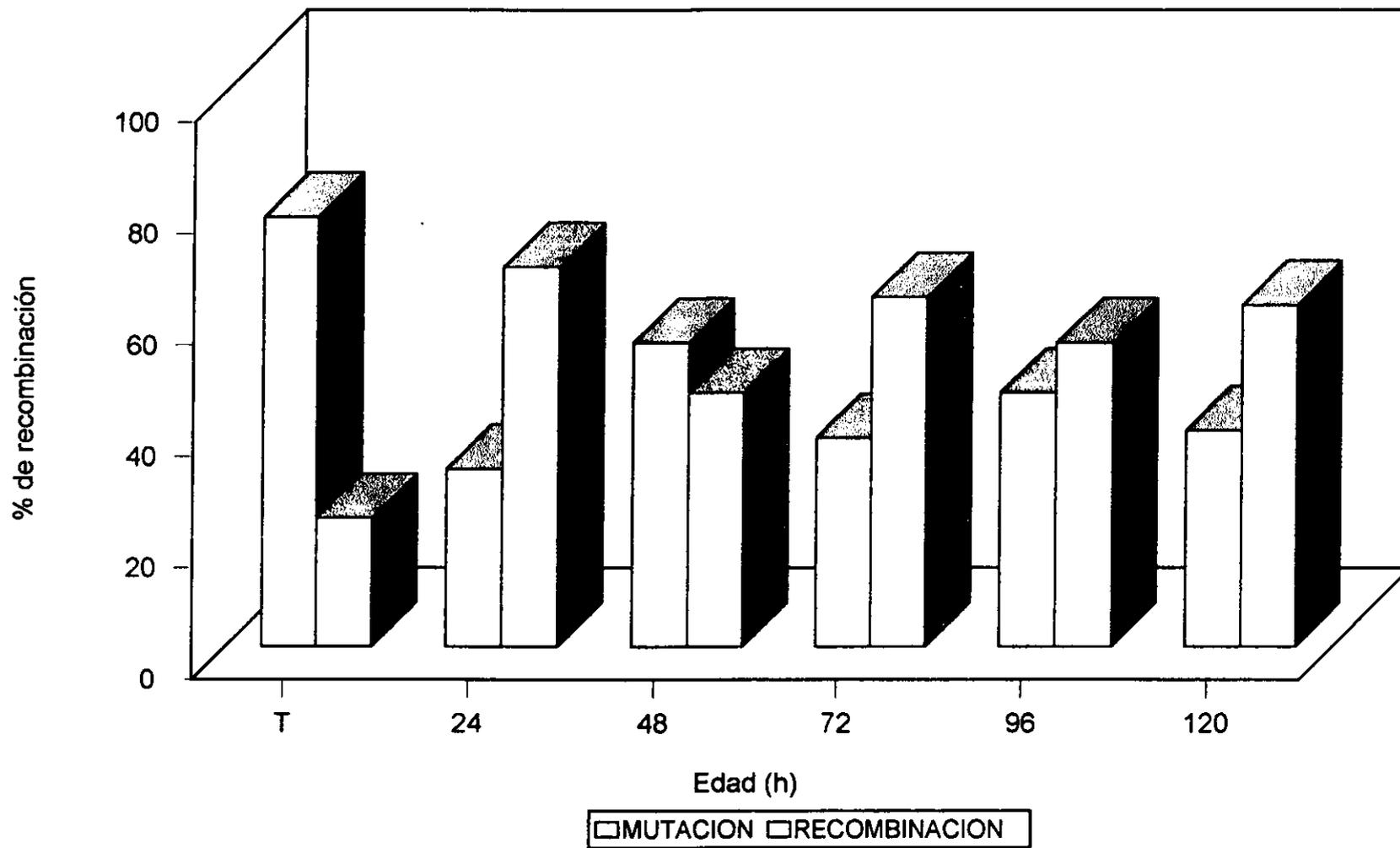


Fig. 14. Proporción Mutación / Recombinación EMS

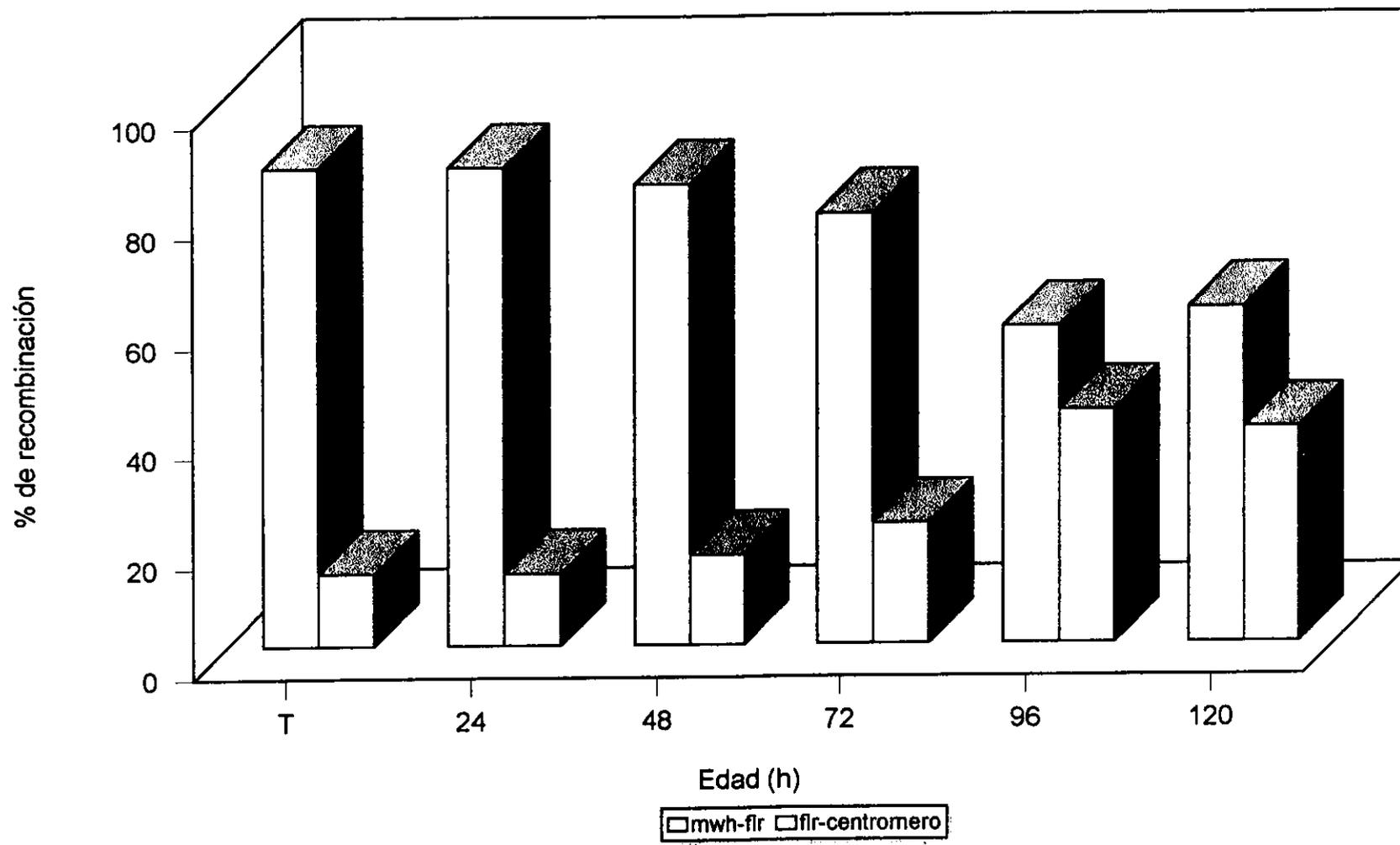


FIG.15. Proporción de la recombinación en las diferentes regiones del cromosoma EMS

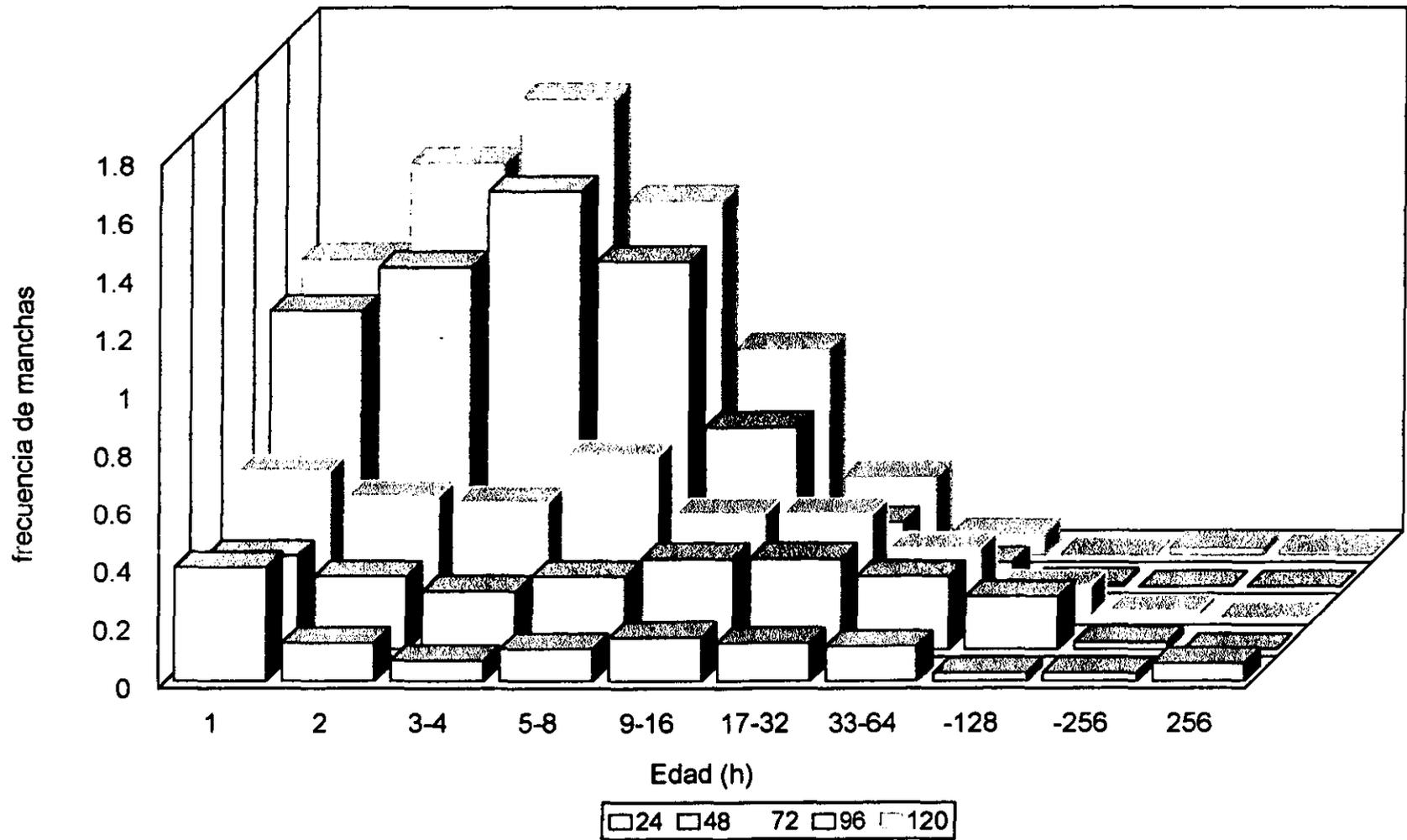


Fig.16. Distribución del tamaño de las manchas sencillas EMS

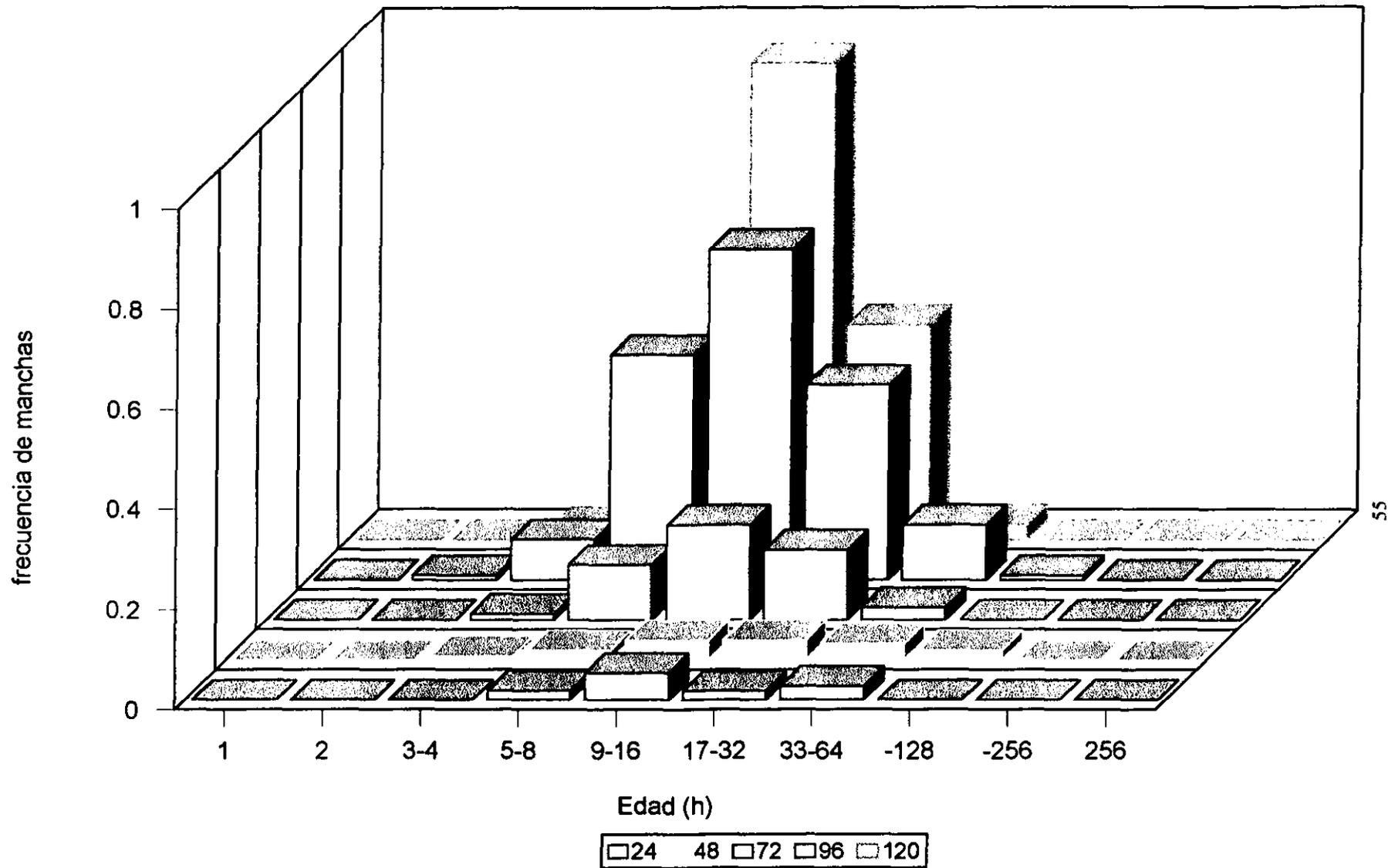


Fig. 17. Distribución del tamaño de las manchas gemelas EMS

**TABLA XIV. NUMERO DE MANCHAS INDUCIDAS POR EWL TRATAMIENTO AGUDO CON
MMS (12MMX 6 h)**

A) mwh - flr³

Edad	No. Alas	Chicas				Grandes				Simples				Simples Total		Gemelas		Totales	
		mwh		flr		mwh		Flr		mwh		flr							
		%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#
24	78	0.38	(30)	0		0.10	(8)	0		0.49	(38)	0		0.49	(38)***	0		0.49	(38)***
48	60	0.32	(19)	0		0.50	(30)	0.067	(4)	0.82	(49)	0.067	(4)	0.88	(53)***	0.03	(2)	0.92	(55)***
72	118	0.41	(49)	0		0.51	(61)	0.084	(10)	0.93	(110)	0.084	(10)	1.01	(120)***	0.11	(14)	1.05	(125)***
96	120	0.36	(44)	0.025	(3)	0.78	(93)	0.13	(16)	1.22	(146)	0.16	(19)	1.38	(165)***	0.29	(35)	1.67	(200)***
120	114	0.78	(89)	0.017	(2)	0.80	(92)	0.12	(14)	1.58	(181)	0.14	(16)	1.72	(197)***	0.32	(37)	2.05	(234)***

B) mwh - TM3, Ser

Edad	No. Alas	Chicas				Grandes				Simples				Total		Gemelas		Totales	
		mwh		flr		mwh		Flr		mwh		flr							
		%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#
24	50	0.32	(16)	0		0	(0)	0		0.32	(16)	0		0.32	(16)	0		0.32	(16)***
48	28	0.46	(13)	0		0.07	(2)	0		0.53	(15)	0		0.53	(15)	0		0.53	(15)***
72	72	0.41	(31)	0		0.26	(19)	0		0.68	(49)	0		0.68	(49)	0		0.68	(49)***
96	52	0.25	(8)	0		0.28	(9)	0		0.62	(17)	0		0.62	(17)	0		0.62	(17)***
120	40	0.55	(22)	0		0.32	(13)	0		0.88	(35)	0		0.88	(35)	0		0.88	(35)***

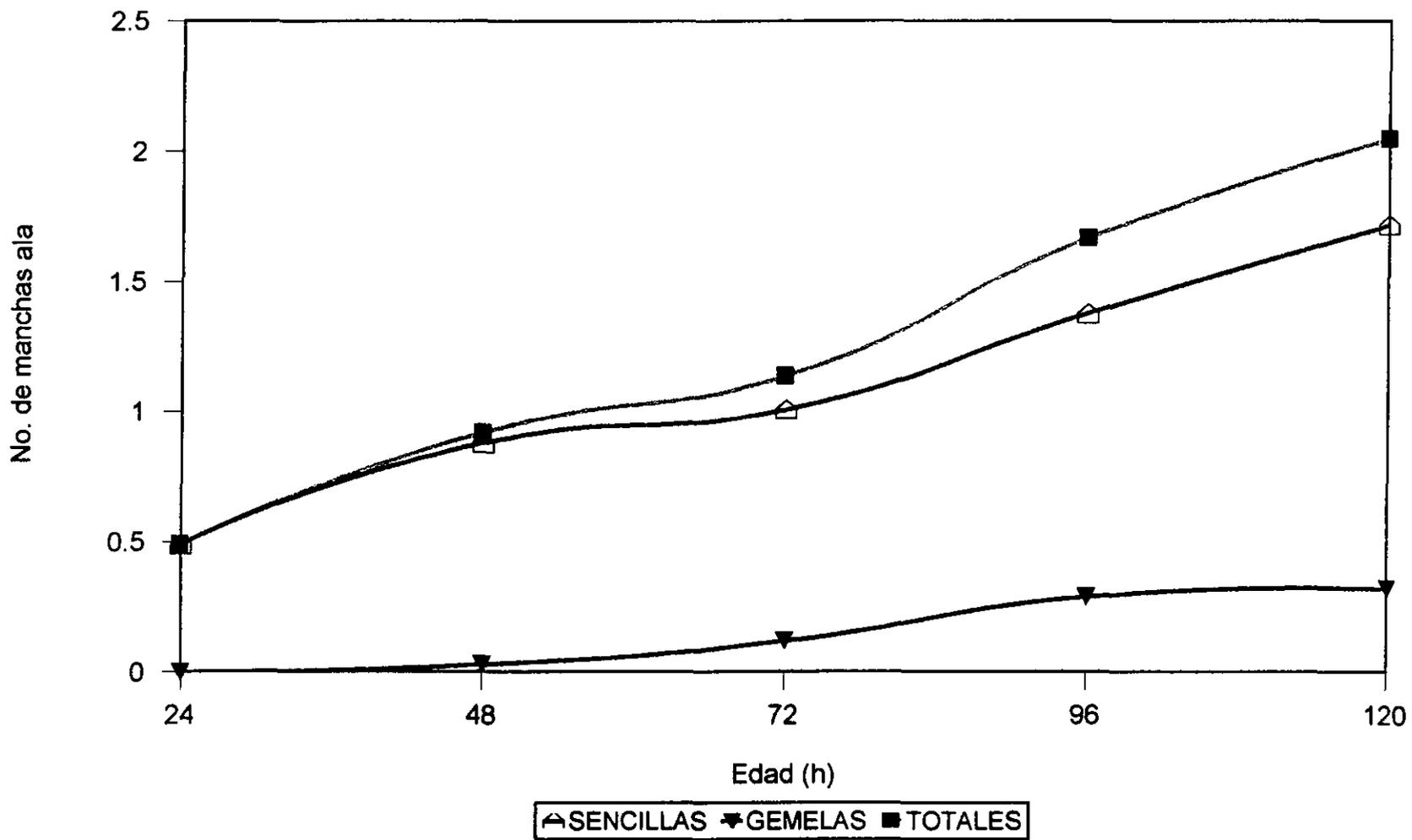


Fig. 18. Frecuencia de manchas por ala inducidas por MMS

TABLA XV. NUMERO DE MANCHAS INDUCIDAS POR MMS EN RELACION AL TAMAÑO DEL BLANCO EN INDIVIDUOS $mwh / \Omega r^3$

A							
			Sencillas				
Edad	N	C	NC	Δm	m/C	m/1000	FR
24	78	21	1638	15	0.009	9.15	155.32
48	60	67	4020	36	0.008	8.95	151.88
72	118	487	57466	86	0.001	1.49**	25.38
96	120	3492	419040	132	0.0003	0.31***	5.34
120	114	24400	2781600	164	5.896E-05	0.058***	1

B							
			Gemelas				
Edad	N	C	NC	Δm	m/C	m/1000	FR
24	78	21	1638	0	0	0	0
48	60	67	4020	1	0.00024	0.24***	19.76
72	118	487	57466	12	0.00020	0.20***	16.59
96	120	3492	419040	37	8.83E-05	0.081***	6.44
120	114	24400	2781600	35	1.258E-05	0.012***	1

C							
			Totales				
Edad	N	C	NC	Δm	m/C	m/1000	FR
24	78	21	1638	16	0.009	9.157	135.8
48	60	67	4020	37	0.009	9.45	128.00
72	118	487	57466	99	0.001	1.74***	23.95
96	120	3492	419040	165	0.0003	0.39***	5.47
120	114	24400	2781600	200	7.19E-05	0.07***	1

D							
			mwh				
Edad	N	C	NC	Δm	m/C	m/1000	FR
24	78	21	1638	14	0.009	8.54	128.5
48	60	67	4020	34	0.008	8.45	127.16
72	118	487	57466	96	0.001	1.67***	25.1
96	120	3492	419040	145	0.0003	0.34***	5.2
120	114	24400	2781600	185	6.651E-05	0.06***	1

N= número de alas C= número de células Δm : incremento de manchas

m/C= manchas por célula m/1000= manchas en 1000 células FR= frecuencia relativa

* $p < 0.01$ ** $p < 0.00$ *** $p < 0.001$

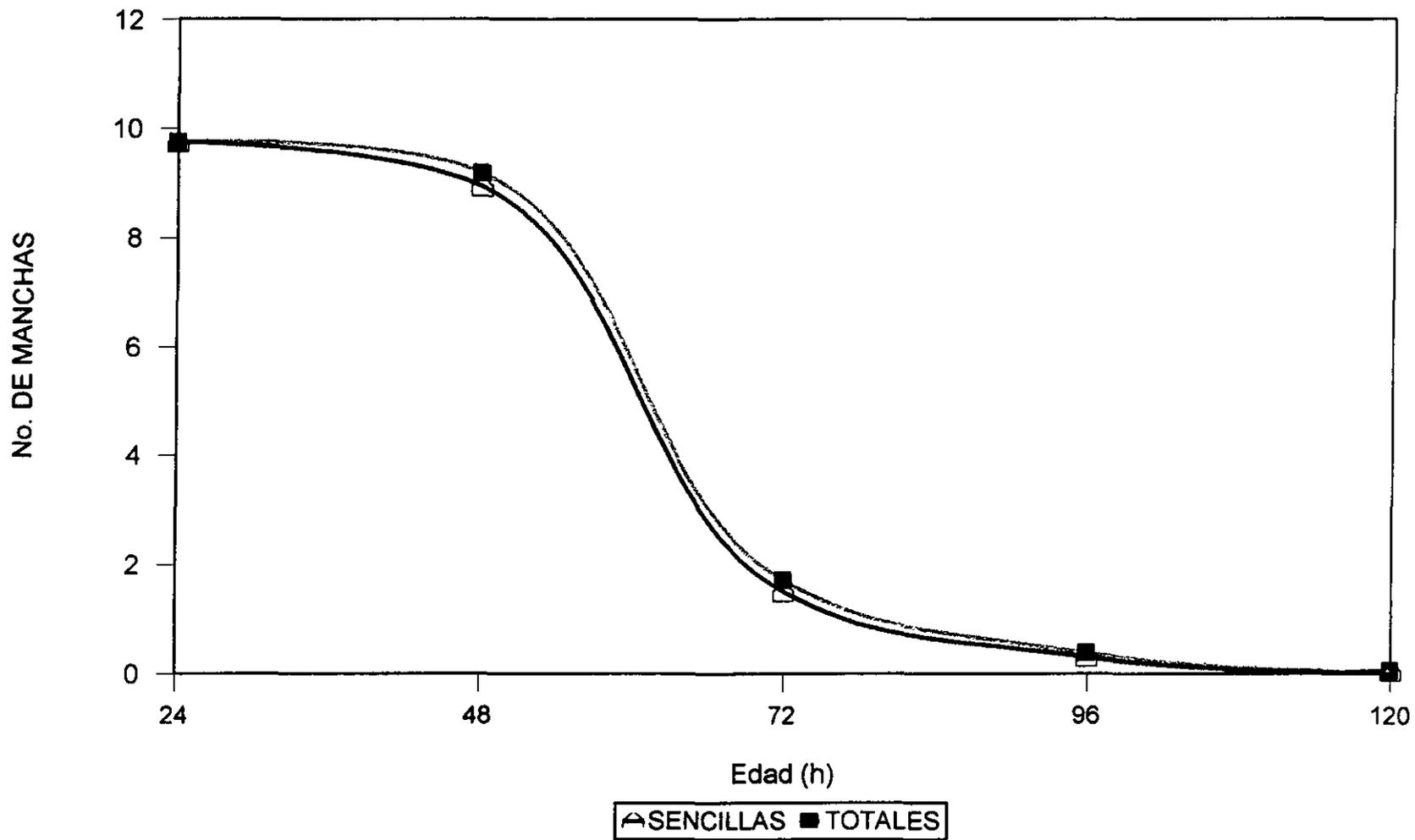


Fig. 19 Número de manchas sencillas inducidas por MMS en 1000 células

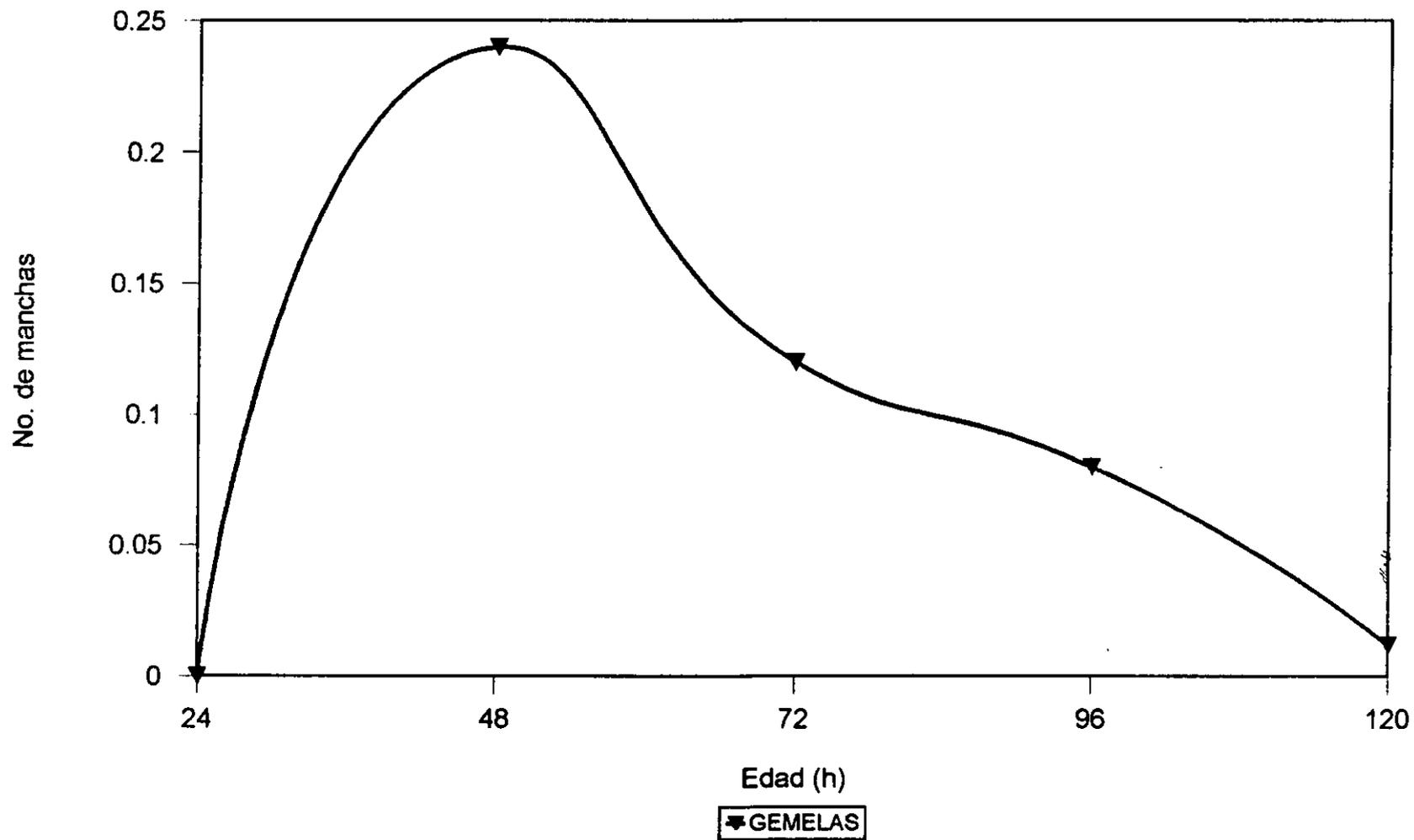


Fig. 20. Número de manchas gemelas inducidas por MMS en 1000 células

TABLA XVI. NUMERO DE MANCHAS INDUCIDAS POR MMS EN RELACION AL TAMAÑO DEL BLANCO EN INDIVIDUOS mwh /TM3, Ser

Edad	N	C	NC	Δm	m/C	m/1000	FR
24	50	21	1050	5	0.0047	4.76	178.7
48	28	67	1876	9	0.0047	4.79	180.0
72	72	487	35064	33	0.0009	0.94***	35.32
96	52	3492	111744	20	1.7E-05	0.17***	6.53
120	40	24400	976000	26	2.664E-05	0.026***	1

TABLA XVII. PROPORCION MUTACION RECOMBINACION INDUCIDA POR MMS

Edad	Mutación	Recombinación
Testigo	76.96	23.03
24	55.71	44.28
48	56.72	43.27 n.s.
72	56.33	43.66 n.s.
96	49.13	50.87 n.s.
120	40.05	59.94 *

TABLA XVIII. PROPORCION DE RECOMBINACION EN LAS DIFERENTES REGIONES DEL CROMOSOMA

Edad	mwh- flr ³	flr ³ - centrómero
Testigo	86.85	13.15
24	100.0	0.00 ^a
48	91.67	9.8*
72	75.86	27.38 * ^a
96	76.35	38.20 * ^a
120	73.57	34.72 * ^a

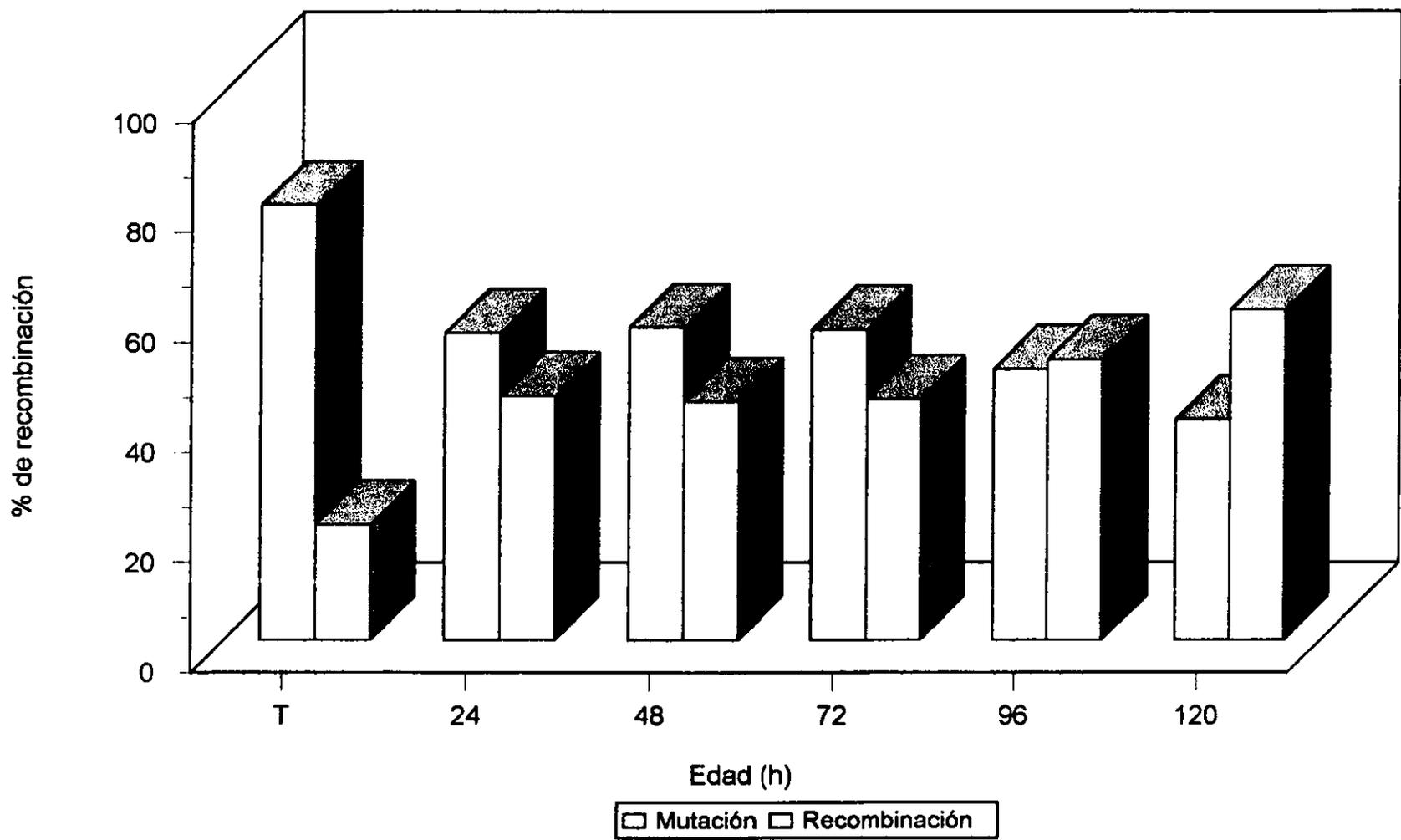


Fig. 21. Proporción Mutación / Recombinación
MMS

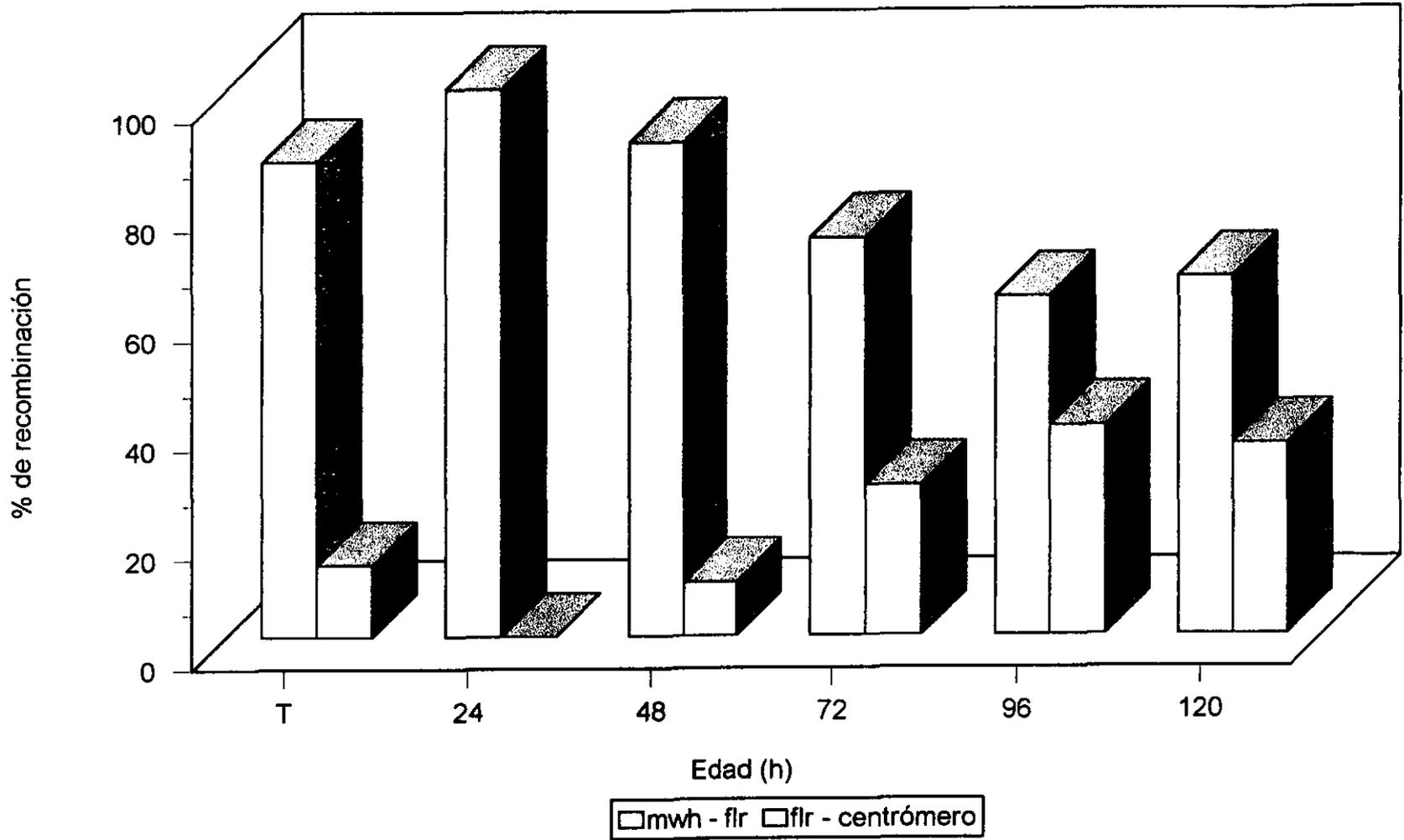


Fig. 22. Proporción de la recombinación en las diferentes regiones del cromosoma MMS

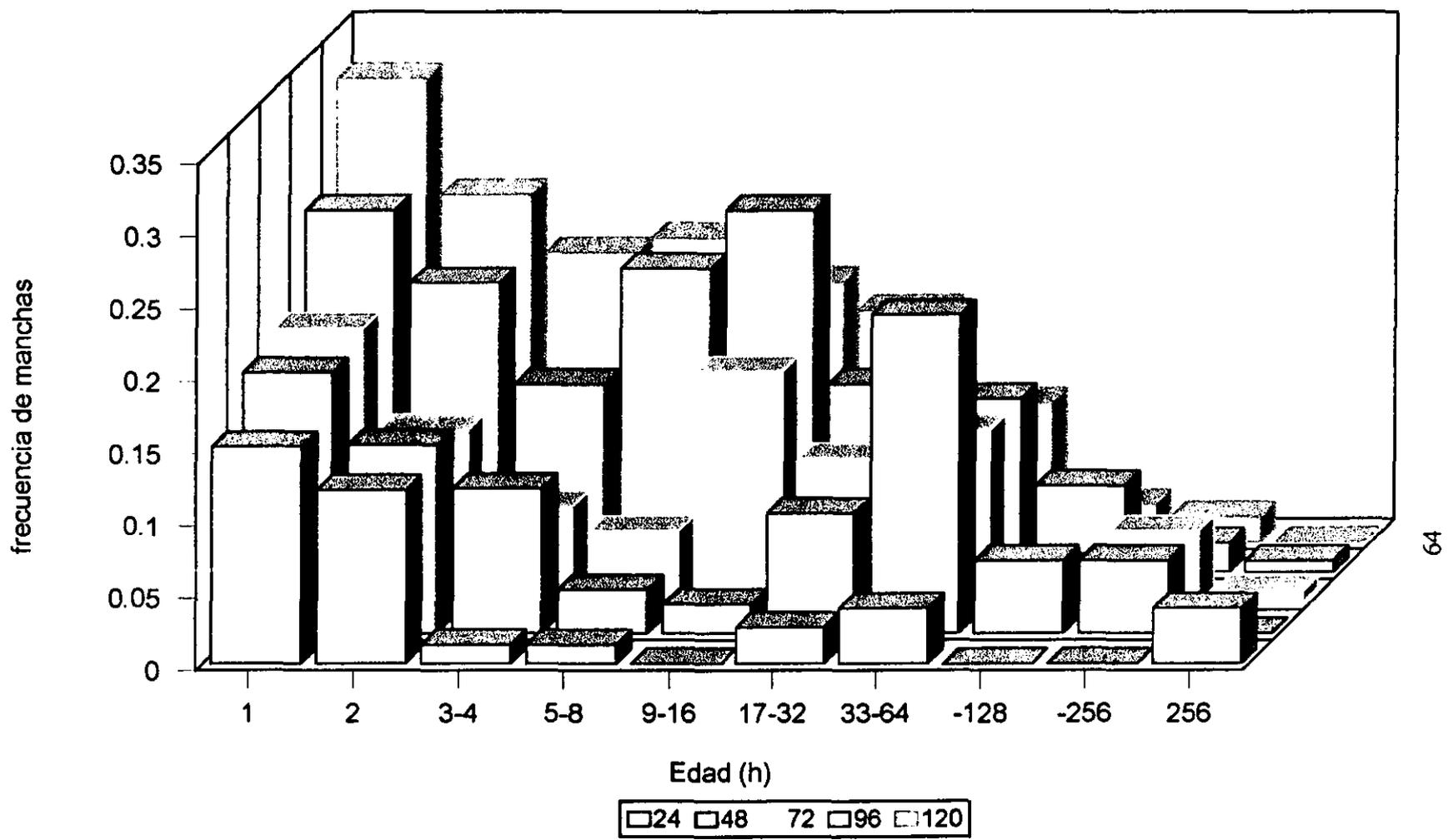


Fig. 23. Distribución del tamaño de las manchas sencillas MMS

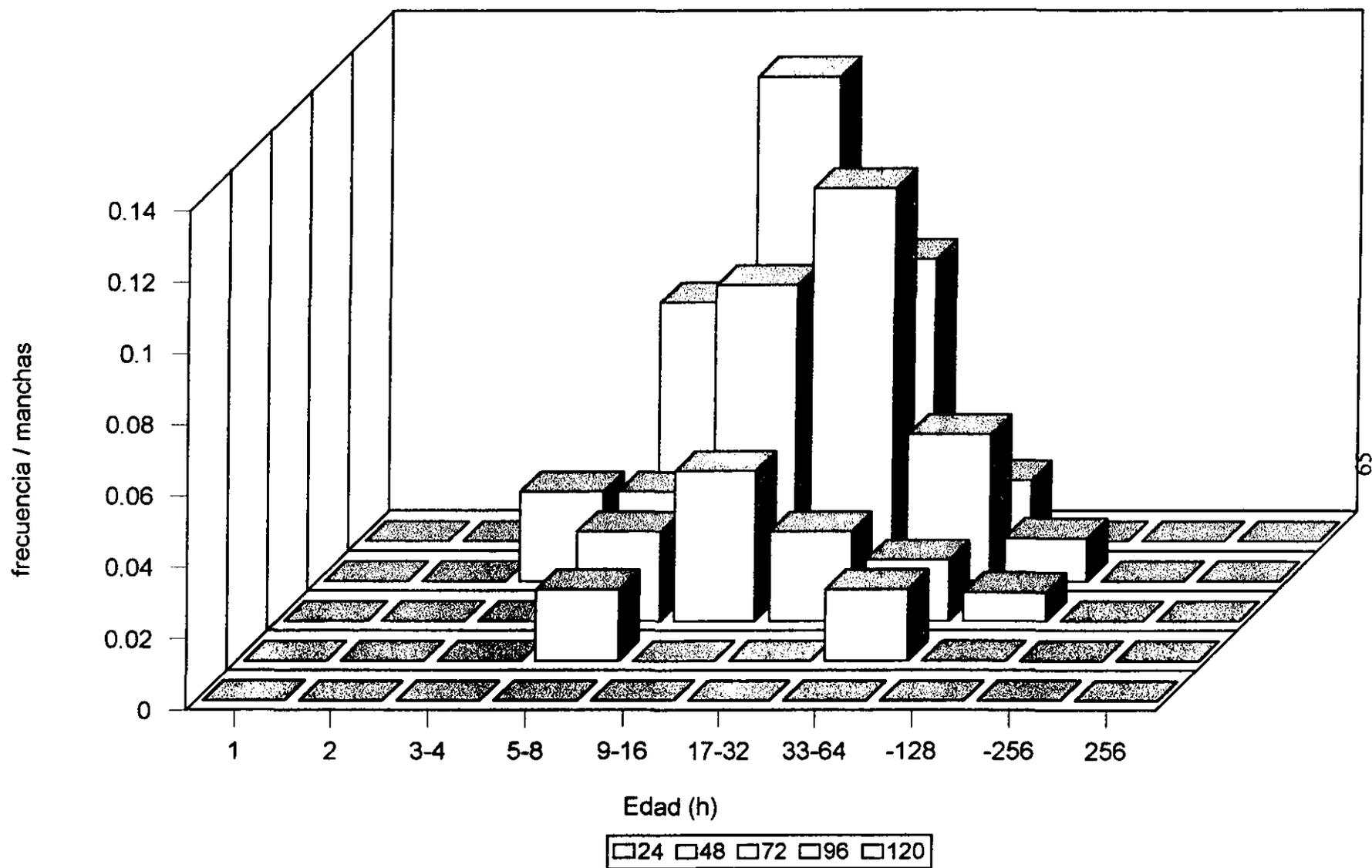


Fig. 24. Distribución del tamaño de las manchas gemelas MMS

6.0 DISCUSION

6.1 Comparación entre la frecuencia de manchas por ala y la inducción de manchas en relación al tamaño del blanco

Al realizar el análisis de la frecuencia de manchas por ala se observó que en los tratamientos experimentales con los tres agentes utilizados en esta investigación, ésta se incrementó en forma consistente con la edad de los individuos. Este aumento en el número de manchas, podría estar relacionado con el aumento en el número de células en los discos imagales al momento de tratamiento. Por medio de estudios con rayos X, se ha determinado que el disco imagal que dará origen a las alas de los adultos, inicia con aproximadamente con entre 20 y 50 células, las cuales se dividen cada 8.6 h hasta alcanzar el número de células del ala que es de alrededor de 30,000 (Würgler y Vogel, 1986). De esta manera, la diferencia en la respuesta es la cantidad de células presentes en los discos imagales en cada etapa de tratamiento por lo que juzgamos un error considerar solamente la frecuencia de manchas por ala. Para eliminarlo, se estimó el tamaño de la población de células al momento del tratamiento y se calculó la inducción del número de manchas en 1000 células.

6.1.1 Rayos gamma

Con los rayos gamma la frecuencia de manchas por ala en los individuos mwh/flr³, se elevó de 0.66 manchas en las larvas de 24 h, hasta 13.22 manchas en las larvas de 120 h y los individuos mwh / TM3, Ser, desde 0.12 en las larvas de 24 h hasta 2.8 en las de 120. No se produjeron manchas gemelas en las larvas de 24 ni en las de 48 h.

Al realizar el análisis considerando el tamaño del blanco, la relación es entonces inversamente proporcional ya que en el caso de las larvas de 24 h se produjeron 34 veces más manchas totales que en las larvas de 120 h (Tabla III C).

6.1.2 EMS

Los resultados obtenidos con EMS, muestran el mismo comportamiento de los rayos gamma, es decir se observa que la frecuencia de manchas por ala se incrementó en relación a la etapa de desarrollo, (Figura 11), sin embargo al, realizar el análisis considerando el tamaño del blanco, la relación es nuevamente inversamente proporcional (Figuras 12 y 13). A diferencia de los rayos gamma el EMS produjo manchas gemelas en todos los estadios larvarios (Figura 13), la mayor cantidad se observó en las larvas de 24 h.

Un punto que es importante resaltar es que en esta investigación el EMS indujo una alta proporción de manchas simples flr^3 , (Tabla IX A) que han sido reportadas tradicionalmente como las menos frecuentes. En las larvas de 24, las manchas simples flr^3 , representaron el 20 % de todas las manchas sencillas, y este porcentaje alcanzó hasta el 31 % en las larvas de 120 h, mientras que en los rayos gamma y el MMS para la etapa de 120 h, representaron tan sólo el 5% y el 8%, respectivamente. De los resultados obtenidos por Zimmering y col. (1997), se descarta la posibilidad de que esas manchas sean el resultado del intercambio entre cromosomas homólogos dado que al tratar individuos cuya constitución genética era $flr^3 / TM3$, Ser con EMS, la frecuencia de manchas flr^3 era similar a la encontrada en los individuos mwh/flr^3 . Se asume entonces que estas manchas fueron el resultado de eventos de mutación.

6.1.3 MMS

Con este agente, al igual que con los rayos gamma, no se produjeron manchas gemelas en las larvas de 24 h. Con el análisis considerando el tamaño del blanco, se observó que como en los dos agentes anteriores, la cantidad de manchas fue mayor en las etapas tempranas del desarrollo, en los dos tipos de descendientes (Tablas XIII y XIV).

6.1.4 Comparación entre los tres agentes

No es posible realizar una comparación entre la producción de manchas por agentes químicos y por radiación ionizante, principalmente porque no se puede comparar concentración y dosis de

radiación. Se puede mencionar sin embargo que bajo nuestras condiciones experimentales el EMS provocó más manchas en 1000 células que los otros dos agentes.

Cuando se realizó el análisis tomando en cuenta el tamaño del blanco, en todos los casos, las etapas tempranas fueron más sensibles. El hecho de que en las larvas de 24 h se indujera un mayor número de manchas en relación con las etapas tardías, podría estar relacionado con el hecho de que estas primeras son más sensibles al efecto de los agentes. En 1906, los Biólogos Franceses Bergonie y Tribondeau (Arena, 1971) postularon una ley según la cual la radiosensibilidad de las células es directamente proporcional a su actividad reproductora e inversamente proporcional a su grado de diferenciación, aunque se asume que todas las células en el disco están en el mismo estado de diferenciación, las células de una larva de 24 h tienen una actividad reproductora mayor si se compara con las células en una larva de 120 h y por tal razón podrían ser más radiosensibles. Esta explicación podría ser válida también para el caso de los agentes químicos.

En cuanto a la discrepancia entre la relación encontrada en la frecuencia de manchas por ala "vs" el número de manchas en relación al tamaño del blanco celular, en el análisis estadístico propuesto por Frei y Würigler (1988; 1995), se obtiene el número de manchas en 10^5 células, que no forma parte del análisis propiamente dicho pero permite comparaciones entre diferentes testigos. La fórmula para obtener la inducción en 10^5 células es:

n / NC donde:

n = número de manchas mwh.

N = número de alas analizadas.

C = número de células expuestas.

Es claro que cuando se tratan larvas correspondientes a la misma etapa larvaria el valor de C es siempre el mismo, sin embargo como ya se mencionó anteriormente la principal diferencia entre las larvas es el número de células presentes en el disco imagal en el momento del tratamiento, por lo que el valor de C es diferente, de ahí que en el análisis celular propuesto en la presente

investigación la relación entre el número de manchas en 1000 células se modifique en sentido inverso al análisis propuesto por Frei y Würigler (1988).

6.2 Mecanismos para la inducción de manchas

Las manchas pueden ser producidas por diversos mecanismos genéticos: las mutaciones génicas en el locus marcador (por ejemplo la inducción de un alelo mutante no complementario en el sitio del alelo silvestre de un locus marcador) puede producir una mancha sencilla (Würigler y Vogel, 1986). Aún cuando no existe evidencia directa sobre los eventos mutacionales que conducen a la formación de las manchas, en las células somáticas, se puede hacer la extrapolación de los eventos mutacionales que ocurren en las células germinales. Existe suficiente evidencia experimental que indica que el EMS, induce mutaciones génicas en células germinales de *Drosophila melanogaster* (Aurebach, 1989; Lifschytz y Falk, 1969; Vogel, y Natarajan, 1979 a y b). Se ha demostrado también que el EMS, genera pequeñas deleciones (Shulka y Aurebach, 1981).

Basados en estudios citogenéticos de mutantes producidos en *Drosophila* utilizando numerosos agentes entre los que se incluyeron los rayos X, EMS, MMS, MNNG y TEM, se infiere que muchos agentes químicos inducen deleciones (Paradi y col., 1983). En las células somáticas se espera que ocurran deleciones que varían en tamaño, desde aquéllas que afectan a unos pocos nucleótidos (mutaciones por corrimiento de base), hasta las que abarcan muchos loci.

En condición heterocigótica, si el alelo silvestre se pierde por efecto de una deleción, el alelo mutante se expresará fenotípicamente (Würigler y Vogel, 1986). El marcador *mwh*, puede ser evidenciado por una deleción terminal en el alelo silvestre y el alelo *flr³*, por una deleción intersticial.

La segregación errónea de los autosomas, como consecuencia de la no - disyunción, lleva a la formación de dos células aneuploides: una trisómica y la otra monosómica para el autosoma involucrado, solamente la célula monosómica expresará el marcador que porta. Las células monosómicas, también pueden ser el resultado de pérdida de cromosomas como consecuencia de

rupturas cromosómicas. El daño al huso acromático parece la mayor causa de la no disyunción inducida por agentes químicos (Ramel y Magnuson, 1979).

La recombinación mitótica es quizá el principal mecanismo responsable en la producción de manchas, y por ser el objetivo de la presente investigación se tratará en forma independiente.

6.3 Proporción de manchas inducidas por mutación / recombinación

Como se mencionó anteriormente para determinar la proporción de manchas atribuidas a recombinación se analizó el número de las manchas en los individuos cuya constitución genética era *mwh / TM3, Ser.* Dado que la recombinación en las células heterocigóticas para las múltiples inversiones presentes en cromosoma TM3, conduce a configuraciones cromosómicas que no son viables, el cromosoma TM3, es capaz de reducir la recombinación mitótica (Frei y Würigler, 1995; Graf y col., 1992).

6.3.1 Rayos gamma

De los tres agentes utilizados, los rayos gamma fueron los que indujeron un mayor porcentaje de recombinación y éste se modificó en las diferentes etapas larvarias, el porcentaje más alto de manchas atribuidas a recombinación correspondió a las larvas de 24 y 48 h en las que el 100 % de los eventos fueron el resultado de recombinación mitótica, el porcentaje más bajo correspondió a las larvas de 120 h (79.26). Al aplicar la prueba de χ^2 , se encontraron diferencias significativas entre la proporción de recombinación a las 24 y 48 h, con respecto a las otras etapas (72.96 y 120 h) pero no entre ellas.

6.3.2 EMS

El EMS también produjo un porcentaje alto de recombinación aunque no tan alto como en el caso de los rayos gamma, el más alto correspondió a las larvas de 48 h (62.61) y el más bajo a las larvas de 48 h (45.49) encontrándose diferencias significativas ($P < 0.02$) con respecto a las otras etapas.

6.3.3 MMS

Por su parte con el MMS, se logró el más bajo porcentaje de recombinación y aunque se modificó en las diferentes etapas larvianas no se observó una relación con respecto a la edad, al realizar el análisis estadístico, no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes etapas.

6.3.4 Comparación entre los tres agentes.

El alto porcentaje de manchas inducido por los rayos gamma, podría explicarse con base en el efecto que tiene la radiación ionizante sobre las macromoléculas de importancia biológica. Como se mencionó anteriormente, la radiación ionizante tiene la capacidad para producir rupturas de hebra sencilla y de doble hebra aunque estas últimas están más relacionadas con la recombinación, cabe la posibilidad de que se forme una ruptura doble a partir de dos rupturas sencillas en cadenas opuestas que se encuentren muy cercanas entre sí (Friedberg, 1984). La diferencia en la respuesta encontrada entre los dos agentes alquilantes, podría ser explicada en base las particularidades de cada uno de ellos. El estudio de los mecanismos de las mutaciones originadas por los agentes alquilantes, se ha centrado en la identificación y la persistencia de aductos específicos (Beraneck, 1990).

Con el advenimiento de las técnicas en biología molecular se ha encontrado evidencia experimental de que la unión a la molécula de ADN, es sólo una parte de un complicado proceso, involucrado en la fijación de una lesión mutagénica. Entre los factores que contribuyen a la expresión del daño, se incluyen: la distribución de los aductos, la distancia que existe con otra base afectada, y la reparación de secuencias específicas. La diferencia principal entre el MMS y

el EMS, es la preferencia del primero, por alquilar los nitrógenos en la molécula del ADN, mientras que el EMS aunque también alquila preferentemente a los nitrógenos, puede también unirse a los oxígenos (Tabla II).

Vogel y Natarajan, (1979 a y b) investigaron la relación entre el patrón de alquilación de diferentes AA monofuncionales, y la eficiencia biológica. La relación entre la concentración del agente utilizado y la mortalidad, es considerado un medio muy útil para expresar la reactividad de estos agentes. Los resultados de esa investigación indicaron que existe una relación directa entre el valor de ξ y la toxicidad de los agentes alquilantes. El MMS, que tiene el más alto valor de ξ , fue el más tóxico razón por la cual en esta investigación la concentración utilizada fue más baja. En los estudios realizados por Vogel y Natarajan, (1979 a y b) se observó que los agentes con un valor alto de ξ , fueron también más eficientes para inducir pérdida de cromosomas X en anillo. Los estudios sobre los efectos genéticos de los AA en *Drosophila*, indican que la prueba de pérdida de cromosomas X en anillo, puede ser considerada como la herramienta más pertinente para estimar rupturas cromosómicas en este sistema (Vogel y Natarajan, 1979 b). De los estudios realizados en *Drosophila* midiendo eventos como letales recesivos, translocaciones y pérdida de cromosomas, se ha establecido que los AA que tienen preferencia por los oxígenos son más eficientes para inducir mutaciones génicas (Vogel, 1986) y los agentes que exhiben selectividad por los nitrógenos, de los que el MMS es el mejor representante, inducen aberraciones cromosómicas (Vogel y Natarajan, 1979 a y b; Vogel, 1986, 1991) Estos resultados concuerdan con el trabajo de Natarajan y col. (1984) en el que encontraron que los agentes que presentan valores altos de ξ son buenos inductores de rupturas cromosómicas.

Con respecto a la capacidad para producir rupturas cromosómicas, se esperaría que MMS fuera más eficiente que el EMS, ya que en estudios anteriores se ha puesto de manifiesto que este agente es un buen inductor de rupturas cromosómicas y por lo tanto fuera mejor recombinógeno en comparación con el EMS. Rodríguez- Arnaiz y col. (1996), evaluaron la capacidad de 6 agentes alquilantes mono y bifuncionales para inducir recombinación mitótica y concluyeron que existe una relación directa entre el patrón de alquilación primaria y el porcentaje de recombinación dado que el más alto de fue para el MMS, el agente con el valor más alto de ξ . El porcentaje de manchas generadas por recombinación fue del 93% mientras que en la presente

investigación en las larvas correspondientes a 48 h la proporción de manchas atribuidas por recombinación fue del 43%.

En relación a los resultados obtenidos por estos autores, se debe mencionar que el MMS, fue el único agente de acción directa que se utilizó y eso posiblemente podría explicar el hecho de que indujera la frecuencia más alta de manchas a las mismas concentraciones usadas con los otros agentes. Por otra parte, utilizaron un tratamiento crónico administrado a larvas correspondientes al segundo estadio larvario y las dosis variaron desde 0.5 hasta 2mM. Cabe mencionar que no se encontraron diferencias entre la frecuencia de manchas producidas con las concentraciones 1 y 2 mM.

En este estudio, el EMS resultó ser un mejor recombinógeno en comparado con el MMS. Entre los factores que podrían explicar este comportamiento se debe mencionar a los mecanismos de reparación. Se sabe que el daño inducido en el ADN por alquilación es reparado básicamente mediante dos mecanismos: la transferencia del grupo alquil modificado a una enzima reparadora, que pierde su actividad irreversiblemente, o bien por la remoción de la base afectada por parte de una glicosilasa, dando como resultado la formación de un sitio apurínico o apirimídico que tendrá luego que ser reparado.

Con respecto al primer mecanismo, los estudios en *Drosophila*, han demostrado la existencia de dos productos polipéptidicos de 30 y 19 kDa respectivamente, con actividad alquil transferasa, que se encuentran presentes en todos los estadios larvarios con excepción de los embriones, y aceptan grupos metil radio- marcados de la N-7 metil guanina, N-3 metil adenina, y O-6 metil guanina y los transfiere a un residuo de cisteína en la proteína (Guzder y col., 1991; Dusenbery, 1997).

Con respecto al mecanismo, dependiente de las glicosilasas, en la literatura aparecen reportes contradictorios, y la mayor parte de los trabajos señalan que en *Drosophila* no se han podido caracterizar productos polipeptidicos con actividad de glicosilasa (Green y Deutsch, 1983; Guzder y col., 1991).

Las alquil transferasas reparan el daño por un mecanismo libre de error, ya que sólo retiran el grupo alquil. Se sabe que los grupos metilo son más fácilmente capturados por estas enzimas, en comparación con los grupos etilo. Esto podría estar relacionado con un mayor reconocimiento de los grupos metilo, por las enzimas.

El porcentaje menor de recombinación inducido por el MMS podría ser explicado en base a una reparación más eficiente del daño por alquil transferasas, lo que lo que se vería traducido en una frecuencia más baja de manchas y en un porcentaje menor de recombinación.

6.4 Proporción de recombinación en las diferentes etapas

Con los tres agentes utilizados en esta investigación, se observó que la recombinación se modificó en las diferentes etapas larvarias (Tablas VI, X Y XV). En el caso de los rayos gamma existe una relación entre la proporción de manchas atribuidas a recombinación y la edad de los individuos. De acuerdo a los resultados obtenidos, en las larvas de 24 y 48 h el 100% de las manchas fueron originadas por recombinación, esta proporción fue decreciendo con la edad de los individuos hasta llegar a representar el 79.26% en las larvas de 120 h.

Como ya se mencionó el significado biológico de la recombinación es la de funcionar como un mecanismo de reparación o de tolerancia al daño que permite a las células el retribuir las secuencias que se han perdido (Würgler,1992). Una posible explicación de los resultados obtenidos con los rayos gamma podría estar relacionada con el hecho de que las células en las larvas correspondientes a las etapas tempranas estén reparando más eficientemente el daño producido y la expresión de esta reparación sea una mayor frecuencia de recombinación.

Con respecto a los dos agentes químicos aunque se observa que la proporción de manchas inducidas por recombinación se modificó entre las diferentes etapas del desarrollo, no se encontró que la proporción de recombinación fuera mayor en las etapas tempranas, por lo que las discrepancias podrían ser atribuidas a la variación entre individuos y a que el número de manchas analizadas varia considerablemente en las diferentes etapas.

6.4.1 Importancia de la Reparación en la Recombinación.

Para conservar la integridad del genoma de los individuos, es necesaria la reparación de rompimientos. La certidumbre de que las rupturas dobles pueden ser reparadas por recombinación mitótica, proviene de los resultados obtenidos con hongos y cultivos de células de humanos. La primera evidencia de que la recombinación reparaba el daño producido por radiación fue aportada por Nakai y Matsumoto, (1967) usando una cepa de *Sacharomyces cerevisiae*, deficiente en recombinación. en la que la frecuencia de recombinantes era menor que las cepas silvestres (Ayaki y col., 1990).

En *Drosophila*, la evidencia de que la recombinación es un mecanismo que repara secuencias dañadas del ADN, proviene de las frecuencias bajas de recombinación en las cepas deficientes en reparación. (Graf y col, 1989). Se sabe por ejemplo, que el gen *mei 9⁺*, participa en un mecanismo de reparación libre de error contra el daño inducido por EMS, MMS, MNNG y ENNG. El porcentaje alto de recombinación provocado por la radiación ionizante, y los dos agentes químicos utilizados en la presente investigación, fue debido posiblemente a la habilidad que tienen para producir rupturas dobles y la reparación de estas por recombinación.

6.5 Recombinación en las diferentes regiones del cromosoma.

6.5.1 Comparación entre los tres agentes

Usando diversos marcadores en un cromosoma, es posible estudiar la respuesta diferencial de regiones definidas en el cromosoma a la modificación de la recombinación.

El sistema *mwh/flr³*, permite la inducción de la recombinación en dos diferentes regiones del cromosoma: el intervalo proximal del centrómero, que da origen a manchas gemelas, y la recombinación en la región eucromática más grande del cromosoma, que da origen a manchas simples *mwh*. Una alta proporción de manchas gemelas indica, por lo tanto que la recombinación ocurrió en la parte distal del cromosoma.

En los tres agentes utilizados en esta investigación, la proporción de manchas en las dos regiones del cromosoma ($mwh-flr^3$ y flr^3 -centrómero), se modificó, incrementándose significativamente en la región proximal (flr^3 -centrómero) en las etapas tardías del desarrollo.

La exposición de las larvas de 24 y 48 h a los rayos gamma causó que el 100 % de la recombinación se llevará a cabo en la región $mwh-flr^3$. Sin embargo el porcentaje de recombinación en esta región se incrementó con la edad, de 23.95 en las larvas de 72 h hasta 37.36 en las de 120 h (Tabla 6) se encontraron diferencias significativas con respecto a la recombinación en la región distal obtenida en el grupo testigo y las larvas de 24 y 48 h con respecto a las de 72,96 y 120h.

Para el EMS, esta frecuencia se elevó desde 15.62 % en las larvas de 24 h, hasta 41.76 en las de 96 h (Tabla 10). En el caso del MMS, en las larvas de 24 h el 100% de la recombinación se produjo en la parte distal del cromosoma y al igual que en los dos casos anteriores aumentó con la edad (Tabla 16), en las larvas correspondientes a 120 h el 34.72 % de la recombinación ocurrió en la región proximal del cromosoma.

Una de las principales diferencias entre el entrecruzamiento meiótico y la recombinación somática es que el primero tiene lugar solamente en las regiones eucromáticas de los cromosomas (Haendle, 1979). La influencia de la heterocromatina en la recombinación mitótica en *Drosophila* ha sido valorada por numerosos investigadores (Tokunaga y Arnheim, 1966; Walen, 1963; Haendle, 1979).

En investigaciones realizadas a ese respecto, la utilización de cromosomas con un exceso de heterocromatina acrecentó la frecuencia de recombinación (Walen, 1963). Recientemente Ramel y col. (1996), estudiaron la influencia de la heterocromatina sobre la recombinación en *Drosophila*, modificando la longitud de la región heterocromática del cromosoma X.

Un aumento de la aneuploidia de esta heterocromatina redujo la frecuencia de recombinación, confirmando el hecho de que las secuencias de heterocromatina son un substrato importante para la recombinación.

Se ha demostrado experimentalmente que algunos agentes químicos muestran preferencia por sitios específicos en los cromosomas. Sinkha y col. (1965) reportaron que el EDTA, induce recombinación solamente en la región eucromática del cromosoma X. Otro ejemplo claro de la respuesta diferencial de regiones individuales del cromosoma, es la descrita por Valentín, (1973). Después del tratamiento con 25 mM de EMS, se encontró un aumento de la recombinación en la región centromérica del cromosoma X. Las regiones centroméricas de los cromosomas 2 y 3 son especialmente sensibles a la inducción de entrecruzamiento por agentes como la Actinomicina D (Würgler, 1991).

Tomando en cuenta la distancia física entre los marcadores utilizados en la presente investigación se esperaría que la mayor parte de la recombinación ocurriera en la región comprendida entre *mwh* y *flr*³, que representa el 85% de la longitud del brazo izquierdo del cromosoma 3. Esto es verdadero para las etapas tempranas del desarrollo, sin embargo la tendencia es hacia el aumento en la recombinación en la parte heterocromática del cromosoma en las etapas tardías. Una posible explicación de la preferencia de algunos agentes, especialmente de los agentes químicos por ciertas regiones de los cromosomas, podría estar relacionada con la composición química de la eucromatina y la heterocromatina. Las regiones heterocromáticas de los cromosomas están constituidas de secuencias repetidas de adenina y Timina (Marchant y Holm, 1988). Los agentes que muestren afinidad por esas bases en el ADN posiblemente ejerzan su acción preferente en las regiones heterocromáticas de los cromosomas.

De los agentes utilizados en esta investigación la radiación gamma no parece tener preferencia por sitios específicos, ya que en teoría debería afectar al cromosoma completo y en cuanto al EMS y MMS, como se ha mencionado anteriormente presentan una alta selectividad para alquilar los nitrógenos y eventualmente los oxígenos de la guanina, la proporción con la que se unen al N3 de la Adenina, es muy baja, y por lo tanto es difícil explicar los resultados obtenidos en base a preferencias por las bases. Existe convincente evidencia experimental, de que en las células somáticas de *Drosophila* ocurre recombinación asimétrica. En las hembras, se observó una relación dosis - respuesta en el aumento de manchas gemelas en la heterocromatina del cromosoma X, pero no en la eucromatina. (Vogel y Szakmary, 1990). Aunque en teoría en la recombinación homóloga se intercambian segmentos iguales, la recombinación asimétrica puede

conducir a deleciones o duplicaciones de material genético en los cromosomas involucrados, que cuando ocurren en las zonas eucromáticas de los cromosomas pueden conducir a la muerte de las células. Por el contrario si esos cambios se realizan en las regiones heterocromáticas de los cromosomas, que son genéticamente inactivas, serán más viables.

En otras palabras, existe la posibilidad de que la recombinación se presente con igual frecuencia en todo el cromosoma, pero cuando ocurre recombinación asimétrica en las regiones eucromáticas conduce a duplicaciones o deleciones que provocan la muerte de las células y por lo tanto no es recuperada. Otra posible explicación es que exista una diferencia en la accesibilidad de los agentes a la diferentes regiones del cromosoma.

Los resultados de esta investigación indican que bajo nuestras condiciones de experimentación la recombinación en la región proximal del brazo izquierdo del cromosoma 3, se incrementó significativamente en relación con la edad. En un estudio realizado por Graf (1995), tratando diferentes estadios larvarios con MMS, se obtuvieron resultados similares a los de este trabajo; las manchas gemelas se incrementaron en relación directa con la edad, y en los primeros estadios larvarios, la frecuencia de este tipo de manchas no fue estadísticamente significativa. La explicación que se dio en este caso es que dada la letalidad asociada con el gen *flr*³, es poco probable recuperar manchas de menos de 4 células (Szabad y col., 1984) y mayores de 200 células, por lo que el autor considera que las 72 h son la etapa ideal para la inducción de manchas gemelas (Graf, 1995).

Una posible explicación al hecho de que exista un incremento en la recombinación en la región distal del cromosoma, podría estar relacionado con un cambio en la accesibilidad del mutágeno en esa región del cromosoma.

6.6 Distribución del tamaño de las manchas

En la prueba SMART, se asume que el tamaño de la mancha está influenciado por dos factores: La velocidad con que actuó el mutágeno y la edad de las larvas al momento del tratamiento. En el primer caso, los agentes de acción directa producen manchas más grandes en relación a los

promutágenos y por otra parte el tratamiento administrado en etapas tempranas dará lugar a manchas más grandes (Graf y col., 1984, Graf 1995).

Si bien es cierto que la edad de las larvas es un factor determinante en el tamaño de las manchas, no es el único que debe tomarse en consideración. Dependiendo de las dosis utilizadas, todos los agentes pueden provocar la muerte celular, la cual es un proceso común en los discos imagales (Würgler y Vogel, 1986). Si después del tratamiento con un mutágeno sobrevive una parte del disco, ésta, puede regenerar la región que se ha perdido Haynie y Bryant (1977), y en el crecimiento compensatorio participan tanto las células normales como las que han sufrido mutación. Debido a este crecimiento, estos autores observaron un retraso en la pupación hasta de 24 horas a la dosis más alta.

La regeneración de los discos imagales fue establecida por Schweizer, quien encontró que existe una relación directa entre la muerte celular provocada por los rayos X y el tamaño de los clones originados por recombinación mitótica en las células del disco genital de *D. melanogaster*, observando un aumento gradual en el tamaño de los clones cuando se elevó la dosis de radiación (Würgler y Vogel, 1986). Este incremento en el tamaño fue posiblemente originado por la muerte de una parte de las células y por el crecimiento compensatorio de las que sobrevivieron. Se sabe que entre los efectos producidos por la radiación ionizante se encuentran aquellos que afectan el ciclo de división de las células. Cuando las células que se están dividiendo son irradiadas, se pueden observar algunos de los siguientes efectos:

1. La célula muere durante la irradiación.
2. La muerte de la célula ocurre algún tiempo después de la irradiación. La célula sobrevive pero la mitosis se inhibe permanentemente.
3. La célula sobrevive y se divide pero la primera mitosis o las mitosis posteriores se retrasan (Arena, 1971).

De la misma manera como la muerte de alguna o algunas de las células del disco traen como consecuencia el incremento en el tamaño de los clones, el retraso o la inhibición permanente de la mitosis podrán originar clones pequeños, independientemente de la etapa en la que haya ocurrido

el evento. En un estudio realizado con rayos X, Keninson y Ripoll, (1978) demostraron que la mayor parte de las manchas mwh observadas en individuos que no habían recibido tratamiento fueron aneuploides y dado que estas manchas generalmente fueron pequeñas, independientemente de la etapa de desarrollo en la que se produjeron, se asumió que las células aneuploides presentaron un retraso en la división celular. En este estudio se encontró una frecuencia significativamente elevada de manchas chicas inducidas por rayos X en etapas tempranas del desarrollo y se argumentó que estas fueron también el resultado de aneuploidía. Es claro entonces que en el tamaño de las manchas intervienen otros factores además de la edad de los organismos o que el agente sea de acción directa o no.

La distribución del tamaño de las manchas sencillas y gemelas provocadas por rayos gamma se muestran en las figuras 9 y 10 respectivamente. Dado que la radiación ionizante es un agente que produce daño inmediato, se esperaría que el tamaño de las manchas fuera inversamente proporcional a la edad en la que fueron irradiados los individuos.

Aunque los resultados obtenidos muestran que en los individuos que fueron irradiados en la etapa de 96 y 120 h, se incrementa el número de manchas de una y dos células, en relación en los irradiados en las etapas más tempranas, aún en estas moscas se recuperaron manchas de más de 100 células, aunque a estas células solo les restaban una o dos divisiones celulares. En el caso de EMS y MMS (Figuras 16, 17, 23 y 24) también se observa que se inducen manchas grandes aún en las larvas que fueron tratadas en las últimas etapas del desarrollo.

En la presente investigación, se observaron manchas simples flr^3 de 2 células y mayores de 100, específicamente en el caso del EMS, en donde se obtuvo una frecuencia significativa de este tipo de manchas en todas las etapas.

Otra posible explicación al aumento del tamaño de la mancha es la propuesta por Haynie y Bryant (1977), al utilizar diferentes dosis de rayos X, desde 500 hasta 4000 r, encontraron que a medida que aumenta la dosis, el daño era mayor y se encontraban clones más grandes, por lo que propusieron que las manchas grandes eran el resultado de la fusión de manchas.

Por todo lo anteriormente expuesto, es claro que a pesar de la letalidad asociada al marcador flr^3 , la inducción de manchas gemelas podría ser independiente de la edad de los individuos y se cuestiona el hecho de que el incremento en la región distal del cromosoma sea debido exclusivamente a la letalidad de flr^3 , como menciona Graf, (1995).

7.0 CONCLUSIONES

7.1 Frecuencia de manchas por ala “vs” número de manchas en relación al tamaño del blanco

Dado que la principal diferencia entre los estadios larvarios es el número de células presentes en el disco imagal, este análisis permite hacer una comparación más válida entre la inducción de mutaciones cuando se tratan diversas etapas del desarrollo lo que permite relacionar la inducción de manchas con aspectos tales como reparación.

7.2 Proporción mutación Recombinación.

La proporción mutación/recombinación, está influenciada por el tipo de agente, y esto está relacionado el mecanismo de acción. La mayor proporción de recombinación fue inducida por los rayos gamma, seguido por EMS y finalmente MMS, esto podría atribuirse al hecho de que este agente tiene una gran capacidad para inducir rupturas en el ADN.

7.3 Proporción de la recombinación en relación a la etapa de desarrollo

Aún cuando se encontraron diferencias en la proporción mutación/ recombinación con los tres agentes utilizados en la presente investigación, no se puede hablar de una relación con respecto a la edad, por lo que consideramos que éstas son el resultado de la variabilidad debida al tamaño del blanco.

7.4 Recombinación en las diferentes regiones del cromosoma.

La recombinación en la región distal del cromosoma (flr^3 -centrómero), se incrementó significativamente en relación directa con la edad de los individuos (y por supuesto el tamaño del blanco celular) con los tres agentes utilizados. Este aspecto podría estar relacionado con cambios en la accesibilidad de los agentes a esa región del cromosoma como respuesta a necesidades específicas de las células.

7.5 Tamaño de las manchas inducidas por los diferentes agentes.

De los resultados obtenidos en esta investigación, se puede concluir que el tamaño de las manchas inducidas por los tres agentes utilizados en esta investigación, no está influenciado solamente por la edad de las larvas en el momento del tratamiento.

Finalmente, la utilización de las células somáticas del ala de *Drosophila*, representa un sistema muy útil que no sólo permite detectar la capacidad de los agentes para interactuar con el ADN, sino que puede ofrecer información acerca de aspectos como reparación y la respuesta diferencial de las células para cumplir con los requerimientos específicos de cada etapa de desarrollo.

8.0 REFERENCIAS

Abbadesa, R. y Burdick, A. (1963). The effect of X -irradiation on somatic crossing over in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 48 :1345-1356.

Arena, V. (1971). Ionizing radiation and life. The C.V. Company.

Ayaki, T., Fujikawa, K., Ryo, H., Itoh, T. y Kondo, S. (1990). Induced rates of mitotic crossing over and possible mitotic gene conversion per wing anlage cell in *Drosophila melanogaster* by X rays and fission neutrons. *Genetics*, 126:157-166.

Ashburner, M. (1989). *Drosophila: a laboratory handbook*. Cold Spring Harbor Press, 1331 p.

Becker, H.J. (1976). Mitotic Recombination. En: Ashburner y Novitski (Eds.) *Genetics and Biology of Drosophila*, Vol. 1 Academic Press, Nueva York.

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

Carrano, A. V. y Johnston, G. (1977). The Distribution of mitomycin C- induced sister chromatid exchanges in the euchromatin and heterochromatin of the indian Muntjac. *Chromosoma*, 64: 97-107.

Cruces, M.P. (1989). Frecuencia de mutaciones somáticas y recombinación inducidas por rayos gamma en *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México.

Cruces, M.P. y Linares, Y. (1996). Comparación de la actividad antigenotóxica de la clorofilina frente a dos agentes alquilantes. IV Congreso conjunto de la Sociedad Mexicana de Genética y Sociedad Mexicana de Toxicología Genética. 29 de Septiembre a 2 de octubre Aguascalientes, Ags.

- Darras, B. T. y Francke, U. (1987). A partial deletion of the muscular dystrophy gene transmitted twice by unaffected male. *Nature*, 329: 556-558.
- Dusenbery, S. (1997). Cellular responses to DNA damage in *Drosophila*. *Mutation Res.*, 364:3-20.
- Erhernberg, L., Lundquist, U., Osterman, S., y Sparrman, B. (1966). On the mutagenic action of alkenosulfonic esters in barley. *Hereditas*, 56: 277-305.
- Frei, H., y Würgler, E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays represent a positive, negative, or inconclusive result, *Mutation Res.*, 203: 297-308.
- Frei, H. y Würgler, E. (1995). Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Res.*, 334:247-258.
- Friedberg, E. (1984). DNA Repair. Freeman and Company (Ed.). Nueva York 614 p.
- García Bellido, A. y Dapena, J. (1974). Induction detection y characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila*. *Mol. Gen. Genet.* 128: 117-130.
- Graf, U., Juon, H., Katz, A. J., Frei, H. J., y Würgler, F. E. (1983). A pilot study on a new *Drosophila* test: *Mutation Res.*, 120: 233-239.
- Graf, U., Würgler, E., y Katz, A. (1984). Somatic Mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen*, 6:153-188.
- Graf, U., Hall, C. y van Schaik, N. (1990). On the use of excision repair defective cells in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 16:225-237.

- Graf, U., Heo, O. y Olvera, O. (1992). The genotoxicity of chromium VI oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is over 90% due to mitotic recombination. *Mutation Res.*, 266: 197-203.
- Graf, U. (1995). Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Experientia*, 51:168-173.
- Green, M., y Deutsch, W. A. (1983). Repair of alkylated DNA: *Drosophila* have DNA methyltransferases but not DNA glycosylases; *Mol. Gen. Gente.* 192:322-325.
- Guzder, S., Kellet, M. y Deutsch, A. (1991). *Drosophila* methyltransferase activity and the repair of alkylated DNA. *Mutation Res.*, 255:143-153.
- Haendle, J. (1979). X- ray induced mitotic recombination in *Drosophila melanogaster*. IV Distribution within Eu-and Heterocromatin. *Mutation Res.*, 62 :467-475.
- Hanawalt, P. C. (1989). Preferential repair of damage in actively transcribed DNA sequences in vivo. *Genome*, 3: 605-611
- Haynie, J. L. y Bryant, P. J. (1977). The effects of X-rays on the proliferation dynamics in the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster*. *Whilhem Roux Arch.* 183: 85-100.
- Hilliker, A. (1976). Genetic analysis of the centromeric heterochromatin of chromosome 2 of *Drosophila melanogaster*: Deficiency mapping of EMS-induced lethal complementation groups. *Genetics*, 83: 765-782.
- Kenisonson , J. y Ripoll, P. (1978). Spontaneous mitotic recombination and evidence for an X -ray induced system for the repair of DNA damage in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 98: 91-103.

Kowalczykowski, S., y Eggleston, K. (1994). Homologous pairing and DNA Strand-exchange proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 63:991-1043.

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

Lewis, B. y Bacher, F. (1968). Methods of feeding ethyl methane sulfonate (EMS) to *Drosophila* males. *Drosophila Inf. Service*, 43:193.

Lifschytz, E., y Falk, R. (1969). Fine structure analysis of chromosome segment in *Drosophila melanogaster*. Analysis of a ethyl methanesulfonate- induced lethals. *Mutation Res.*, 8:147-155.

Lindsley, L. y Zimm, G. (1990). The genome of *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Information Service*. No.64 y 68. Phip W. Hedrick (Ed.)

Lomel, L., Carswell- Crumpton, C., y Hanawalt, P. C. (1995). Preferential repair of transcribed DNA in the dihydrofolate reductase gene throughout the cell cycle in UV-irradiated human cells. *Mutation Res.*, 336: 181-192.

Marchant, E. G., y Holm, D. (1988). Analysis of heterochromatin of chromosome 3 in *Drosophila melanogaster*. I Products of compound -autosome detachment. *Genetics*, 120:503-517.

Morales- Ramírez, P., Mendiola-Cruz, M. T., Vallarino-Kelly, T. y Rodríguez Reyes, R. (1994). Comparasion of sister chromatid exchange in murine germinal and somatic cells by gamma radiation exposure in vivo. *Environ. Mutagen.* 24: 89-95.

Nakai, S., y Matsumoto, S. (1967). Two types of radiation- sensitive mutant in yeast. *Mutation Res.*, 42:129-136.

- Natarajan, A. T., Simons, J. W., Vogel, E. y Zeeland van A. A. (1984). Relationship between cell killing, chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges an point mutations induced by monofunctional alkylating agents in Chinese hamster cells. A correlation with different ethylation products in DNA. *Mutation Res.*, 28: 31- 40.
- Nugent, M., Huang, S. y Sander, M. (1993). Characterization of the apurinic endonuclease activity of *Drosophila* Rrp1. *Biochemistry*, 26:11445-11452.
- Olvera, O., Zimmering, S., Arceo, C. y Cruces, M. (1993). The protective effects of chlorophyllin in treatment with chromium VI oxide in somatic cells of *Drosophila*. *Mutation Res.*, 301: 201-204.
- Osterman- Golkar, S., Ehrenberg , L., y Wachtmeister, (1970). Reaction kinetics y biological action in barley of monofunctional methanesulfonic esters. *Radiat. Biol. Bot.* 10: 303-327.
- Paradi, E., Vogel, E., y Szilagyi, E. (1983). Effect of storage y dose of MMS - induced deletions. Complementation analysis of X- chromosomal recessive lethals in the zeste white and maroon-like regions of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.*, 111:145-159.
- Pimentel, E., Zimmering, S., De la Rosa, M. E., Tavera, L., y Cruces, M. P. (1997). Evidence for an effect of exposure to low levels of alpha particle irradiation in larval cells of *Drosophila* as measured in the wing spot test. *Mutation Res.*, 354:139-142.
- Porter, R. D. (1988). Mode of gene transfer in bacteria in R. Kucherlapati y G.R. Smith (Eds), *Genetic Recombination*. Am. Soc. Microbiol. Washington, DC, pp 1-41.
- Radding, M. C. (1988). Homologos pairing and strand exchange promoted by *Escherichia coli* RecA protein. En: *Genetic Recombination*. Kucheraplati y Smith Eds. Am. Soc. Microbiol. Washington, DC, pp. 193-230.

- Ramel, C., y Magnuson, J. (1979). Chemical induction of non-disjunction in *Drosophila*. *Environmental Health Perspect.* 31:59-66.
- Ramel, B., Cederberg, H., Magnuson, J., Vogel, E., Natarajan, A. T., Mullender, L. H., Nivard, M., Parry, J.M., Leyson, A., Comendador, M.A., Sierra, L.M., Ferreiro, J. A., y Consuegra, S. (1996). Somatic recombination, gene amplification and cancer. *Mutation Res.*, 353:85-107.
- Rasmuson, B., Svahlin, H., Rasmuson, A., Montell, I., y Olofsoon, H. (1978). The use of mutationally unstable X- chromosome in *Drosophila* for mutagenic testing. *Mutation Res.*, 54:33-38.
- Rasmuson, A. (1985). Comparative studies of the induction of somatic eye - color mutation in unstable strain of *Drosophila melanogaster* by MMS and X - rays at different developmental stages. *Mutation Res.*, 148:65-70
- Resnick, M. A. (1976). The repair of double-strand breaks in DNA a model involving recombination. *J. Theor. Biol.* 59:97-106.
- Ripoll, P. y Garcia-Bellido A. (1978) Mitotic Recombination in the heterochromatin of the sex chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 90:93-104.
- Rodríguez- Arnaiz, R., Soto, P., Gaytán, J., C., y Graf, U. (1996). Analysis of mitotic recombination induced by several mono-and bifunctional alkylating agents in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Res.*, 351: 133-145.
- Ronen, A. (1964). Interchromosomal effects on somatic recombination in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 50: 649-658.
- Sander, M., Lowenhaupt, K., y Rich, A. (1991). *Drosophila* Rrp1 protein: an apurinic endonuclease with homologous recombination activities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 15:6780-6784.

Shulka, P. T., y Aurebach, C. (1980). Genetics tests for the detection of chemically induced small deletions in *Drosophila* chromosomes. *Mutation Res.*, 72 : 231-243.

Sinkha, S. P. (1965) Effect of EDTA on crossing over in various line of *Drosophila melanogaster* Fed. Proc. Transl. Suppl. 25:725-728.

Szakmary , A., Haung, S. M., Chang, D. T., Beachy, P. A. y Sander, M. (1996). Overexpression of a Rrp1 transgene reduces the somatic mutation and recombination frequency induced by oxidative DNA damage in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2093:1607-1612.

Szabad, J., Sóos, I., Polgár, G., Héjia, G. (1984). Testing the mutagenicity of malonaldehyde by the *Drosophila* mosaic and the sex -linked recessive lethal test. *Mutation Res.*, 113:117-133

Tokunaga, C. y Arnheim, J. R. (1966). Age dependence of the locations of X-ray induced somatic crossing -over in *Drosophila*. *Genetics*, 54:267-269.

Valentin, J. (1973). Selection for altered recombination frequency in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas*, 74:295-297.

van Gool, A. J., Shah, R, Mezard, C. y West, S. C. (1998). Functional interactions between the Holliday junction resolvase and the branch migration motor in *Escherichia coli*. *EMBO. J.* 17:1838-1845.

Vogel, E. y Natarajan, A. T. (1979 a). The relation between reaction kinetics and mutagenic action of mono-functional alkylating agents in higher eukaryotic systems. Recessive Lethal mutations and translocations in *Drosophila*. *Mutation Res.*, 62: 51-100.

Vogel, E. y Natarajan, A. T. (1979 b). The relation between reaction kinetics and mutagenic action of mono-functional alkylating agents in higher eukaryotic systems. II Total and partial sex chromosomal loss in *Drosophila*. *Mutation Res.*, 62: 101-123.

Vogel, E. (1985) Summary report on the performance of the *Drosophila* assays. *Progress in Mutation Res.*, 5:47-57.

Vogel, E. (1986). O-Alkylation in DNA does not correlate with the formation of chromosome breakage events in *D. melanogaster*. *Mutation Res.*, 162:201-213.

Vogel, E., y Szakmary, A. (1990). Basic principles and evaluation of results of assays measuring genotoxic damage in somatic cells of *Drosophila*. En: *Mutation and the Environment, Part B*, Wilwy - Liss (Ed.) 149-158.

Vogel, E. (1991). *Genotoxic Chemicals: An introduction into basic principles of Genetic Toxicology*. Manual del "Curso internacional de Genética Toxicológica, Molecular y Aplicada". Facultad de Ciencias UNAM. Noviembre de 1991.

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

Vogel, E. Graf, U., Frei, H., y Nivard, M. (1999). The result of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. *LARC Sci. Publ.* 146 :427-470.

Walén, K. H. (1963). Somatic crossing -over in relation to heterochromatin in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 49:905-923.

Watson, J., Hopkins, N., Roberts, J., Steitz, J. A., y Weiner, A. (1987). *Molecular Biology of the gene*. The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Inc. 4ª edición.

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

Würgler, F. E. (1991). Effects of chemical and physical agents on recombination events in cells of the germ line of male and female *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.*, 250:275-290.

Würgler, F. E. (1992). Recombination and gene conversion. *Mutation Res.*, 284:3-14.

Zimmering, S., Olvera, O., Hernández, M. E., Cruces, M. P., Arceo, C., y Pimentel, E. (1990). Evidence for a radioprotective effect of chlorophyllin. *Mutation Res.*, 245:47-49.

Zimmering, S., Cruces, M. P., Pimentel, E., Arceo, C., Carrasco, G. y Olvera, O. (1997). On the recovery of single spots with the flr phenotype in the wing spot test in *Drosophila*. *Mutation Res.*, 379:77-82.