



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Drosophila COMO MODELO in vivo PARA EVALUAR EL POTENCIAL GENOTOXICO DE MUESTRAS AMBIENTALES. LOS AZUFRES, MICH.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
RODOLFO OMAR ARELLANO AGUILAR



DIR: DE TESIS: DRA. PATRICIA RAMOS MORALES

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

ESTUDIOS DE ESTUDIOS PROFESIONALES
2002
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

Drosophila como modelo in vivo para determinar el potencial genotóxico de
muestras ambientales. Los Azufres, Mich.

realizado por Rodolfo Omar Arellano Anquilar

con número de cuenta 9233398-3 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Patricia Ramos Morales

Propietario

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Propietario

Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez

Suplente

M. en C. Adriana Muñoz Hernández

Suplente

M. en C. José Armando Muñoz Moya

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología



Dra. Patricia Ramos Morales DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Este trabajo esta dedicado a:

*Mi madre la Dra. María Elena Aguilar Mena.
Gracias por tu apoyo y cariño.*

Agradecimientos:

Esta es la parte que todos o casi todos escribimos al final y esta no es la excepción, sin embargo mis agradecimientos han sido pensados casi desde el inicio de este trabajo.

Quiero agradecer a todos aquellos que han creído en mí, ya que su apoyo ha sido vital en todo este tiempo.

Gracias Vero, por el amor y cariño que me has brindado todo este tiempo, sin duda este trabajo no habría sido posible terminar sin tu ayuda. Este trabajo es el premio de ambos.

A mis grandes amigos: Mauricio Hoyos, Lalo Ríos, Erika Morales y Bernardo, siempre ha sido grato compartir esos momentos filosóficos y de gran pachanga. ¡Gracias!

A todos los amigos, compañeros y maestros de la facultad, y sólo por nombrar algunos, sin que nadie se sienta: Lorena G., Claudia, A. Lazcano, Sara F., Miguel Angel, Los gabos, R. Cozátl, R. Garibay, hugo Beraldi, Renato, El gordo, El árbol, Flor, Isa, Lorenza, Adriana, Gabriela, Arturo, Edgar Camacho, Manuel, Rosy, Charly montes, Pili, Héctor Valderrama, Daniela, Mayka, Rodrigo, Carolina, Adriana, Angela, Sebas, etc. ¡gracias!, ya que de cada uno de ustedes he tratado de aprender.

A mi hermano Jorge (El yorch), ¡Gracias carnal por tu apoyo!. A toda mi familia que sin duda es una parte importante para mí. Así mismo a la familia Solares, Armando, Elena, Alex, Armandito, Marina y Susana

A mis compañeros del Laboratorio de Genética, que en verdad sin su ayuda estaría perdido. ¡Gracias!; Adriana M. Juan Carlos, Hugo, Armando, Yadira, Adriana R. Maju, Yola, Lupita, etc.

A Eduardo Rendón (lalo) muchas gracias, ya que sin tu ayuda en el campo no hubiera aprendido y divertido tanto.

Por supuesto a mis sinodales, muchas gracias por sus comentarios, ya que con ellos, esta tesis a quedado mucho mejor.
Dra. Gonsebatt, Dra. Cecilia Vanegas, M. en C. Adriana Muñoz y M. en C. Armando Muñoz.

Finalmente, este trabajo no se hubiera escrito jamás sin el apoyo, la dirección y la confianza de alguien a quien siempre recordaré con mucho cariño: Dra. Patricia Ramos Morales (paty), ¡muchas gracias!

Esta tesis tuvo el apoyo del Programa de Becas para Tesis de Licenciatura (PROBETEL), otorgado a través de la Departamento de Becas de la Facultad de Ciencias, UNAM.

ÍNDICE

	Pag.
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	
I.2 Efectos causados por la contaminación ambiental	1
I.3 La contaminación y los seres vivos	2
I.4 Efectos puntuales	2
I.5 Evaluación ambiental	3
I.6 Biomonitores y Biomarcadores	4
I.7 <i>Drosophila</i> como biomonitor	8
I.8 Evaluación de daño genotóxico en células somáticas	9
II. OBJETIVO	12
II.1 Objetivos particulares	12
III. HIPÓTESIS	12
IV. Sitio de muestreo	12
V. MATERIALES Y MÉTODO	16
V.1 Trabajo de campo	16
V.2 Trabajo de laboratorio	18
V.2.1 Cruza	18
V.2.2 Análisis de la prueba SMART	22
V.2.3 Obtención de larvas	24
V.2.4 Registros	24
V.2.5 Determinación del potencial genotóxico	25
V.2.6 Análisis de resultados	27
VI. RESULTADOS	28
VI.1 Resultados de campo	28
VI.2 Resultados de laboratorio	29
VI.2.1 Índice de Supervivencia (I.S.)	29
VI.2.2 Resultados en la inducción de daño en células somáticas	32
VI.3 Comparación entre el I.S. y la prueba SMART.	36
VII. DISCUSIÓN	37
VIII. CONCLUSIONES	42
IX. BIBLIOGRAFÍA	42
ANEXOS	

I. RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo principal, determinar la validez del Índice de Supervivencia (IS) como indicador preliminar de daño genotóxico en *Drosophila melanogaster* expuesta a concentraciones ambientales de muestras de agua de 7 sitios de la zona geotérmica de Los Azufres, Michoacán. Éstas se colectaron de 2 salmueras, 2 manantiales sulfurosos, 1 pozo de agua asociado a un manantial sulfuroso y 2 cuerpos de agua dulce). Las muestras se diluyeron en 11 concentraciones (0.4, 0.8, 1.6, 6.3, 10, 12.5, 25, 32, 50 y 100%), las cuales fueron administradas de manera subcrónica a larvas trans-heterocigas para los marcadores *fir*³ y *mwh*, obtenidas a partir de la cruce de moscas hembras *fir*³/*TM3, Ser* y machos *mwh/mwh*.

A partir del IS de cada una de las muestras se encontró una relación de toxicidad de la siguiente forma: Tejamaniles, Yacuzi y Los azufres < Llano grande y El pozo < pozos Az 26 y Az 56, siendo las salmueras altamente tóxicas; ya que se no hubo supervivencia de organismos en la muestra completa. En Llano grande y El pozo la supervivencia fue menor al 50% de organismos en la muestra concentrada; Finalmente en Tejamaniles, Yacuzi y Los azufres no se observó toxicidad en la muestra más concentrada. Se seleccionaron dos sitios para realizar la evaluación de la genotoxicidad, siendo esta mayor en Los azufres que en Llano grande. Se demostró que existe correlación entre el IS y la frecuencia de mutación y recombinación somáticas ($p < 0.05$). De esta manera se concluye que: el índice de supervivencia es un indicador preliminar confiable de la genotoxicidad en *Drosophila melanogaster*.

II. INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental entendiéndola como la entrada de sustancias (naturales o sintéticas) al ambiente rebasa la capacidad de los ecosistemas para asimilarlas y/o degradarlas, ésta puede presentarse, tanto a partir de fuentes naturales, como por la actividad antropogénica. Por ejemplo, a la par del desarrollo tecnológico, se extraen, sintetizan o diseñan sustancias y compuestos químicos que sirven de base para la producción de fertilizantes, plaguicidas, plásticos y diversos productos de uso doméstico. En la producción de energía a partir de hidrocarburos, la actividad nuclear y la actividad geotérmica, se generan desechos, principalmente en forma de aguas residuales que contienen gran cantidad de sustancias potencialmente peligrosas. En todos los casos, los desechos se vierten al ambiente de diferentes maneras provocando que la contaminación se incremente continuamente. Es por ello que desde hace varios años el estudio de la contaminación del ambiente y de los factores que la modulan ha recibido mayor atención (Albert, 1997).

II.1 Efectos causados por la contaminación ambiental.

Los efectos de la contaminación ambiental pueden analizarse en dos niveles: biótico y abiótico. En la tabla I. se presentan los efectos generados por la contaminación abiótica.

Tabla I. Principales efectos de la contaminación ambiental a partir de fuentes antropogénicas.

Fenómenos ambientales	Causa	Efectos	
Inversión térmica	Emisión de dióxido de carbono por la combustión excesiva de compuestos orgánicos	Incremento en la temperatura global alterando la intensidad del Efecto del Niño.	(Albert, 1997)
Degradación de la capa de Ozono.	Emisión de compuestos halogenados principalmente clorofluorocarbonos.	Adelgazamiento de la capa de ozono que permite el libre paso de los rayos ultravioleta (UV). Incremento en la incidencia del cáncer de piel.	(Albert, 1997)
Lluvia ácida	Emisiones de óxidos de nitrógeno y dióxido de azufre que al reaccionar llevan a la formación de ácido sulfúrico.	Altera el pH de cuerpos de agua afectando directamente a la flora y la fauna acuáticas. Reducción del crecimiento y pérdida del follaje, eventualmente provoca muerte de los bosques.	(Albert, 1997)
Eutroficación	Provocado por la descarga de aguas residuales, se presenta un incremento de nitrógeno y nutrientes.	La reducción y falta de oxígeno provoca la mortalidad en la fauna de ríos y lagos. Incremento en gases como sulfuro de hidrógeno, metano y amoníaco.	(Billen <i>et al.</i> , 1999)

Entre los efectos bióticos de la contaminación que involucran a la salud del hombre y de otros seres vivos, algunos autores citan, a los efectos en la morbilidad o cambios fisiológicos, los efectos no letales como son las disfunciones conductuales así como las reproductivas, las perturbaciones bioquímicas e inmunológicas, los efectos mutagénicos, carcinogénicos, teratogénicos y finalmente la mortalidad por exposiciones a corto, mediano o largo plazo a contaminantes (Butterworth *et al.*, 1995; Albert, 1997).

Éstos efectos provocan la eliminación de los organismos más susceptibles, contribuyendo a la reducción de la variabilidad génica natural o de la poza génica (Evenden y Depledge, 1997). Así, la variabilidad genética depende de la contribución de la poza génica a la sobrevivencia de una población y finalmente, al éxito de una especie. En consecuencia, en poblaciones naturales, las variaciones genéticas interindividuales y la subsecuente variación en la susceptibilidad, incrementan la probabilidad de que un agente o una mezcla de agentes, ejerzan una presión selectiva sobre individuos con genotipos particulares y, por consiguiente, en cambios en la densidad poblacional y en la biodiversidad junto con las comunidades y el ecosistema (Evenden y Depledge, 1997).

II.2 Efectos puntuales

Uno de los procesos más importantes que se presenta por la interacción de compuestos genotóxicos con los organismos, es la mutagénesis (Vogel *et al.*, 1991; Würgler y Kramer, 1992; Albert, 1997). La inducción de mutaciones o alteraciones en organismos pluricelulares se presenta principalmente en dos estirpes celulares; somáticas y germinales (ver tabla II), aunque no debe menospreciarse el efecto de los contaminantes durante el desarrollo de los organismos. Es conocido el efecto de toxinas producidas por *Rubella virus*, así como la exposición de agentes químicos como la talidomida y metil mercurio, así los agentes infecciosos, drogas y contaminantes ambientales pueden alterar el desarrollo, siendo una vez más la contaminación ambiental determinante de la salud e integridad del ecosistema (Shetz, 1998).

Tabla II. Alteraciones relacionados con las estirpes celulares somática, germinal, y durante el desarrollo (Würgler y Kramers, 1992).

Células germinales	Células somáticas	Desarrollo
<ul style="list-style-type: none"> • Aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas. • Alteraciones en la carga génica relacionadas con enfermedades genéticas heredables. • Mutaciones recesivas persistentes a través de las generaciones. • Reducción en la fertilidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Mutación puntual • Recombinación. • Aberraciones cromosómicas; estructurales y numéricas. • Inducción, promoción y progresión de cáncer 	<ul style="list-style-type: none"> • Alteración en la expresión génica • Alteraciones teratogénicas • Abortos.

II.3 Evaluación Ambiental

El monitoreo ambiental es prioritario si se pretende identificar el peligro que representan los contaminantes tanto para la salud humana como para los ecosistemas y además para poner en práctica medidas tendientes a controlar la contaminación y a reducir los efectos de ésta sobre la salud (Butterworth *et al.*, 1995). En el contexto del monitoreo ambiental deben tomarse en cuenta diferentes estrategias que tienen como finalidad determinar los efectos causados por diferentes fuentes de contaminación y formas de exposición (Everts, 1997).

En el estudio de los efectos de la contaminación se requiere de la participación interdisciplinaria de especialistas en diferentes áreas como son: la toxicología, la epidemiología y la bioestadística (Albert, 1997), que junto con la toxicología química, la ecología y recientemente el área de la ecotoxicología, participan en la concervación de la integridad de los ecosistemas, lo que depende de la supervivencia y eficiencia reproductiva de las poblaciones que los forman (Würgler y Kramers, 1992; Butterworth *et al.*, 1995; Calow, 1998; Walker, 1998 a,b).

Entre las diferentes herramientas involucradas en el monitoreo ambiental destinadas a la evaluación y predicción del daño al ambiente se utiliza el análisis de parámetros físico-químicos, distribuciones de patrones geoquímicos, presencia y composición de elementos traza (Butterworth *et al.*, 1995; Fernández *et al.*, 1995); medición de la persistencia y permanencia en el ambiente de compuestos como los organoclorados, organofosfatos, piretroides, herbicidas, etc (Carabias *et al.*, 2000). El desarrollo de métodos fluorométricos para la evaluación del estrés ambiental en plantas mediante parámetros fotosintéticos (Juneau y Popovic, 1999), así como métodos cromatográficos y espectrográficos que permiten detectar especies de componentes tóxicos en los organismos y el medio ambiente (Gallina, 2000). También se estima el incremento de nutrientes en sistemas hidrológicos para establecer riesgos provocados por la eutroficación (Billen *et al.*, 1999).

Sin embargo, el monitoreo ambiental basado en este tipo de observaciones y análisis físico químicos requiere, con frecuencia, del conocimiento previo de la sustancia a monitorear y de su posible sinergismo con otros compuestos que puedan encontrarse simultáneamente en el ambiente. Así, sólo en muy pocas ocasiones es posible extraer información con significado biológico, que posibilite la aplicación de medidas de seguridad para la exposición a dicho compuesto. Por otro lado, las múltiples combinaciones que sería necesario explorar en forma experimental para establecer todos sus efectos, haría que el costo requerido para la aplicación de estas metodologías se incrementara de manera considerable, con poco eficiencia en la información obtenida (Fossi y Leonzo, 1994; Gullan y Cranston, 1994; Butterworth *et al.*, 1995).

II.4 Biomonitores y Biomarcadores

En años recientes el monitoreo ambiental ha involucrado sistemas biológicos de prueba que implican el uso de organismos indicadores de perturbación, el análisis de la diversidad de las especies en zonas altamente contaminadas y el uso de especies centinelas, tanto de invertebrados como de vertebrados, entre otras estrategias (Fossi y Leonzio, 1994; Butterworth *et al.*, 1995; Fitzgerald *et al.*, 1999). En la ecotoxicología, los biomonitores y biomarcadores ambientales conocidos como marcadores

biológicos, constituyen herramientas valiosas para evaluar el riesgo y el grado de daño provocado en los organismos por agentes contaminantes. En este contexto, la respuesta de los organismos más sensibles, permite alertar acerca del riesgo que implican algunos contaminantes, y establecer medidas de control, antes de que los efectos de la contaminación se extiendan al resto de los organismos de las poblaciones bajo riesgo (Evenden y Depledge, 1997).

Según la United States Environmental Protection Agency (EPA), un biomarcador consiste en la evaluación de cualquier contaminante o de sus efectos biológicos en órganos o tejidos de los organismos (Butterworth *et al.*, 1995). Existe un gran número de clasificaciones de marcadores biológicos. Algunos autores los clasifican por el nivel de organización; por el tipo de marcador, el cual puede ser por efecto, exposición (Manly, 1996; Calow 1998) o bien, los dividen en marcadores específicos (Cotelle y Ferand, 1999; Kravitz *et al.*, 1999) y no específicos (Thorne *et al.*, 1997; Huang y Batterman, 2000; Butterworth *et al.*, 2000; Delmas *et al.*, 2000; Raashou-Nielsen, 2000).

Evenden y Depledge (1997), clasificaron a los marcadores biológicos en jerarquías y establecieron el análisis de los efectos de los contaminantes con relación a los niveles específicos de organización biológica, indicando el tipo de biomarcador que pudiera ser empleado principalmente en la evaluación y monitoreo de los efectos tóxicos sobre los organismos. Los marcadores basados en los análisis fisiológicos, conductuales y métodos ecológicos constituyen marcadores no-específicos de mayor jerarquía, implican el estudio de organismos, comunidades y ecosistemas, pueden ser usados inicialmente como herramientas para detectar efectos de contaminantes sobre el ambiente. Los marcadores basados en el análisis de moléculas, organelos, células, tejidos y órganos de organismos, son generalmente más costosos, aunque más específicos, éstos pudieran proveer información sobre los mecanismos implicados en la producción del efecto evaluado y acerca de la naturaleza de los compuestos contaminantes (ver tabla III).

Tabla III. Principales marcadores biológicos empleados en el estudio de la contaminación.

Nivel de organización	Marcador biológico	Tipo de marcador
Moléculas biológicas	Efectos en el ADN: formación de aductos, rompimiento de cadenas, mutaciones. Inducción de micronúcleos, aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas. Expresión de genes: regulación celular y proteínas de defensa: (HSPs, p53, p21, oncoproteínas, MXR proteínas, enzimas de reparación del ADN, enzimas desintoxicantes, esterasas.	Marcadores de exposición Marcadores de efectos A
Organelos	Mitocondrias, cloroplastos, membrana celular y nuclear. Degradación de lisosomas.	
Células Tejidos Órganos	Alteraciones hematológicas, apoptosis. Alteración en la respuesta inmune Función cardíaca, renal, tiroidea, adrenal, pituitaria.	Marcadores de cambios ecológicos Marcadores de cambios evolutivos B
Sistemas	Termorregulación, osmorregulación.	
Individuo	Funciones metabólicas: glicólisis, biosíntesis de aminoácidos, respiración. Malformaciones, Muerte Cambios en la tasa de crecimiento. Cambios locomotores y conductuales.	
Poblaciones	Alteraciones en el ciclo reproductivo. Reducción de la fertilidad. Reducción de la fecundidad. Reducción en la viabilidad de la progenie, abortos. Incremento en la endogamia. Evidencias de endemismos. Decaimiento de la población.	
Comunidades	Cambios en la densidad poblacional. Pérdida de la variabilidad genética nuclear y mitocondrial, cambios en los patrones de aloenzimas.	
Ecosistema	Distribución geográfica. Reducción de la biodiversidad y diversidad de especies.	

A) Alteraciones a nivel de secuencias génicas cruciales en la respuesta a tóxicos.
B) Cambios deletéreos a nivel de poblaciones génicas

(Modificado de; Evenden, J. A. & M. H. Deplege, 1997)

Por su parte, los sistemas de biomonitorio están diseñados para evaluar el impacto ambiental a nivel individual en diferentes tipos de ecosistemas (Fossi, 1994; Butterworth, 1995; Walker, 1998a,b) con las siguientes ventajas: brindan información acerca de los efectos letales y sub-letales debido a la exposición acumulativa y al estrés. Los datos obtenidos pueden ser interpretados en términos de la comunidad o el ecosistema, observando además los efectos de las mezclas complejas de contaminantes sobre organismos y poblaciones (Butterworth 1995; Manly, 1996). Además, tanto los biomarcadores como los biomonitores pueden incrementar su valor si son sensibles a cambios ambientales en más de uno de los tres medios de exposición (acuático, terrestre y atmosférico) y si se combinan estos sistemas pueden crearse sistemas puntuales sofisticados y múltiples que detecten en una única prueba una gama de riesgos ambientales de manera rápida y económica (Butterworth *et al.*, 1995; Butterworth *et al.*, 2000).

No obstante, algunos autores proponen el uso de pruebas de toxicidad con más de una especie presente, conocida como prueba de toxicidad multiespecie (Multiespecie Toxicity Test), ésta permite evaluar a nivel de sistema, población o comunidad, por lo que cada estudio facilita la predicción y estimación a través de modelos para evaluar los efectos causados por sustancias tóxicas sobre los mecanismos de competencia, depredación, estructura de la comunidad y el ecosistema (Simon *et al.*, 1998).

II.5 *Drosophila* como biomonitor

Un modelo de prueba utilizado recurrentemente en la genética toxicológica es la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*, la cual se ha empleado desde hace casi 100 años en la investigación genética, entre otros atributos, por su amplia distribución, llegando a ser un sistema experimental *in vivo* de suma importancia (Ramel y Magnusson, 1992). Por sus diversas ventajas, es un organismo ideal para el monitoreo de componentes químicos con actividad mutagénica, es también aplicable en programas de monitoreo concernientes a la detección de actividad genotóxica de compuestos químicos y mezclas complejas, aportando resultados principalmente en la determinación de efectos tanto en células germinales como en somáticas (Graf y Singer, 1992; Ramos *et al.*, 2000).

El éxito obtenido por este sistema *in vivo* se explica en parte por: un ciclo de vida corto, aproximadamente de 10 días a 25°C con 60% hr, además de que el medio de cultivo y mantenimiento de las cepas es de bajo costo y en cada generación se obtiene una numerosa descendencia (Muñoz, 1995).

Drosophila posee actividad metabólica con la que es capaz de transformar una gran variedad de xenobióticos (Graf *et al.*, 1984; Zijlastra y Vogel, 1988; Cederberg y Ramel, 1989), por lo que es considerada una valiosa especie no-mamífero para pruebas *in vivo* de químicos con actividad genotóxica (Zimmering *et al.*, 1987). Lo anterior es una ventaja más, ya que al igual que los mamíferos, *Drosophila* posee enzimas dependientes del sistema de citocromo P450, muy similar a la fracción enzimática S-9 del hígado de mamíferos (Frölich y Würigler, 1990; Muñoz, 1997; Feyereisen, 1999).

La prueba de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo (SLRLT) en *Drosophila* fue la primera usada de manera rutinaria en estudios de mutagénesis. La información proporcionada por esta metodología indica que *Drosophila* detecta un amplio espectro químico de compuestos tóxicos y distingue entre promutágenos y mutágenos (Vogel *et al.*, 1999). Alternativamente se han desarrollado otras metodologías para evaluar la inducción de: mutaciones letales dominantes (SLDLT); pérdida parcial y total de cromosomas sexuales (SCLT) y autosómicos (ALT); translocaciones; alteraciones en el huso mitótico e integridad de las células germinales; mutación puntual, delección, duplicación, intercambio y no disyunción de cromosomas, en células somáticas; y teratogénesis, entre otros eventos de interés toxicológico (Graf *et al.*, 1984; Lynch *et al.*, 1991; Zainullin *et al.*, 1992; Muñoz, 1995, 1997; Ramos *et al.*, 2000).

II.6 Evaluación de daño genotóxico en células somáticas.

La Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas de *Drosophila melanogaster* (SMART, por sus siglas en inglés: Somatic Mutation And Recombination Test), ha mostrado detectar un amplio espectro de compuestos genotóxicos (Graf *et al.*, 1992). Se basa en la identificación de eventos genéticos inducidos durante las divisiones mitóticas de los primordios celulares conocidos como discos imaginales, mismos que, durante la metamorfosis, darán origen a las estructuras corporales de la mosca adulta. Los eventos genéticos terminales que pueden asociarse con la modificación de la información genética de las células somáticas son: recombinación mitótica, mutación puntual, delección y en menor proporción no-disyunción (Vogel y Zijlstra, 1987; Vogel *et al.*, 1991; Frei y Würigler, 1988, 1995).

Entre las ventajas de esta prueba se encuentran que, en la actualidad, es uno de los pocos sistemas *in vivo* intactos y entre estos, es probablemente el de menor duración; es una metodología sensible y de bajo costo (Graf, 1984; Frei y Würigler, 1988; Ramel, 1992) que ofrece la posibilidad de administrar los compuestos a probar por diferentes vías de ingreso como: alimentación-contacto, inhalación o inyección (Cederberg y Ramel, 1989; Graf, 1984; Graf *et al.*, 1992).

Por el tipo de células que se analiza, se tienen dos versiones estándar: de los ojos y de las alas (Ramos, 1994; Ramos *et al.*, 2000). En la versión de SMART-ala, descrita por Graf *et al.* (1984), larvas heterocigotas para dos mutaciones autosómicas y recesivas que afectan la expresión de los pelos (o tricomas) a los que dan origen las células de los discos imaginales durante la metamorfosis, son expuestas a los genotóxicos potenciales. La pérdida de la heterocigosis en las células proliferantes de los discos imaginales puede favorecer la expresión recesiva de uno o ambos de los marcadores utilizados. Su amplificación durante la división celular, dará origen a un clon a partir de la célula afectada inicialmente. El número de divisiones restantes hasta el inicio de la metamorfosis determinará el tamaño del clon formado. Debido a que durante esta última, las células de las alas completan su diferenciación, el clon formado se observará como una mancha mutante en un contexto silvestre. En ausencia de retraso o muerte celular, la relación entre el tamaño de la mancha y el

tamaño del clon permite estimar el número de divisiones celulares que transcurrió a partir de la inducción del cambio (Graf *et al.*, 1984).

Actualmente con la Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART) versión ala, se han evaluado más de 400 compuestos (Vogel *et al.*, 1991). Además por las ventajas antes mencionadas que ofrece la prueba SMART, una de las aplicaciones exploradas en los últimos años, ha sido la detección de niveles ambientales de contaminación. Graf y Singer (1984), utilizaron la prueba para detectar efectos mutagénicos en extractos de partículas aéreas, Guzmán y Graf (1995), determinaron que la prueba puede ser usada para detectar genotóxicos en contaminantes aéreos y Ramos *et al.* (2000), analizaron la sensibilidad de la prueba SMART en la detección de actividad mutagénica en mezclas compuestas a partir de muestras de agua sin concentrar a partir de pozos de agua ubicados en el estado de Hidalgo, Mex.

Ramos *et al.* (2000), sugirieron que, con respecto al uso de SMART para un monitoreo continuo, ésta presenta ciertas desventajas; una de ellas es el número de alas por tratamiento que se ha establecido como óptimo para tomar decisiones significativas, el cual es de 116 alas (Frei y Würigler, 1995), lo que hace poco práctica la aplicación de la prueba SMART a programas de biomonitoreo, ya que el número de alas que debe revisarse se amplifica considerablemente. Ramos *et al.* (2000) propusieron que, en los casos de monitoreos continuos, usando la prueba SMART, se use un máximo de 80 alas por tratamiento. Además Dorantes, (2000), concluyó en su trabajo, que las comparaciones entre la frecuencia de manchas, el tamaño de mancha y el número de manchas por mosca entre las series experimentales y la testigo son indispensables para descartar falsos positivos y negativos en muestras ambientales. Sin embargo la prueba SMART presenta otra desventaja, y es que para aplicarla es necesario un entrenamiento prolongado previamente.

Una alternativa para obtener información inicial acerca del efecto de posibles genotóxicos, con una inversión aceptable de tiempo y esfuerzo, es usar la sobrevivencia de los individuos al tratamiento como un análisis exploratorio, lo que permitiría detectar aquellas muestras que pudieran representar un potencial

genotóxico y que a través de este análisis se obtuviera la pauta para aplicar la prueba SMART u otras (Ramos *com.pers.*).

Por otro lado, aunque *Drosophila* ha sido caracterizada para una variedad de eventos genéticos de interés y se han establecido diversas metodologías confiables para estudios de mutagénesis utilizando a este organismo, no se dispone de información acerca de la capacidad de este organismo para responder a variaciones en la composición de muestras ambientales sin concentrar. Dada la versatilidad de este díptero para detectar posibles genotóxicos en un medio acuático, terrestre o aéreo, se plantea el presente estudio que tiene los siguientes objetivos:

III. OBJETIVOS

Determinar la validez del índice de sobrevivencia como indicador preliminar de daño genotóxico en *Drosophila melanogaster*.

III.1 Particulares

- Utilizar al sistema *in vivo* de *Drosophila melanogaster* como un modelo para establecer la posible actividad genotóxica de muestras ambientales no concentradas.
- Determinar si existen diferencias en cuanto a la respuesta de genotoxicidad de moscas libres (*fir3/mwh*) y portadoras de inversiones cromosómicas (*TM3,Ser/mwh*).
- Comparar la variación del I.S con la variación en la respuesta de genotoxicidad.

IV. HIPÓTESIS

Si el índice de sobrevivencia muestra variaciones que están relacionadas con la actividad genotóxica, entonces éste podría utilizarse como valor pronóstico de la genotoxicidad de una muestra.

Para este estudio se eligió al Campo geotérmico Los Azufres, ubicado en el Estado de Michoacán como sitio de muestreo.

V. Sitio de muestro

El campo geotérmico de "Los Azufres" se encuentra en la Sierra de San Andrés, al noroeste del estado de Michoacán a 200 km, al sur de la Cd. de México y a 100 km de la Cd. Morelia, Mich., se encuentra a una altura de 2800 msnm y abarca una extensión de 60Km². Pertenece a la provincia conocida como Cinturón Volcánico Mexicano, siendo uno de los centros silíceos más importantes de esta provincia (López, 1991).

La generación de electricidad y la explotación del campo geotérmico "Los Azufres", comenzó en 1982 y actualmente, después de campo geotérmico de "Cerro Prieto", es la segunda fuente de energía geotérmica en la República Mexicana, y el primero en producir electricidad a partir de fluidos geotérmicos contenidos en roca volcánica fracturada. En total se han instalado 98 MWe por la Comisión Federal de Electricidad (C.F.E.). Los pozos que se han perforado tienen una profundidad que varía entre 600 y 3500 metros; la mayoría se ubica en las dos zonas de descarga de vapor (al norte Marítaro y al sur Tejamaniles) (Editorial, 1991; López, 1991; Izquierdo, 1993; Verma *et al.*, 1998; Cadenas, 1999).

El campo geotérmico "Los Azufres", es un yacimiento hidrotermal asociado a un complejo volcánico. La disposición de minerales de alteración hidrotermal el cual presenta una geometría cómica del reservorio, consiste en un yacimiento principal profundo que descarga, por convección fluidos ascendentes (Viggiano, 1991a,b). A más de 1800 metros de profundidad aparece una continuidad de alteración hidrotermal uniendo a las regiones Marítaro y Tejamaniles (Editorial, 1991). Las fallas más importantes en la zona son: *El Chinapo, Los Azufres, Agua Fría, Laguna Larga, El Chino, La Cumbre, Marítaro y Coyotes* (López, 1991).

Debido a la actividad geotérmica y a las condiciones ambientales que prevalecen de manera local, los cuerpos de agua pueden variar en carácter desde agua dulce hasta altamente corrosiva y salina. Las especies químicas en los efluentes pueden dividirse de acuerdo a su concentración como:

“Especies mayores” (>10,000 ppm): cloruros, sulfatos, sodio, calcio, magnesio, potasio y bicarbonato;

“Especies secundarias” (1000 ppm): aluminio, hierro, bromuros, manganeso, estroncio, carbonato, sílice, amoníaco y boro;

“Especies menores” (1 ppm): arsénico, bario, cadmio, cesio, cobre, fluoruros, ácido sulfhídrico, yoduros, lantano, plomo, litio, mercurio, níquel, nitratos, fosfatos, rubidio, plata, zinc y zirconio;

“Especies traza” (<0.01 ppm) en aguas geotérmicas destacan; berilio, uranio, vanadio, selenio, galio, telurio, titanio, entre otras (Barragán y Arellano, 1993).

De manera general, los sólidos totales disueltos en aguas de origen geotérmico exceden los rangos recomendados tanto para el consumo humano como para la irrigación como se muestra en la tabla IV.

Tabla IV. Comparación de diferentes tipos de agua, con los rangos mínimos y máximos de las principales especies químicas en agua geotérmica.

Especie	Agua para el consumo humano	Agua para la irrigación de cultivos	Agua de mar	Agua geotérmicas	En concentraciones máximas (ppm) de aguas geotérmicas
	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	
Arsénico	<0.05	<0.05	0.02	0-12	*
Bario	<1.0	-	0.05	0-250	*
Bicarbonato	-	-	-	0-10000	
Boro	-	<2.0	4.6	0-1200	*
Cadmio	<0.01	-	-	0-1	*
Calcio	-	-	400	0-63000	
Cloruro	250	350	19000	0-240000	
Cobre	1	1	-	0-10	*
Fluoruro	<2.2	-	1.4	0-35	*
Hierro	0.3	-	0.02	0-4200	
Plomo	<0.05	-	-	0-200	*
Magnesio	-	-	1270	0-39000	
Manganeso	0.05	-	-	0-2000	
Nitrato	45	-	0.7	0-35	
Selenio	<0.01	-	-	Traza	
Plata	<0.05	-	-	0-2	
Sodio	-	-	10600	0-80000	
Sulfato	250	1000	2650	0-84000	
Zinc	5	-	-	0-970	*
Sólidos totales	500	1500	34500	0-390000	
Amoníaco	-	-	0.05	0-1400	*
Ac. Sulfhídrico	-	-	60	0.2-74	*
Dióxido de Azufre	-	-	-	0-31(% vol.)	*
Mercurio	-	-	-	0.007-40.7(ppb)	*

(*) concentraciones que son tóxicas en los seres vivos. (Barragán & Arellano,1993).

En cuanto a los constituyentes geotérmicos, estos corresponden a dióxidos de silicio, sodio, potasio, cloro, boro, calcio, bicarbonatos y arsénico, como componentes de aguas separadas; entre los gases asociados al vapor se encuentran: dióxido de carbono en un 97.5%, ácido sulfhídrico en un 2.0%, amoníaco, oxígeno y metano, así mismo se ha registrado que por cada MWe producido se emiten a la atmósfera 340 kg/h de CO₂ y 3 kg/h de H₂S (Peralta, 1995, Verma *et al.*, 1998).

En cuanto a la explotación de energía eléctrica a través de la geotérmica, algunos autores consideran que es una de las actividades menos riesgosas para el ambiente, comparandola con la extracción de petróleo o el aprovechamiento de la energía nuclear (Brophy, 1997).

Armannsson y Kristmannsoorttir (1992), mencionan que el impacto ambiental por la explotación de energía geotérmica está relacionado con el incremento de elementos y compuestos toxicológicamente relevantes como son el H₂S, As, B, Hg. y los radionúclidos. El aumento en las concentraciones o la acumulación de estos constituyentes causa daño en los seres vivos del lugar. Peralta *et al.* (1993), reportan daños observados en líquenes pertenecientes al Campo Geotérmico de "Los Azufres" debido a las emisiones atmosféricas de vapor por los pozos de extracción; los síntomas corresponden a la exposición al dióxido de azufre (35 ppb) y al azufre (780-1400 ppm). Con respecto al arsénico, aunque se encuentra principalmente en el agua separada, sólo una pequeña porción se presenta en el vapor. De los resultados que reportan concluyen que la concentración de este elemento es alta, debido a la acumulación que va de 14.32 a 0.662 ppm en las especies de líquenes.

Aunque se han realizado diversos trabajos en esta zona de actividad geotérmica, no se dispone de reportes sobre la posible actividad genotóxica de las sustancias de interés ambiental y menos aún de la interacción de varias de ellas en lo que se conoce como mezcla compleja.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. Trabajo de campo:

El trabajo de campo se realizó del 27 de febrero al 3 de marzo de 1999. A partir de una visita preliminar se seleccionaron 7 sitios asociados con actividad geotérmica y/o altas concentraciones de azufre y diversos metales, por lo que era de suponerse que serían potencialmente tóxicas (figura 1). Estos fueron: dos salmueras de pozos de extracción de vapor y agua de la CFE; "Pozo Az 26" (1) y "Pozo Az 56" (2); dos manantiales sulfurosos: "Los Azufres" (3) con un diámetro aproximado de 48 m² y el manantial denominado "Yacuzi" (4); un cuerpo de agua que se encuentra a 28.30 m del manantial sulfuroso "Los azufres" denominado "El pozo" (5), con una profundidad aproximada de 4.25 m. y dos cuerpos de agua dulce: "Tejamaniles" (6) y "Llano grande" (7).

Se colectó agua a partir de un arrastre usando un recipiente de 20 L y una cuerda de 50 m de la siguiente manera; se arrojaba el recipiente a unos 30 m de distancia a partir de la orilla de cada sitio, y posteriormente era arrastrado a partir del momento en que se sumergía completamente, una vez que llegaba a la orilla rápidamente se levantaba evitando lo más posible que el sedimento y el agua de la orilla entraran al recipiente. El contenido se vertía en frascos de polipropileno limpios con capacidad de 1/2 y 1 L, previo registro de la temperatura, pH, oxígeno disuelto (m/L) y sólidos disueltos (mS), utilizando un aparato para análisis de parámetros fisicoquímicos (Mod. Check-mate 90, USA. Corning Incorporated CE). Las muestras de trasladaron al laboratorio en una cama de hielo.

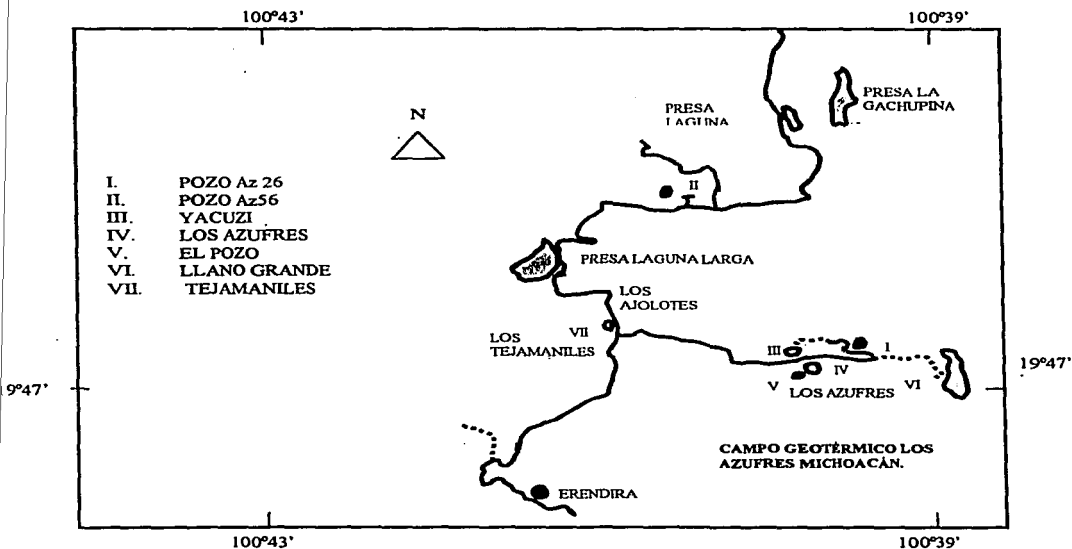


Figura 1. Mapa de localización del Campo Geotérmico Los Azufres, ubicando con números romanos los sitios de muestreo en la zona.

VI.2. Trabajo de laboratorio:

VI.2.1 Cruza:

Con base en el protocolo propuesto por Graf *et al.*, (1984), se emplearon dos líneas mutantes de *Drosophila melanogaster* para la cruce progenitora: hembras vírgenes *fir3/TM3, Ser* y machos *mwh/mwh*. El marcador *mwh* (multiple wing hairs) es autosómico recesivo y está ubicado en el brazo izquierdo del cromosoma 3 a 0.3 μm [entre *fap* y *ru*]; el marcador afecta los tricomas (pelos) de todo el cuerpo y a partir de las células de las alas, causa tricomas supernumerarios (grupos de 2 a 7 pelos ó más, en vez de uno por célula como en el fenotipo silvestre). El marcador *fir³* (*flare-3*), está localizado también en el cromosoma 3 a 38.8 μm [con respecto a *h* y *th*]; en este marcador los tricomas son transformados en múltiples y pequeños crecimientos irregulares los cuales aparecen como abultamientos; en condición homocigótica, el marcador es letal (Lindsley y Zimm, 1992; Graf *et al.*, 1984), por lo que para mantenerlo se requiere del uso de un cromosoma balanceador. El cromosoma balanceador *TM3,Ser* [*In(3LR)-TM3,y⁺ ri p^o sep bx^{34o} e^s Ser*] (third multiple), que fue construido incluyendo múltiples inversiones pericéntricas que involucran a gran parte del cromosoma 3, impide recobrar productos viables de entrecruzamientos entre los cromosomas homólogos, estabilizando de esta manera al alelo *fir³*; además, su presencia se distingue porque contiene al marcador *Ser* (Serrate) originalmente localizado a 3-91.9 μm y el cual, al ser dominante permite reconocer a los organismos portadores, quienes muestran las alas con bordes discontinuos; También es un gen letal en condición homocigótica, por lo que en cada generación sexual se establece un sistema de letales balanceados y sólo se recobran organismos heterocigotos *fir³/Ser* (Graf *et al.*, 1984; Lindsley, 1992; Muñoz, 1995).

De la cruce entre hembras *fir³/TM3,Ser* y machos *mwh/mwh* se obtienen dos tipos de progenie: moscas trans-heterocigas libres de inversiones + *fir³/mwh+* y moscas portadoras de múltiples inversiones *TM3,Ser/mwh+* (Graf *et al.*, 1984; Ramos *et al.*, 2000); en el estado larvario no se distinguen entre sí, por lo que ambos tipos de progenie se exponen al posible agente genotóxico (Graf *et al.*, 1984).

Los eventos de mutación puntual, recombinación y no disyunción pueden conducir a la pérdida del alelo dominante (silvestre), es decir, a la pérdida de la heterocigosis, lo que permite la expresión de uno o ambos genes recesivos. Las divisiones mitóticas sucesivas darán origen a una mancha en la cutícula del ala del adulto, la cual podrá ser clasificada como: simple chica (1 o 2 tricomas o células), o simple grande (con 3 o más tricomas) cuando están formadas por un tipo de tricoma mutante, ya sea *mwh* o *flr³*; y en manchas gemelas, cuando ambos marcadores aparecen formando parte de la misma mancha (figura 2).

Las manchas simples y gemelas pueden observarse en moscas libres de inversiones, en tanto que las moscas portadoras del cromosoma balanceador solo muestran manchas simples, debido a que en ellas no se recobran eventos originados por recombinación (Graf *et al.*, 1984; Frei y Würgler 1988; Frölich y Würgler, 1990; Delgado *et al.*, 1998; Ramos *et al.*, 2000).

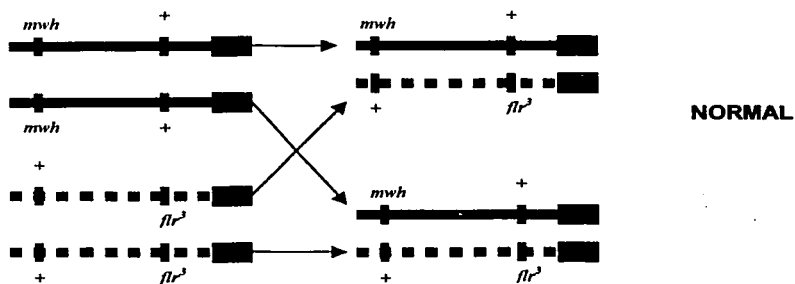


Figura 2. Eventos genéticos que detecta la prueba SMART (Modificado por Graf *et al.*, 1984).

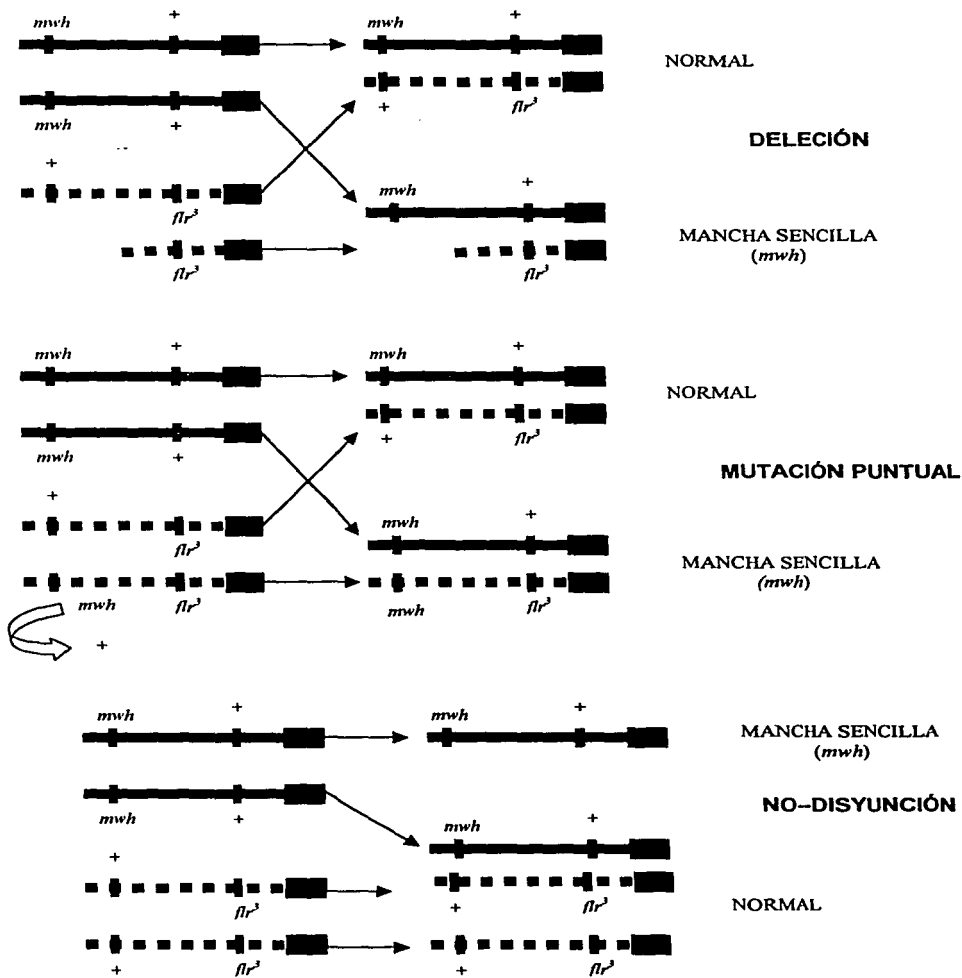


Figura 2 (continuación). Eventos genéticos que detecta la prueba SMART (Modificado por Graf et al., 1984).

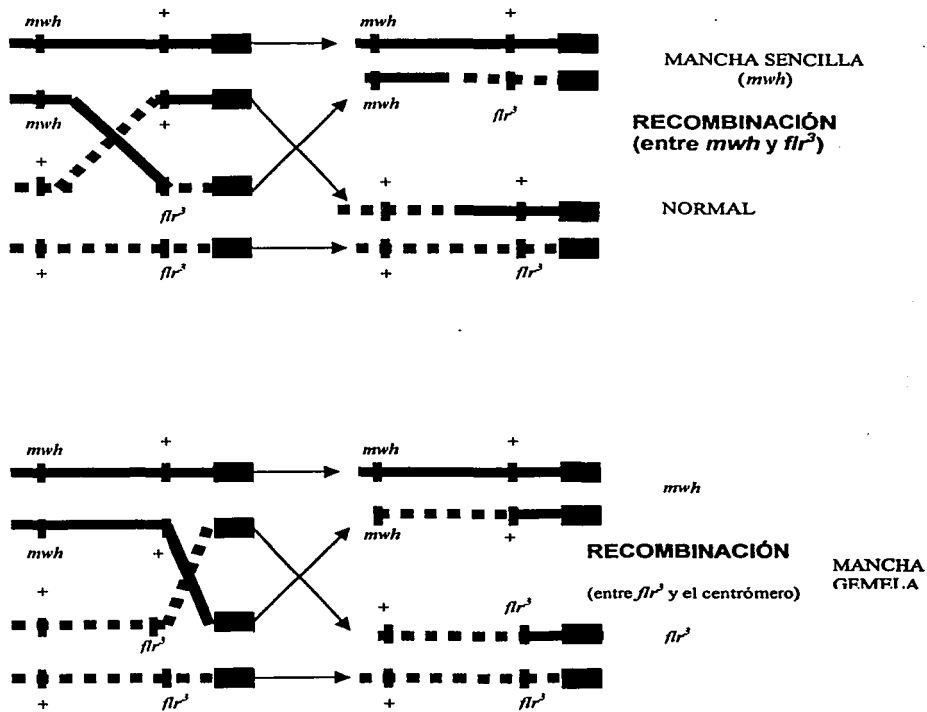


Figura 2 (continuación). Eventos genéticos que detecta la prueba SMART (Modificado por Graf *et al.*, 1984).

VI.2.2 Obtención de larvas

A las 48 h de realizada la cruce se sincronizó el cultivo para la obtención de las larvas que serían tratadas. Para esto, los progenitores se transfirieron a frascos con medio fresco enriquecido con levadura para colectar huevos por un período de 8 h, después de lo cual se regresó a los progenitores a sus frascos originales y se esperó a que los huevos recuperados se desarrollaran en larvas, mismas que a los tres días tendrían una edad de 72 ± 4 h.

Las larvas se extrajeron de los frascos mediante la formación de una solución concentrada de sacarosa al 20 %, como describe Nöthiger (1970). Las larvas se colocaron por grupos de 100 a 150 en tubos homeopáticos de 15 ml de capacidad que contenían 1 g de medio instantáneo para mosca (Carolina Biological Supply Company, Burlington, N.C.) y 5 ml de la solución de prueba o de agua destilada (Graf, 1984). A partir de la muestra de agua colectada en el campo geotérmico se obtuvieron las siguientes concentraciones, por diluciones consecutivas: 100, 50, 32, 25, 12.5, 10, 6.3, 1.6, 0.8 y 0.4 %. Como diluyente y testigo negativo se usó agua destilada. Los tubos se taparon con un tapón de hule espuma y se esperó a que los adultos emergieran. Posteriormente las moscas recobradas se fijaron en alcohol etílico al 70% (figura 4).

VI.2.3 Registros

Se registró el número de hembras y machos con alas de tipo silvestre [$flr^3+/mwh+$] y con alas con los bordes discontinuos o moscas con alas Serrata [$TM3,Ser/mwh$]. El índice de sobrevivencia (I.S.) se estimó a partir de ambos tipos de moscas recobradas en los diferentes tratamientos y utilizando realizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\sum_{i=1}^n \text{experimental}}{\sum_{i=1}^n \text{control}} = \text{I.S. } (i) \times$$

El índice de sobrevivencia para hembras o machos (i), en cada dilución probada (x), se expresa con el error estándar obtenido a partir de las repeticiones realizadas.

Este IS se calcula para la serie experimental y para la repetición correspondiente. Una vez que se obtienen los valores del IS para cada concentración se obtiene el IS promedio de cada una de las concentraciones, tanto para la progenie *fir3/mwh* como para la *TM3*, *Ser/mwh*, y se obtiene el error estándar del IS. Cabe mencionar que en ocasiones el IS de algunas diluciones experimentales resulta mayor que el del lote testigo. Esto se explica de la siguiente manera: la cantidad de larvas que se coloca en cada tubo es aproximadamente la misma y no se hace una cuantificación precisa ya que la manipulación de las larvas debe ser mínima. Así, en aquellos casos en que se obtuvieron valores por encima del testigo (por ejemplo: un I.S.= 1.2, el valor se tomó como I.S. = 1), ésto bajo el criterio de que en estos lotes no se presentó un efecto negativo en la sobrevivencia.

VI.2.4 Determinación del potencial genotóxico

Para evaluar el potencial genotóxico en las muestras, sólo se utilizaron las moscas recobradas de los tratamientos con agua de "Llano Grande" y "Los Azufres".

Se elaboraron 2 laminillas por concentración con las alas de 20 hembras y 20 machos cada una, tanto a partir de moscas libres como de portadoras de inversiones cromosómicas, el procedimiento para montar las preparaciones se tomó de Graf *et al.* (1984), utilizando solución de Fauré (30 mg de goma arábica, 20 ml de glicerol, 50 mg de hidrato de cloral y 50 ml de agua).

Al examinar las preparaciones en el microscopio óptico a 40X se registró el número de manchas, tipo de mancha y sector del ala en el que se observaron dichas manchas.

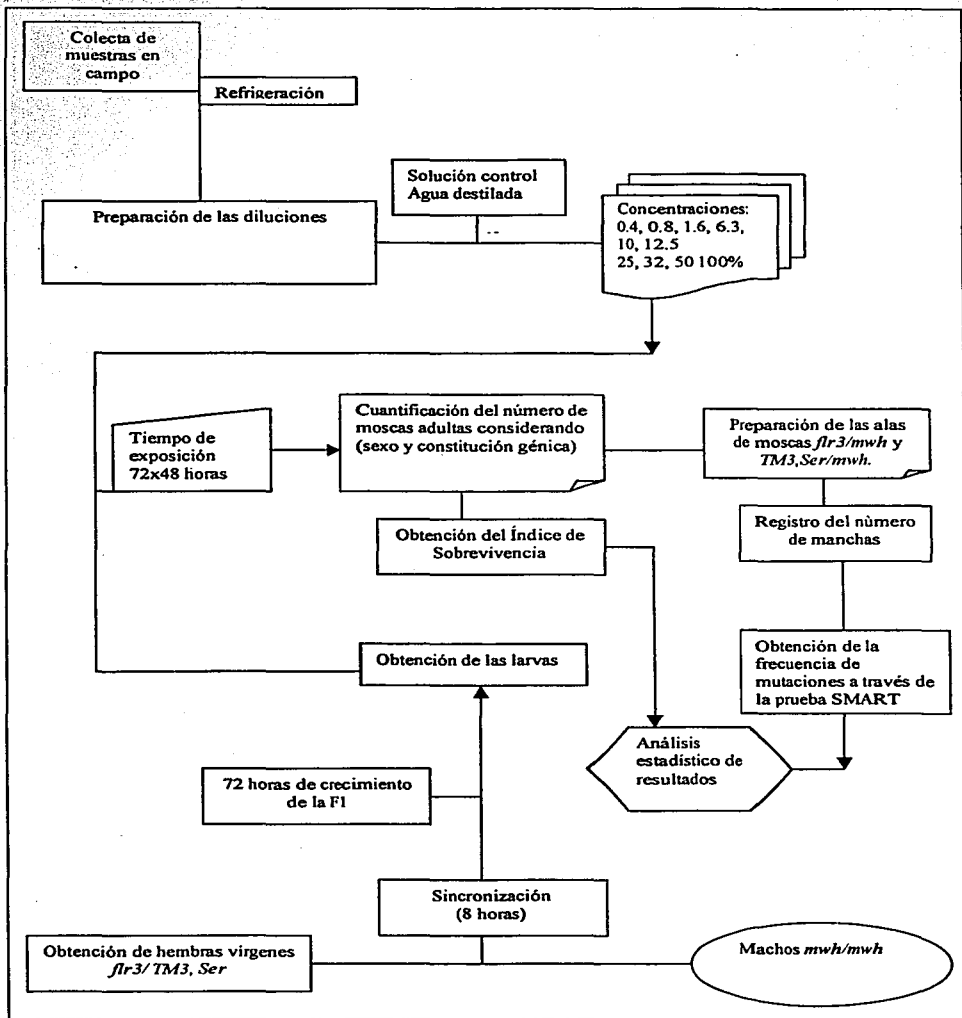


Figura 4. Diagrama de flujo del método utilizado en el presente trabajo.

VI.2.5 Análisis de la prueba SMART

A. Para establecer si existen diferencias significativas entre la frecuencia de manchas de las series testigo y experimental se contrastan dos hipótesis:

- H_0 : la frecuencia de manchas de las series testigo y experimental no muestran diferencias significativas.
- H_1 : la frecuencia de manchas en la serie experimental es igual a m veces la frecuencia de manchas en el testigo, donde m es la magnitud en la que debe incrementarse la frecuencia de manchas testigo y se establece con base en la ocurrencia espontánea de cada tipo de mancha. Así $m=2$ (para manchas totales y chicas), debido a que son más comunes y $m=5$ (para machas grandes y gemelas), ya que se trata de eventos raros (Graf *et al.*, 1984; Frei y Würgler, 1988).

Los datos obtenidos son analizados mediante el programa de cómputo Somatic Mutation and Recombination Test (SMART), con el cual se comparan las frecuencias de manchas obtenidas en las series experimentales y la testigo mediante el procedimiento de decisión múltiple, basado en la prueba no paramétrica χ^2 ([Würgler no publicado] en Graf *et al.*, 1984; Frei y Würgler, 1988,1995). Ya que las múltiples inversiones que presenta el cromosoma balanceador tienen como efecto evitar la recuperación de eventos de recombinación viables, si se compara el número de manchas obtenidas a partir de la progenie libre de inversiones con la frecuencia de moscas portadoras de inversiones, puede estimarse la contribución de la recombinación a la frecuencia de manchas totales recobradas (Graf *et al.*, 1984; Muñoz, 1995; Amrani *et al.*, 1999).

B. El análisis cualitativo de la distribución del tamaño de mancha; estima el número de divisiones celulares que se requeriría para producir una mancha del tamaño recobrado y, en consecuencia, establece el tiempo en el que se originó la mancha durante el desarrollo de la mosca; por ejemplo, si el evento ocurre tempranamente durante el desarrollo la mancha producida será de mayor tamaño que si éste se presenta hacia el final del desarrollo (figura 3). Así, la aparición de manchas grandes sugiere una actividad genotóxica temprana. Este análisis ayuda a

descartar las respuestas negativas falsas, ya que la ausencia de efecto no debe interferir con el patrón de distribución del tamaño de la mancha que se presenta en el lote testigo negativo.

- C. El número de manchas por mosca es una estimación de la diferente susceptibilidad que caracteriza a los individuos de toda población biológica. Cuando organismos genéticamente similares son expuestos ante el mismo estímulo (genotóxico), algunos muestran evidencias marcadas de la exposición al genotóxico, mientras que otras muestran poco o ningún efecto aparente. En el caso de *Drosophila*, mientras que algunas moscas no presentan manchas en sus alas, aún en presencia del genotóxico, otras muestran una o incluso un número elevado de éstas. Podría suponerse que aquellas moscas que muestran manchas múltiples representan algún sector particular de la población, el cual, por su sensibilidad puede ser sumamente útil en la detección de efectos tempranos en la toxicología genética. El análisis estadístico se realiza mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, con la que se compara la dispersión en la distribución del número de manchas por mosca a partir de las series experimentales y de la testigo (Graf *et al.*, 1984; Steel *et al.*, 1997; Rao, 1998 en Ramos *et al.*, 2000).

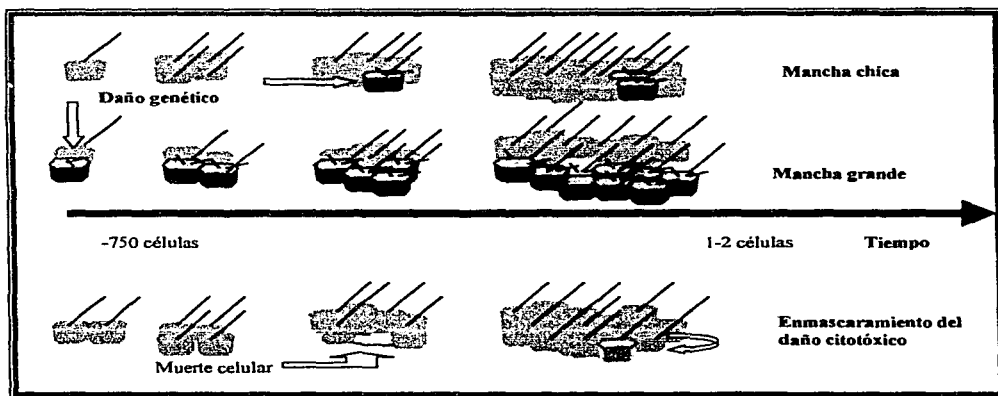


Figura 3. Formación de manchas (Clones celulares alterados) durante el desarrollo del ala en *Drosophila melanogaster*.

VI.2.6 Análisis de resultados

Para establecer si se obtuvieron diferencias significativas en los resultados de supervivencia, se usó la prueba de varianza ANOVA de dos vías, seguido por el método de comparación múltiple de Turkey (Zar, 1987).

En cuanto a la prueba de mutación, se determinó la existencia de diferencias significativas entre las frecuencias de manchas obtenidas en los tratamientos y el lote testigo utilizando el procedimiento de decisión múltiple de Frei y Würigler, (1988) y el programa de cómputo SMART (Würigler, no publicado; Graf, *et al*, 1984), El cual agrupa las manchas celulares (alteraciones *fir*³; *mwh*) en tres diferentes categorías:

- (1) manchas simples *chicas* (1 o 2 células);
- (2) manchas simples *grandes* (3 o más células) y;
- (3) manchas *gemelas* (*fir*³ / *mwh*).

A partir de resultados obtenidos en la SMART se obtuvo alguno de los siguientes diagnósticos con respecto a la diferencia en la frecuencia de manchas: positivo, débil positivo, indeterminado o negativo, tanto para manchas chicas, grandes, gemelas o totales. Además se elaboraron las curvas para la frecuencia de manchas totales, la proporción de manchas por mosca y la frecuencia de células por mancha (Graf, 1984; Frei y Würigler, 1995). La prueba no paramétrica de Kruskal Wallis y la comparación múltiple de Dunn, se utilizaron para analizar la dispersión entre las distintas distribuciones. Posteriormente se realizó una correlación entre el Índice de Supervivencia y la frecuencia de manchas totales para los sitios Llano grande y Los Azufres, obteniendo el Coeficiente de Relación (*r*) de Pearson.

VII. RESULTADOS

VII.1 Trabajo de campo

Los datos fisicoquímicos correspondientes a temperatura, pH, oxígeno (ml/L) y sólidos disueltos (mS) de los sitios donde se obtuvieron las muestras se presentan en la tabla V.

Tabla V. Parámetros físico químicos registrados en los diferentes sitios de muestreo en el campo geotérmico Los Azufres.

SITIO	Temp. en la muestra de agua(°C)	pH	oxígeno disuelto (ml / lt)	sólido disueltos (mS)
Pozo Az 26	45.9	6.99	2.4	8.78
Pozo Az 56	35.4	6.56	0.7	*
Yacuzi	38.6	2.5	0.3	0.1
Los Azufres	28.1	2.83	*	1601
Pozo	29	2.64	0.5	0.0
Llano Grande	15.9	6.52	2.9	70.2
Tejamaniles	13.85	7.29	*	*

* sin registro.

En los sitios que corresponden a las salmueras de la CFE se registraron valores de temperatura por arriba de los 30°C; en cuanto que los manantiales sulfurosos o cuerpos de agua asociados a la actividad geotérmica presentaron un intervalo de 28 a 38°C; finalmente, las temperaturas que se obtuvieron para los cuerpos de agua no asociados a la actividad geotérmica variaron entre 13.8 a 15.9 °C.

En cuanto al pH de los cuerpos de agua asociados a la actividad geotérmica osciló de 2.5 a 2.8, el pH que se presentó en las salmueras fue de 6.5 a 6.9 y el registrado en las muestras de agua de las lagunas fue de 6.5 (Llano grande) y 7.29 en (Tejamaniles). Cabe enfatizar que el pH registrado en Los azufres fue el que mostró mayor acidéz, inclusive que el de las salmueras.

De los siete sitios del estudio, sólo en 5 de éstos se obtuvieron los registro de oxígeno y sólidos disueltos, respectivamente. En las salmueras, el oxígeno disuelto fue de 2.4 y 0.7 ml/L; en los manantiales fue de 0.5 y 0.3 ml/L para el Pozo y el Yacuzi, respectivamente, y en sitio Llano grande fue de 2.9 ml/L. Finalmente, los registros de conductancia variaron de 8.7 mS en el Az 56, 1601 mS en Los Azufres, 0.1 mS y 70.2 mS en Yacuzi y Llano grande respectivamente, y 0.0 mS en el Pozo.

VII.2 Trabajo de laboratorio

VII.2.1 Índice de Supervivencia

El índice de supervivencia (IS) obtenido en los organismos expuestos a las diferentes diluciones de agua provenientes de los sitios de muestreo (ver tabla VI).

Tabla VI. Índice de supervivencia (promedio \pm error estándar) de moscas (*flr3/mwh*) y moscas (*TM3,Ser/mwh*) obtenido a partir de cada una de las diluciones probadas de las muestras de los 7 sitios seleccionados del Campo Geotérmico; Los Azufres, Michoacán.

% de la muestra original	Pozo Az 26	Pozo Az 56	Los Azufres	Yacuzi	Pozo	Tejamaniles	Llano grande
Moscas <i>flr3/mwh</i>							
H ₂ O dest.	1.00 \pm 0.0	1.00 \pm 0.0	1.00 \pm 0.0	1.00 \pm 0.0	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
0.4	0.94 \pm 0.00	0.92 \pm 0.5	-----	0.92 \pm 0.21	0.65 \pm 0.45	0.89 \pm 0.06	0.78 \pm 0.15
0.8	0.85 \pm 0.06	1.00 \pm 0.00	-----	0.84 \pm 0.19	0.75 \pm 0.02	0.69 \pm 0.21	0.76 \pm 0.15
1.6	0.83 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	0.87 \pm 0.21	0.82 \pm 0.50	1.00 \pm 0.00	0.78 \pm 0.23
6.3	0.52 \pm 0.63	1.00 \pm 0.00	0.79 \pm 0.36	1.00 \pm 0.0	0.70 \pm 0.15	0.61 \pm 0.27	0.89 \pm 0.00
10	0.95 \pm 0.06	0.50 \pm 0.70	1.00 \pm 0.00	0.68 \pm 0.10	0.62 \pm 0.47	0.83 \pm 0.26	0.86 \pm 0.00
12.5	0.72 \pm 0.21	0.97 \pm 0.07	1.00 \pm 0.00	0.90 \pm 0.05	0.80 \pm 0.04	0.99 \pm 0.00	0.73 \pm 0.37
25	0.79 \pm 0.12	0.36 \pm 0.40	0.87 \pm 0.14	0.71 \pm 0.15	0.90 \pm 0.00	0.89 \pm 0.18	0.72 \pm 0.33
32	0.50 \pm 0.70	0.27 \pm 0.11	0.90 \pm 0.18	0.68 \pm 0.30	0.76 \pm 0.16	0.85 \pm 0.24	0.79 \pm 0.00
50	0.10 \pm 0.05	0.01 \pm 0.03	1.00 \pm 0.00	0.95 \pm 0.07	0.81 \pm 0.06	0.89 \pm 0.24	0.87 \pm 0.07
100	0.00 \pm 0.0	0.00 \pm 0.00	0.92 \pm 0.14	0.85 \pm 0.16	0.59 \pm 0.02	0.97 \pm 0.06	0.62 \pm 0.39
Moscas <i>TM3,Ser/mwh</i>							
H ₂ O dest.	1.00 \pm 0.0	1.00 \pm 0.0	1.00 \pm 0.0	1.00 \pm 0.0	1.00 \pm 0.0	1.00 \pm 0.0	1.00 \pm 0.0
0.4	0.98 \pm 0.02	0.90 \pm 0.19	-----	0.73 \pm 0.17	0.80 \pm 0.15	0.76 \pm 0.18	0.65 \pm 0.15
0.8	0.89 \pm 0.20	1.00 \pm 0.00	-----	0.66 \pm 0.38	0.69 \pm 0.06	0.98 \pm 0.12	0.66 \pm 0.27
1.6	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	0.82 \pm 0.17	0.80 \pm 0.20	0.92 \pm 0.14	0.81 \pm 0.23
6.3	0.45 \pm 0.47	1.00 \pm 0.00	0.89 \pm 0.14	1.00 \pm 0.00	0.77 \pm 0.11	0.71 \pm 0.22	0.84 \pm 0.14
10	0.63 \pm 0.24	0.50 \pm 0.57	0.99 \pm 0.01	0.54 \pm 0.23	0.68 \pm 0.25	0.83 \pm 0.28	0.65 \pm 0.10
12.5	0.67 \pm 0.23	1.00 \pm 0.00	0.94 \pm 0.10	0.58 \pm 0.07	0.74 \pm 0.14	0.92 \pm 0.12	0.79 \pm 0.25
25	0.67 \pm 0.38	0.13 \pm 0.20	0.79 \pm 0.31	0.70 \pm 0.23	0.82 \pm 0.17	0.83 \pm 0.12	0.58 \pm 0.13
32	0.19 \pm 0.22	0.07 \pm 0.05	0.90 \pm 0.13	0.68 \pm 0.19	0.82 \pm 0.16	0.96 \pm 0.07	0.70 \pm 0.24
50	0.07 \pm 0.11	0.00 \pm 0.00	0.79 \pm 0.21	0.75 \pm 0.16	0.79 \pm 0.26	0.91 \pm 0.16	0.93 \pm 0.12
100	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.94 \pm 0.10	0.84 \pm 0.28	0.70 \pm 0.15	0.82 \pm 0.22	0.58 \pm 0.04

Se muestran en negritas los valores mínimos y máximos para cada sitio.
No determinado (-----)

Se determinó, mediante un ANOVA de dos vías que no existen diferencias significativas en el índice de supervivencia con respecto al sexo, ni con la presencia

de inversiones múltiples del cromosoma balanceador *TM3* (moscas con genotipo *flr3/mwh* y *TM3,Ser/mwh*) ($P > 0.05$); Sin embargo, sí se encontraron diferencias en los índices de sobrevivencia obtenidos a partir de muestras de los diferentes sitios (ver tabla VII) y de las diluciones probadas ($P < 0.05$).

Tabla VII. Comparación de los índices de sobrevivencia obtenidos en los sitios de muestreo, para los datos de Índice de sobrevivencia de cada sitio de muestreo, mostrando con (*) la significancia de la prueba.

Localidades	Pozo z26	Pozo Az 56	Los Azufres	Yacuzi	El Pozo	Tejamaniles	Llano Grande
	0.629	0.621	0.911	0.808	0.777	0.877	0.773
Pozo Az 26		ND	***	**	*	***	**
Pozo Az 56	ND		***	*	*	***	*
Los Azufres	***	***		ND	*	ND	*
Yacuzi	**	***	ND		ND	ND	ND
El Pozo	*	*	*	ND		ND	ND
Tejamaniles	***	***	ND	ND	ND		ND
Llano grande	**	*	*	ND	ND	ND	

ANOVA de dos vías y Comparación Múltiple de Turkey; (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.001$; (***) $P < 0.0001$. (ND) no diferencias.

Las relaciones entre los diferentes índices de sobrevivencia se muestran en el siguiente diagrama. Dos sitios se muestran unidos con una línea cuando no se encontraron diferencias significativas entre ellos, ni a través del análisis de comparación múltiple Turkey (figura 5).

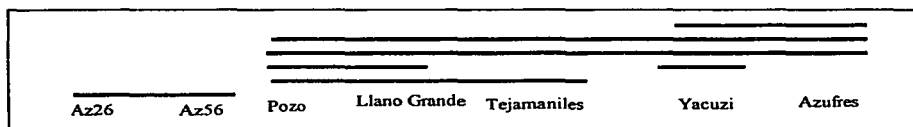


Figura 5. Diferencias en el índice de sobrevivencia.

Se encontraron tres grupos:

1. El primero, formado por los sitios Az26 y Az56, que se caracterizaron por ser claramente tóxicos (figura 6 a y b). En ambos casos, la sobrevivencia fue

menor al 50% en organismos expuestos a las concentraciones del 32 y 25 % respectivamente.

2. El siguiente grupo lo forman los sitios: El Pozo y Llano Grande, en los cuales la sobrevivencia fue de cercano al 50 % de los organismos expuestos a la muestra sin diluir (100%) (figura 7 ay b).
3. El ultimo grupo está formado por los sitios: Los Tejamaniles, Yacuzi y Los azufres, en los cuales la sobrevivencia fue cercano al 85% de los organismos expuestos a muestras sin diluir (100%) (figura 8 a, b y c).

Es importante señalar que en todas las series experimentales se observó un comportamiento peculiar con respecto al índice de sobrevivencia obtenido a partir de los organismos expuestos a diluciones bajas, cercanas al 25% de las muestras originales y que consistió en la obtención de valores de sobrevivencia menores al testigo, asociados con bajas concentraciones. Este no se presentó cuando organismos similares fueron expuestos durante su desarrollo a concentraciones mayores. Es importante señalar que en esta respuesta no existió una diferencia evidente entre organismos portadores y libres de inversiones cromosómicas .

VII.2.2 Inducción de daño en células somáticas.

Una vez obtenido el Índice de Supervivencia, se seleccionaron dos sitios: Por un lado Llano grande, no está asociado a la actividad geotérmica de la zona, tiene baja afluencia de turismo (se encuentra algo retirado y es poco conocido) y presenta una diversidad de flora y fauna claramente mayor a la que se encontró en los otros sitios (aunque no se elaboraron listados de ésta). Aunque previo al IS se había seleccionado a este sitio como un "testigo" o "sitio de referencia" por estar aparentemente libre de contaminación. El IS de los organismos de los tratamientos de ésta localidad mostraron, que a la concentración al 100%, la supervivencia fue menor al 60% de la progenie en comparación al grupo control, esta respuesta fue inesperada por lo que era necesario hacer el diagnóstico de ese sitio y obtener los resultados en cuanto a la frecuencia de mutación. El otro sitio fue el denominado Los azufres, el cual está asociado a la actividad geotérmica y es una zona con afluencia constante de turismo. La diversidad de flora y fauna fue claramente menor, comparada con la de Llano grande, aunque tampoco se elaboraron listados.

Los resultados obtenidos a partir del análisis de la prueba SMART tanto para Llano grande como para Los Azufres se muestran en las tablas VIII y IX, respectivamente. Se presenta la frecuencia de manchas simples (chicas y grandes) y gemelas, así como la suma de todas las manchas recobradas para los dos tipos de progenie: flr^3/mwh y $TM3, Ser/mwh$.

En el caso de las moscas libres de inversión expuestas al agua proveniente de Llano grande (completa y diluida), el efecto se localizó principalmente en la frecuencia de manchas grandes, siendo éste significativo en las moscas expuestas a las diluciones 0.4 a 6.3 %, 12.5, 25.0 y 100 % ($P < 0.05$); en el resto de las diluciones el efecto fue indeterminado. No se incrementó de manera significativa la frecuencia de manchas simples chicas y de manchas gemelas. En el caso de manchas totales el incremento significativo se mantuvo sólo en la muestra diluida al 12.5% y en la muestra completa.

En las moscas portadoras del cromosoma balanceador no se encontraron indicios de algún efecto aparente en alguna de las diluciones probadas o aún con la muestra completa (100%).

Tabla VIII. Resultados obtenidos con base en la prueba SMART en *Drosophila*. Sitio "Llano grande".

Con. (%)	número de alas	manchas por ala (número de manchas) diagnóstico estadístico*				Manchas con clones (mwh)
		chicas (1-2 cél.) [m=2]	grandes (> 2 cél.) [m=5]	Gemelas [m=5]	Totales [m=2]	
Moscas π^2/mwh emergidas de los tratamientos.						
H ₂ Odes	78	0.31(24)	0.00(0)	0.01(1)	0.32(25)	24
0.4%	80	0.25(20) -	0.06(5) +	0.00(0)	0.31(25) -	24
0.8%	80	0.22(18) -	0.08(6) +	0.06(5)	0.36(29) -	29
1.6%	80	0.26(21) -	0.06(5) +	0.08(6)	0.40(32)	31
6.3%	80	0.28(22) -	0.11(9) +	0.04(3)	0.43(34)	33
10%	80	0.24(19) -	0.03(2) i	0.00(0)	0.26(21) -	21
12.5%	80	0.44(35)	0.09(7) +	0.03(2)	0.55(44) +	44
25%	80	0.37(30) -	0.06(5) +	0.00(0)	0.44(35)	35
32%	80	0.40(32)	0.05(4) i	0.03(2)	0.47(38)	38
50%	80	0.31(25) -	0.03(2) i	0.05(4)	0.39(31) -	31
100%	80	0.41(33)	0.09(7) +	0.01(1)	0.51(41) +	41
Moscas TM3, Ser/mwh emergidas de los tratamientos.						
H ₂ Odes	80	0.19(15)	0.00(0)	—	0.19(15)	15
0.4%	80	0.21(17)	0.01(1) i	—	0.22(18)	18
0.8%	80	0.26(21)	0.03(2) i	—	0.29(23)	23
1.6%	80	0.30(24)	0.00(0) i	—	0.30(24)	24
6.3%	80	0.24(19)	0.01(1) i	—	0.25(20)	20
10%	80	0.22(18)	0.01(1) i	—	0.24(19)	19
12.5%	80	0.29(23)	0.04(3) i	—	0.32(26)	26
25%	80	0.28(22)	0.01(1) i	—	0.29(23)	23
32%	80	0.25(20)	0.00(0) i	—	0.25(20)	20
50%	80	0.19(15) -	0.01(1) i	—	0.20(16)	16
100%	80	0.20(16)	0.04(3) i	—	0.24(19)	19

*diagnóstico acorde a Frei y Würgler Mutation Res., 203 (1988) 297-308.

+ = positivo; - = negativo; i = inconcluso. m = factor múltiple

nivel de probabilidad: $\hat{\alpha} = \hat{\beta} = 0.05$

En el caso de Los azufres, el efecto se localizó principalmente en las manchas simples chicas, siendo significativo el incremento en la frecuencia de manchas en las moscas expuestas a las diluciones 1.6, 25.0, 32.0 y 50.0%. Al considerar a todas las manchas recobradas, el incremento significativo se encontró en las diluciones 1.6, 6.3, 32.0 y 50.0 %. No hubo efecto en la frecuencia de manchas grandes y gemelas. Nuevamente, en las moscas portadoras del cromosoma balanceador no se encontraron indicios de algún tipo de efecto.

Tabla IX. Resultados obtenidos con base en la prueba SMART en *Drosophila*, sitio "Los azufres".

Con. %	número de alas	manchas por ala (número de manchas)				Manchas con clones (mwh)
		chicas (1-2 cél.) m=2	grandes (> 2 cél.) m=5	gemelas m=5	manchas totales m=2	
Moscas <i>flr3/mwh</i> emergidas de los tratamientos.						
H ₂ Odes	80	0.21(17)	0.05(4)	0.03(2)	0.29(23)	22
1.6	80	0.43(34) +	0.05(4) -	0.03(2) i	0.50(40) +	40
6.3	80	0.34(27) I	0.12(10) I	0.00(0) -	0.46(37) +	37
10	80	0.32(26) I	0.05(4) -	0.05(4) i	0.43(34) i	34
12.5	80	0.34(27) I	0.10(8) I	0.01(1) i	0.45(36) i	34
25	80	0.39(31) +	0.06(5) -	0.00(0) -	0.45(36) i	35
32	80	0.54(43) +	0.10(8) I	0.03(2) i	0.66(53) +	53
50	80	0.43(34) +	0.08(6) I	0.03(2) i	0.52(42) +	41
100	80	0.35(28) I	0.05(4) -	0.01(1) i	0.41(33) i	33
Moscas <i>TM3,Ser/mwh</i> emergidas de los tratamientos						
Control	80	0.16(13)	0.03(2)	--	0.19(15)	15
1.6	80	0.20(16) I	0.00(0) -	--	0.20(16) i	16
6.3	80	0.28(22) I	0.00(0) -	--	0.28(22) i	22
10	80	0.25(20) I	0.01(1) I	--	0.26(21) i	21
12.5	80	0.24(19) I	0.01(2) I	--	0.25(20) i	20
25	80	0.21(17) I	0.01(1) I	--	0.22(18) i	18
32	80	0.29(23) I	0.00(1) -	--	0.29(23) i	23
50	80	0.28(22) I	0.01(1) I	--	0.29(23) i	23
100	80	0.21(17) I	0.03(2) I	--	0.24(19) i	19

*diagnóstico estadístico según Frei y Würgler, Mutation Res., 203 (1988); 297-308.

+ = positivo; - = negativo; i = inconcluso. m = factor múltiple

nivel de probabilidad : $\alpha = \beta = 0.05$

En la figura 9 a y b, se muestran las curvas correspondientes a la frecuencia de manchas totales obtenidas a partir de moscas *flr3/mwh* y *TM3,Ser/mwh* tratadas con agua de "Llano grande" o de "Los azufres", respectivamente. En ambos casos la frecuencia de manchas fue mayor en las moscas libres de inversión que en las portadoras del cromosoma balanceador, *TM3, Ser /mwh*. Por otra parte, nuevamente se observó que en las moscas expuestas a diluciones cercanas al 10%, hay una menor frecuencia de manchas, comparada con la obtenida en concentraciones menores y mayores.

Para obtener elementos que permitan establecer la capacidad de *Drosophila* para detectar mezclas de diferente composición, así como el efecto del cromosoma

balanceador en la respuesta recobrada, se obtuvo la distribución de manchas de acuerdo con el número de pelos (células) que las forman. En términos generales, en el sitio Llano grande, las moscas libres de inversión: *flr3/mwh*, el número de pelos por mancha se incrementó y la proporción de células de cada categoría de tamaño se modificó con respecto a la distribución del lote testigo, en la que predominaron las manchas formadas por una sola célula y la proporción de manchas con dos o más pelos fue menor. La distribución fue claramente diferente en las diluciones 0.8, 1.6, 6.3, 12.5 y 50.0%. En contraste, en las moscas portadoras del cromosoma balanceador el efecto anterior parece no presentarse (ver figura 10 a y b).

La comparación de la dispersión en las distribuciones del número de manchas por mosca no indicó diferencias entre las distintas series experimentales de Llano grande ($P > 0.05$), si bien el número de manchas por mosca tiende a ser mayor en las moscas libres de inversión (figura 11 a y b).

Con respecto a las moscas tratadas con agua de Los azufres, la comparación de la distribución del número de pelos por mancha de las diferentes series experimentales y de la serie testigo indicó que el número de pelos por célula tendió a ser mayor en las moscas libres de inversión (figura 12 a y b), modificándose la proporción con la que se recuperan los diferentes tamaños de mancha. En las moscas portadoras del cromosoma balanceador, la distribución en el número de células por mancha tiende a ser ligeramente menor a la del lote testigo; esto podría indicar una menor viabilidad de las células afectadas (ver la distribución de la dilución 25 %). Con respecto a la distribución del número de manchas por mosca, en ambos tipos de mosca éste tendió a aumentar con respecto a la distribución del lote testigo (figura 13 a y b).

Finalmente en la tabla X. se muestran los resultados obtenidos en los análisis estadísticos de la prueba Kruskal Wallis para la distribución de manchas por mosca y en la cual no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$).

Tabla X. Resumen de resultados realizado en la prueba kruskal-Wallis para la distribución de manchas por mosca obtenidos de los diferentes tratamientos en los sitios "Llano Grande" y "Los Azufres" para moscas (*flr3/mwh*) y (*TM3,Ser/mwh*).

Grupos	H	P	Diagnosis
Llano Grande			
<i>flr³/mwh</i> ..	11.719	0.3040	P>0.05
<i>TM3,Ser/mwh</i>	6.136	0.8037	P>0.05
Los Azufres			
<i>flr³/mwh</i>	10.083	0.2593	P>0.05
<i>TM3,Ser/mwh</i>	2.320	0.9696	P>0.05

VII.3 COMPARACIÓN ENTRE EL ÍNDICE DE SOBREVIVENCIA Y LA PRUEBA SMART.

Los resultados del análisis de correlación realizado para comparar los datos obtenidos entre el I.S y la prueba SMART, mostraron que en el sitio Llano grande existe una correlación negativa entre el I.S. y la prueba SMART ($P < 0.05$), es decir, que a medida que aumenta la frecuencia de mutación, la sobrevivencia va disminuyendo. Éstos resultados fueron significativos ($P < 0.05$) en la progenie *flr3/mwh* correspondientes a los tratamientos de las muestras del éste sitio. En la figura 14, se muestra la curva de ésta correlación.

VIII. DISCUSIÓN

Con base en los resultados obtenidos en los registros realizados en el campo, se pudieron clasificar tres tipos de cuerpos de agua en la zona geotérmica de Los Azufres, Michoacán y son: 1) las salmueras, 2) los manantiales sulfurosos y 3) los cuerpos de agua dulce, que dadas sus características de pH y temperatura, corresponden con la descripción realizada por Barragan y Arellano (1993), en cuanto a cuerpos de agua en los campos geotérmicos.

A partir de los reportes del contenido de este tipo de cuerpos de agua y el aspecto aparente durante la colecta de las muestras y los registros físico-químicos correspondientes, se esperaba obtener en el índice de sobrevivencia, una tendencia indicativa del grado de toxicidad de las muestras, la cual a su vez, sería menor en las diluciones realizadas para cada una de ellas. El gradiente de toxicidad esperado podría tener el siguiente orden: las lagunas < los manantiales < las salmueras. Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos en el índice de sobrevivencia (IS) de los diferentes sitios, se observó que uno de los cuerpos de agua dulce, conocido como Llano grande, presentó en diferentes diluciones un efecto tóxico lo cual se reflejó en el IS. Esto podría deberse a que algún elemento tóxico presente en este cuerpo de agua haya modificado la respuesta, o bien, que los escurrimientos y la precipitación pluvial que han dado origen a la laguna aporten estos elementos a través del depósito y dilución de material de las laderas vecinas al cuerpo de agua.

Por otro lado, en cuanto a la serie de diluciones a probar, se observaron cambios en la sobrevivencia de las moscas tratadas con diluciones menos concentradas, en comparación al lote testigo y las muestras más concentradas. Esto último fue un efecto reiterativo en cuanto al IS, obtenido a partir de los sitios de muestreo. Una posible explicación podría estar relacionada con el tamaño de las partículas contenidas en las muestras, así como la disposición de éstas en el agua, por ejemplo, formando parte de coloides (Mercado, 1976). Así, la respuesta tóxica en algunos casos y subtóxica en otros, podría estar dada por la accesibilidad del compuesto o mezcla de ellos al sistema, es decir, a las moscas tratadas. En este sentido Dorantes

(2000), al analizar muestras de agua a través de la comparación de sistemas de filtrado y diluciones, advierte que el tamaño de la partícula o subpartícula modifica la actividad de la muestra y que la dispersión o interacciones de esta puede cambiar en términos de toxicidad, citotoxicidad y genotoxicidad. Además debe considerarse la participación de la actividad metabólica que podría cambiar la accesibilidad de los compuestos en ella contenidos y los mecanismos de desintoxicación que presentan los sistemas vivos como *Drosophila*, que también participan en la intensidad y tipo de respuesta de los organismos (Rodríguez, 1994).

Las anteriores observaciones en los resultados del IS, hicieron suponer que era posible que se estuviera presentando actividad genotóxica en las muestras menos concentradas y que esto fuera el factor del constante cambio del IS en las diluciones experimentales.

Es por ello que mediante la prueba de Mutación y Recombinación Somáticas, se podrían establecer las pequeñas diferencias en la respuesta de los organismos ante una concentración y otra, y con ello determinar si existía o no un efecto genotóxico en las muestras, tal y como se había planteado a partir de las observaciones hechas con el I.S. Las muestras de los sitios que se eligieron para responder esta pregunta fueron Los azufres; por ser un manantial asociado a la actividad geotérmica, y Llano grande; principalmente por que mostró actividad tóxica en diluciones particulares como 0.4, 0.8, 10, 25, 32 y 100%.

Colateralmente, en la progenie obtenida a partir de la cruce utilizada para la prueba SMART, se esperaba que las moscas portadoras del balanceador *TM3*, tendrían una mayor susceptibilidad que las moscas libres de inversión, sin embargo esto no fue concluyente.

Por otro lado, de los resultados obtenidos a partir de la prueba SMART, estos mostraron que en algunas diluciones se incrementó la frecuencia de mutación somática, obteniendo así una clara respuesta genotóxica. Tanto en Los azufres como en Llano grande, los datos mostraron que la frecuencia de mutación está relacionada con el incremento en las manchas sencillas, las cuales, con base en el protocolo

propuesto por Graf (1984), las mutaciones que originan estas manchas están correlacionadas con eventos de delección, mutación puntual y no disyunción. Aunque también es posible obtener manchas sencillas por la inducción de recombinación entre los marcadores *mwh* y *flr*³.

Los análisis adicionales en la prueba SMART como son el análisis de la distribución del número de células por manchas y el de la distribución del número de manchas por mosca, aportaron información valiosa a cerca del tiempo en que se indujeron los clones mutantes, así como para descartar los posibles falsos positivos y negativos que pudieran influir en los resultados.

De los resultados obtenidos en el número de células por mancha y manchas por mosca se pudo establecer que en organismos emergidos de los tratamientos del sitio Llano grande, en los que se indujo un tamaño de mancha grande, el daño se presentó al inicio del desarrollo del ala; mientras que en los organismos emergidos de los tratamientos del sitio Los azufres, el daño pudiera ocurrir al final del desarrollo ya que se trata de manchas de tamaño pequeño, lo anterior, siempre y cuando se asuma que no se presentaron arresto y/o muerte celular.

Además, en el sitio Los azufres, los resultados obtenidos por el análisis de células por mancha en moscas libres del balaceador, mostraron que en algunas diluciones la distribución del número de células por mancha es discontinua, por ejemplo en la dilución al 50%, este mismo fenómeno ocurrió en Llano grande en las concentraciones 32, 12.5, 6.3 y 0.4%. Para poder explicar estos resultado es necesario referimos a los trabajos de Dorantes (2000) y Ramos *et al.* (2000), quienes sugieren que cuando el daño genotóxico se incrementa a tal grado que la célula no puede reparar el daño provocado por éste, se induce un daño citotóxico, el cual enmascara la respuesta, de tal modo que lo que se observaría en los registros, serían precisamente inconsistencias en la distribución de células por mancha. Es por tanto que las deficiencias en la división o muerte celular, provocaría que se registraran manchas chicas, debido a la sustitución de las células afectadas por células proliferantes no afectadas (Ramos *com. pers.*). Lo anterior plantea un enfoque importante en cuanto a la interpretación de los resultados de la localidad Los azufres,

que en comparación de Llano grande, presenta características físico-químicas que generan una respuesta genotóxica mayor que Llano grande; es probable que los resultados en cuanto a tipo de manchas en Los azufres, se esté obteniendo un enmascaramiento de la respuesta por la presencia de daño citotóxico, ya que si observamos la frecuencia de manchas sencillas, en Los azufres predominaron las manchas de 1 a 2 pelos (células), en cambio en Llano grande las manchas presentaron más de 2 pelos (células). Este efecto se hace manifiesto cuando se compara el número de concentraciones en las que se obtuvo una frecuencia significativa de manchas totales, entonces el sitio de Los Azufres presentó mayor actividad que Llano grande.

En cuanto a los resultados obtenidos en los análisis de moscas por mancha, se descartó que los resultados obtenidos en la prueba sean producto de falsos positivos.

Por otra parte, la comparación de los resultados obtenidos en el I.S. en cuanto a las diferencias de la respuesta entre moscas libres y portadoras de inversión cromosómica en la prueba SMART indicó que la respuesta genotóxica fue a favor de las moscas libres de inversión, siendo totalmente negativa la respuesta para moscas (*TM3,Ser/mwh*). Es posible que esto pudiera deberse a que en las moscas libres de inversión las muestras estén induciendo rompimientos que deban repararse principalmente por recombinación, mecanismo para el cual estas moscas resultan deficientes por la presencia del cromosoma balanceador, lo anterior es congruente con los resultados obtenidos ya que la frecuencia de manchas sencillas no fue incrementada de manera significativa.

Finalmente, el uso del índice de sobrevivencia como indicador de daño genotóxico en *D. melanogaster*, resulta ser altamente recomendable, lo cual se apoya en la correlación alcanzada entre el Índice de Sobrevivencia y la frecuencia de mutación somática obtenida con la prueba SMART para cada dilución y muestra. Así, en el sitio Llano grande y para los individuos libres del balanceador cromosómico, efectivamente existe una correlación negativa entre las dos pruebas, es decir, cuando la sobrevivencia de las moscas tratadas disminuye, la frecuencia de alteraciones somáticas aumenta. Este es un resultado importante debido a que abre la posibilidad de usar esta metodología en programas de monitoreo en donde el índice de

sobrevivencia facilita la identificación preliminar de las muestras en las que existen componentes con actividad genotóxica. Esto redundaría además en la posibilidad de procesar un número considerable de muestras ya que el trabajo y tiempo requerido para obtener el IS es considerablemente menor que el necesario para realizar la prueba SMART. Por otra parte, el entrenamiento para obtener el IS es mínimo, comparado con el que se requiere para la prueba SMART. Así, sería posible analizar un número mayor de sitios y con personal con un mínimo de entrenamiento en el uso de *Drosophila* y utilizar los registros de sobrevivencia para seleccionar aquellos sitios en donde hubiera sospecha de obtener una inducción genotóxica. Además como se mostró en este trabajo el uso de la prueba SMART es una herramienta robusta, ya que al presentar un protocolo en donde se utiliza un modelo *in vivo* intacto, esto incrementa su valor y significancia biológica. Así mismo el presente trabajo coincide con los resultados obtenidos por Delgado *et al.*, (1992); Graf y Singer, (1992); Würgler y Kramers, (1992); Dorantes (2000), Guzmán *et al.*, (2000), y Ramos *et al.*, (2000), en cuanto a que la prueba SMART permite establecer el potencial genotóxico en muestras ambientales, considerando que estas son principalmente mezclas complejas de sustancias tóxicas y no tóxicas, y que por ello su análisis para obtener una respuesta con significancia biológica se complica. Además *Drosophila melanogaster* y la prueba de recombinación y mutación somáticas son una herramienta que puede ser utilizada como biomonitor de contaminación ambiental como lo han sugerido Guzmán y Graf, (1995); Guzmán *et al.* (2000), y Ramos *et al.* (2000).

IX. CONCLUSIONES

- El Índice de sobrevivencia (IS) es un indicador preliminar confiable de la genotoxicidad en *Drosophila melanogaster*.
- Existe una correlación negativa entre el índice de Sobrevivencia y la Frecuencia de Mutación Somática.
- *Drosophila* es un modelo alternativo sensible capaz de establecer la actividad genotóxica de muestras ambientales aplicable en la evaluación de muestras ambientales.
- La dilución de la muestra total permite descartar muestras falsas negativas y positivas.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Albert A. L. (1997). **Introducción a la Toxicología Ambiental**. Centro Panamericano de Ecología. México. 454 pp.
- Amrani S., Rizki M., Creus A. y R. Marcos (1999). **Genotoxic activity of different chromium compounds in larval cell of *Drosophila melanogaster***. *Environ. Molec. Mut.* 34: 47-51.
- Ármannsson H. y H. Kristmannsdóttir (1992). **Geothermal environmental impact**. *Geothermics* 21: 869-880.
- Bargagli R. (1997). **Environmental impact of trace element emission from geothermal power plants**. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* agosto 33(2): 172-81.
- Barragán R. M. R. y G. M. V. Arellano (1993). **Composición química de efluentes geotérmicos**. *Geotermia, Rev. Mex. de Geoenergía*, 9 (2) : 165-172.
- Billen G., Garnier J., Deline C. y C. Billen (1999) **Estimates of early-industrial inputs of nutrients to river system : implication for coastal eutrophication**. *Sci. Total Environ.* diciembre 15 (243-244): 43-52.
- Brophy P. (1997). **Environmental Advantages to the Utilization of Geothermal Energy**. *Renwable Energy*, 10 (2/3):367-377.
- Butterworth M. F., Corkum D.L. y J. Guzman-Rincón (1995). **Biomonitor and Biomarkers as Indicators of Environmental Change a Handbook**. Plenum Prees, New York .
- Butterworth M.F., Gonsebatt M.E. y P. Ramírez (2000). **Biomonitor and biomarkers as indicators of environmental change 2**. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Cadenas R. (1999). **Residual steam to energy: proyect for Los Azufres geothermal field, Mexico**. *Geothermics* 28: 395-423.
- Calderón G. L., Osnaya N., Rodríguez A. A. y V. A. Calderón (1997). **DNA damage in nasal respiratory Epithelium from Children Exposed to Urban Pollution**. *Environ. Molec. Mutagen.* 30:11-20.
- Calow P. (1998). **Handbook of Ecotoxicology**. De Blackwell Science Oxford USA. 51-117,193-226,397-469 pps.

- Carabias Martínez R., Rodríguez Gónzalo E., Fernández Laespada M. y F. Sánchez san Roman (2000) **Evaluation of surface- and ground-water pollution due to herbicides in agricultural areas of Zamora and Salamanca (Spain).** *J. Chromatogra.* febrero 11; 869 (1-2): 471-80.
- Cedeberg H. y C. Ramel (1989). **Modifications of the effect of bleomycin in the somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*.** *Mut. Res.*, 214: 69-80.
- Cotelle S. y F. J. Férard (1999). **Comets Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review.** *Environ. Molec. Mutagen.* 34: 246-255.
- Delamas F., Villaescusa I., Woo N.Y., Soleilhavoup J.P. y J.C. Murat (2000). **Cellular method for evaluation of noxiousness of inorganic pollutants in industrial wastes: Calculation of a safety index for monitoring sludge discharge.** *Ecotoxicol. Environ. Saf.* marzo 45(3):260-265.
- Delgado-Rodríguez A., Ortiz-Martelto R., Villalobos-Pietrini R., Gomez-Arroyo S. y U. Graf (1999). **Genotoxicity of organic extracts of airborne particules in somatic cells of *Drosophila melanogaster*.** *Chemosphere.* julio 39(1):33-43.
- Dezwart, D. y W. Slooff.(1983). **The Microtox as an alternative assay in the acute toxicity assessment of water pollutants.** *Aquat. Toxicol.* 4:129-138.
- **EDITORIAL** (1991). *Geotermia. Rev. Mex. de Geoenergía*, 7 (3): 263-264.
- Evenden A. J. y M. H. Depledge (1997). **Genetic Susceptibility in Ecosystems: The Challenge for Ecotoxicology.** *Environ. Health Persp.* Suppl. Junio 4 (105): 849-854.
- Everts J. W. (1997). **Ecotoxicology for risk assessment in and zones some key issues.** *Arch. Environ Contam. Toxicol.* enero 32 (1): 1-10.
- Falandysz J. y A. Chwir (1997). **The concentrations and bioconcentration factor of mercury in mushrooms from the Mierzeja Wislana sand-bar, northern Poland.** *Sci. Total Environ.* septiembre 15; 203(3): 221-228.
- Fernández-Turiel J.L., López-Soler a., Llorens J.F., Queral X., Aceñolaza P., Durand F., López J.P., Medina M.E., Rossi J.N., Toselli J. y J. Saavedra (1995) **Environmental monitoring using surface water, river, sediments, and vegetation: A case study in the famatina range la rioja, NW. Argentina.** *Environ. Inter.* 21 (6): 807-820.
- Feyereisen R. (1999). **Insect P450 Enzymes.** *Annu. Ev. Entomol.* 44: 507-33.

- Fitzgerald G.D., Lino P.R. y D.G. Dixon (1999) **A comparison of sentinel species evaluation using Creek Chub (*Semotilus atromaculatus*, Mitchell) to a fish community evaluation for the initial identification of environmental stressors in small stream.** *Ecotoxicology*, febrero 8 (1): 33-48.
- Fossi C. y C. Leonzio (1994). **Nondestructive Biomarkers in Vertebrates.** Cap. 12. Lewin Pub. London. 272 pp.
- Frei H. y F.E. Würgler (1988). **Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative or inconclusive result.** *Mut. Res.* 203: 21-308.
- Frei H. y F. E. Würgler (1995). **Optimal Experimental Design and Sample Size for the Statistical Evaluation of Data from Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila*.** *Mut. Res.* 334:247-258.
- Frölich A. y F. E. Würgler (1990). **Genotoxicity of Ethyl Carbamate in *Drosophila* Wing Spot Test: Dependence on Genotype-Controlled Metabolic Capacity.** *Mut. Res.* 244:201-208.
- González-César, E. y P. Ramos-Morales (1997). **Sodium Azide Induce Mitotic Recombination in *Drosophila melanogaster* Larvae.** *Mut. Res.* 389:157-188.
- Graf U. y D. Singer (1992). **Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*.** *Rev. Int. Contam. Ambient.* 8 (1): 15-27.
- Graf U., Würgler F., Katz A., Frei H., Juon H., Hall C. y P. Kale (1984). **Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*.** *Environ. Mutagen.* 6:153-188.
- Greenspan J.R. (1997). **Fly Pushing. The Theory and Practice of *Drosophila* Genetics.** Cold Spring Harbor Laboratory Press. 151pp.
- Gullan P.J. y P.S. Cranston (1994). **The Insects. An Outline of Entomology.** De Chapman and Hall, London 224-246 pps.
- Guzmán R. J. and U. Graf (1995). ***Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor In: Butterworth, Corkum y Guzman (eds). Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental changes.** Environmental Science Research. New York. Vol.50: 169-181.

- Guzmán-Rincón J., Ramírez P. Y L. Benitez (2000). **Somatic mutation and recombination test in *Drosophila* used for biomonitoring of environmental pollutants** pp. 221. In: **Butterworth et al., (eds.) Biomonitor and Biomarkers as indicators of environmental changes 2.** Luwer Academic/Plenum Publishers, New York. 221 pp.
- Huang Y.L y S. Batterman (2000). **Residence location as a measure of environmental exposure: a review of air pollution epidemiology studies.** *J. Expo. Annals. Environ. Epidemiol.* enero-febrero 10 (1):66-85.
- Janssen C. R. & G. Persoone (1993). **Rapid toxicity screening test for aquatic biota and Methodology and experiments with *Daphnia magna*.** *Environ. Toxicol. Chem.* 12. (in press).
- Juneau P. y R. Popovic (1999) **Evidence for the rapid phytotoxicity and environmental stress evaluation using the PAM fluorometric method: importance and future application.** *Ecotoxicology.* diciembre 8 (6): 447-453.
- Kravitz J.D., Nyaphis M., Mendel R. y E. Peterson (1999). **Quantitative bacterial examination of domestic water supplies in the Lesotho Highlands: water quality, sanitation, and village health.** *Bull. World Health Organ.* 77 (10):829-36.
- Langworthy D.E; Stapleton R. D; Saylesr G. S. & R. H. Findlay (1998). **Genotypic and phenotypic responses of a riverine microbial community to polycyclic aromatic hydrocarbon contamination.** *Appl. Environ. Microbiol.* septiembre 64 (9): 3422-3428.
- Lindsley D. L. y G. Zimm (1992). **The Genome of *Drosophila melanogaster*.** Academic, Press, Inc. U.S.A. 113 pp.
- Lynch W. D., Schuler L.R., Hood D.R. y D. Gales Davis (1991). **Evaluation of *Drosophila* for screening developmental toxicants: Test results with eighteen chemicals and presentation of new *Drosophila* bioassay.** *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 11: 147-173.
- López A. H. (1991). **Geología de Los Azufres.** *Geotermia Rev. Mex de Geoenergía,* 7 (3): 265-275.
- Loppi S., Malfatti A., Sani M. y N. E. Whitehead (1997). **Lichenes as biomonitorers of Geothermal Radionuclide Pollution.** *Geothrmics,* 26 (4): 535-540.
- Manly R. (1996) **Biological indicators in: Environmental analytical chemistry.** Edts F.W. Fifield and P.J. Haines. Blackie Academic and Professional. London.

- Mercado S. (1976). **Disposición de desechos geotérmicos**. Simp. Int. Sobre energía geotérmica en América Latina, Guatemala, 18-23 Oct.: 778-799 pp.
- Muñoz H. A. (1995). **Relación entre el tiempo de acción de dos mutágenos y el tamaño de manchas inducidos en células somáticas de las alas de *Drosophila melanogaster***. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México D.F. 58 pp.
- Muñoz H. A. (1997). **Comparación del Potencial aneuploidogénico de compuestos citostáticos en células de alas de *Drosophila melanogaster***. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. México D.F. 70pp.
- Nelson L. N. (1991). **Stream, Lake, Estuary and Ocean Pollution**. Van Nostrand Reinhold, New York. 392-398 pps.
- Ordaz, T. M. G. (1998). **Caracterización de la actividad genotóxica del aminoácido azufrado taurina y algunos antagonistas mediante el empleo de células somáticas de *Drosophila melanogaster***. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. México D.F. 110pp.
- Osaba L., Aguirre A., Alonso A. y U. Graf (1999). **Genotoxicity testing of six insecticides in two crosses of the *Drosophila* wing spot test**. *Mut. Res.* 439: 49-61.
- Raashou-Nielsen (2000). **An air pollution model for use in epidemiological studies: evaluation with measured levels of nitrogen dioxide and benzene**. *J. Expo. Annals. Enviromen. Epidemiol.* enero-febrero 10 (1):4-14.
- Ramel C. y J. Magnusson (1992). **Modulation of Genotoxicity in *Drosophila***. *Mut. Res.* 267:221-227.
- Ramos M.P., Ordaz M.G., Dorantes A., Rivas H., Campos P., Martínez M. Y B. Hernandez (2000). ***Drosophila* is a reliable biomonitor of water pollution in: Butterworth (ed). Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change 2**. Kluwer Academic/Plenum publisher, New York.
- Rivas M. H. (1999). **Participación de la Reparación en el Daño Inducido por Mutágenos con Diferente Actividad Química: N-Nitrosodimetilamina (DMN), Metil-Metano-Sulfonato(MMS), Colchicina, Azida de Sodio y Cloruro de Plomo**. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM, Edo. de México 70 pp.
- Rodríguez, A. R. (1994) **Metabolic activation of four drugs in the eye mosaic assay measuring principally mitotic recombination in *D. melanogaster*: differences in strain susceptibility and route of exposure**. *Mut. Res.* 305: 157-163.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- Robertson D. E., Crecelius E. A., Fruchter J. S. y J. D. Ludwick (1977). **Mercury emission from geothermal power plants.** *Science*, junio 3; 196 (4294):1094-7.
- Sánchez G. A. y L. M. A. García (1992). **Remoción del arsénico de las Aguas Geotérmicas de Desecho, Parte 1: Estudio Preliminar.** *Geotermia, Rev. Mex. de Geoenergía*, 8 (1): 103-116.
- Simon D., Helliwel S. y K. Robards (1998) **Pesticides toxicity endpoints in aquatic ecosystems.** *J. Aqua. Ecosys. Stress Rec.* 6: 159-177.
- Thorne J.S.T.R. y P. Williams (1997). **The responde of benthic macroinvertebrates to pollution in developing countries: a multimeric system of bioassessment.** *Freshwater Biology.* 37:671-686.
- Verma, P. M., González, B. V., Sandoval, M. F., Tapia, S. R., Casimiro, E. E., Fernández, S. E., Rye, R., Gent, C. y C. Johnson (1998). **Caracterización Química e Isotópica de las Precipitaciones Pluviales en el Campo Geotérmico de Los Azufres, Mich., México y en Zonas de Referencia.** *Geotermia, Rev. Mex de Geoenergía*, 4 (1): 55-68.
- Viggiano J. C. (1991a). **Permeabilidad y Porosidad en el Campo Geotérmico de Los Azufres, Mich. Un punto de vista Geológico.** *Geotermia Rev. Mex. de Geoenergía*, 7 (2): 161-183.
- Viggiano J. C. (1991b). **Geología del Subsuelo en Los Azufres.** *Geotermia Rev. Mex. de Geoenergía*, 7 (3):277-284.
- Vogel W. E., Nivard J.M.M. y J.A. Zijlstra (1991). **Variations of spontaneous and induced mitotic recombination in different Drosophila populations: a pilot study on the effects of polyaromatic hydrocarbons in six newly constructed tester strains.** *Mut. Res.* 250: 291-298.
- Vogel, W.E. y J.A. Zijlstra (1987). **Mechanistic and Methodological Aspects of Chemically-Induced Somatic Mutation and Recombination in Drosophila melanogaster.** *Mut. Res.* 182:243-264.
- Vogel, W.E., Graf, U., Frei, J.H. y M.M.J. Nivard (1999). **The results of Assays in Drosophila as Indicator of Exposure to Carcinogens.** *IARC Scientific Publications.* 146: 427-472pp.
- Walker, C. H. (1998a). **Biomarker strategies to evaluate the enviromental effects of chemicals.** *Environ. health Perspect.* abril 106 Suppl 2:613-620.
- Walker, C. H. (1998b). **The use of biomarkers to measure the interactive effects of chemicals.** *Ecotoxicol. Environ. Saf.* mayo 40 (1-2):65-70.

- Würgler, F.E. y P.G.N. Kramers (1992). **Enviromental effects by genotoxics.** *Mutagenesis*. 7(5): 321-327.
- Zainullin V.G., Shevchenko V.A., Mjasnjankina E.N., Generallova M.V. y O.A. Rankin (1992). **The mutation frequency of *Drosophila melanogaster* populations living under conditions of increased bakground radiation due to the Chernobyl accident.** *Sci. Total. Environ.* febrero 112(1):37-44.
- Zar J.H. (1987). **Bioestatistical análisis.** Printice may, England. 620 pp.
- Zijlastra J.A. y E.W. Vogel. (1988). **Metabolic inactivation of mutagen in *Drosophila melanogaster*.** *Mut. Res.* 198: 73-83.
- Zimmering (1987). **Aneuploody in *Drosophila*.** *Aln R Liss, Inc.* 32pp.

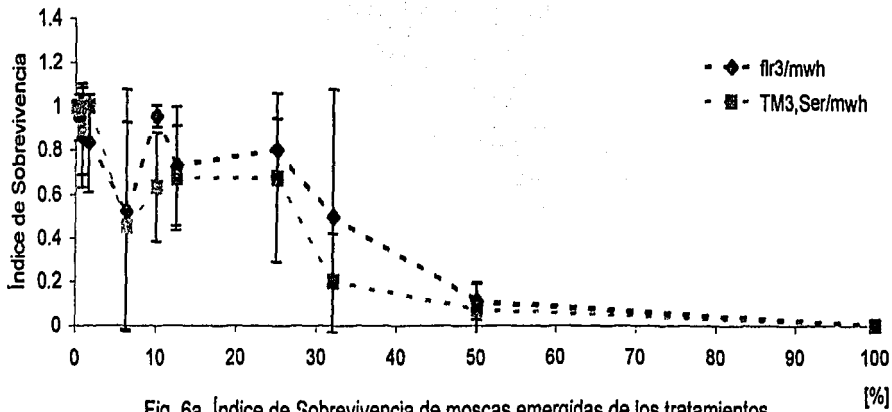


Fig. 6a. Índice de Sobrevivencia de moscas emergidas de los tratamientos correspondientes al sitio Pozo Az 26.

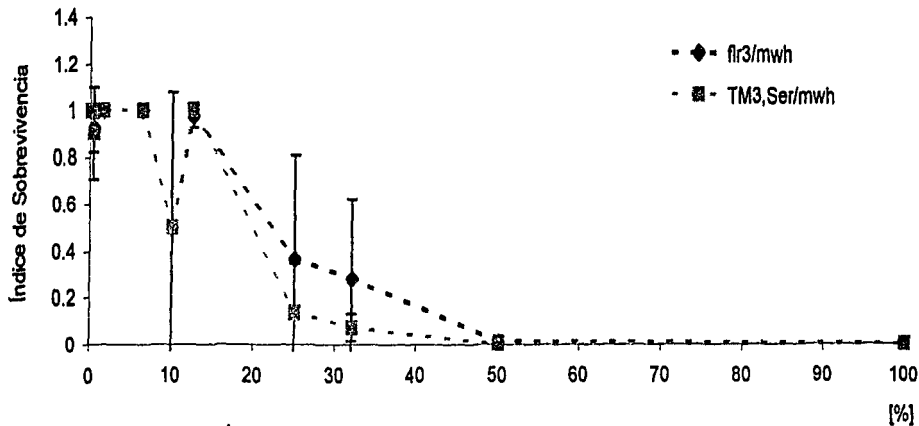


Fig. 6b. Índice de Sobrevivencia de moscas emergidas de los tratamientos correspondientes al sitio Pozo Az 56.

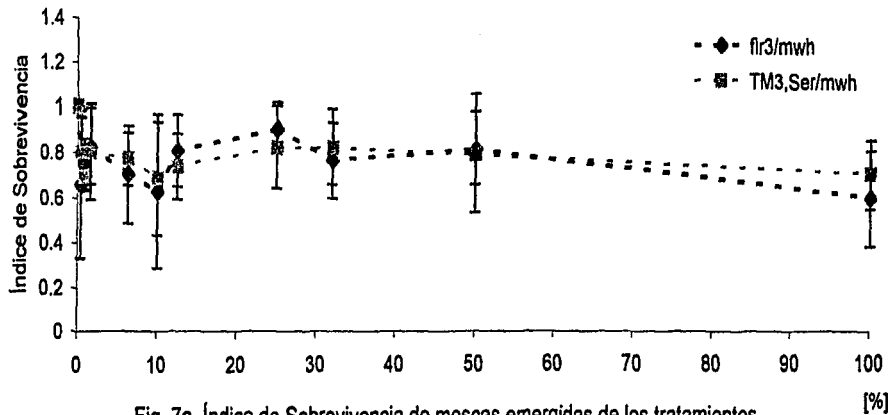


Fig. 7a. Índice de Supervivencia de moscas emergidas de los tratamientos correspondientes al sitio Pozo.

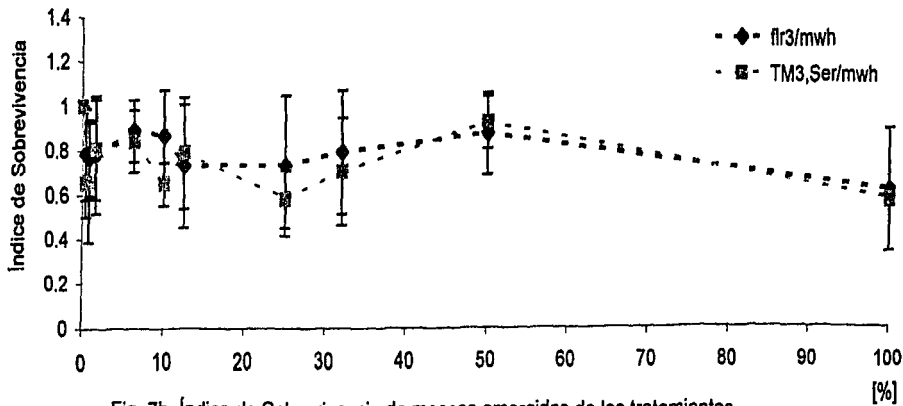


Fig. 7b. Índice de Supervivencia de moscas emergidas de los tratamientos correspondientes al sitio Llano grande.

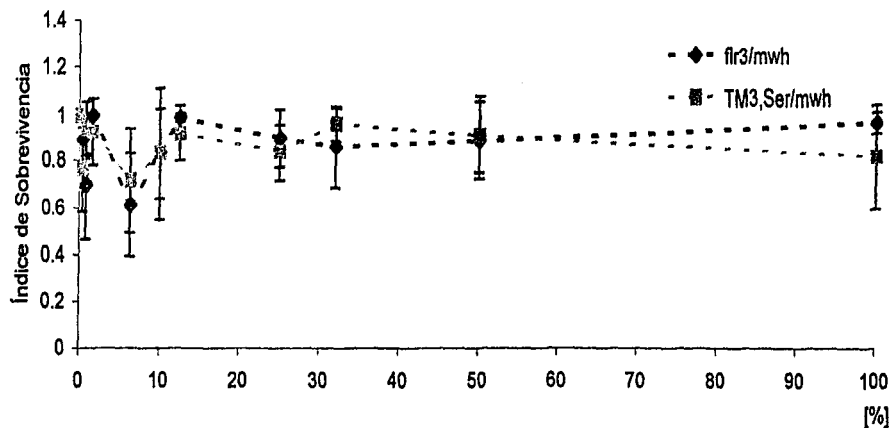


Fig. 8a. Índice de Supervivencia de moscas emergidas de los tratamientos correspondientes al sitio Tejamaniles.

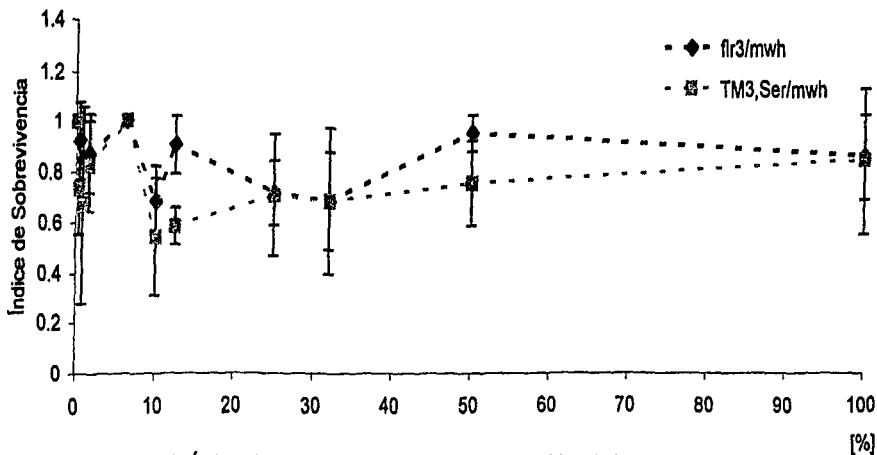


Fig. 8b. Índice de Supervivencia de moscas emergidas de los tratamientos correspondientes al sitio Yacuzi.

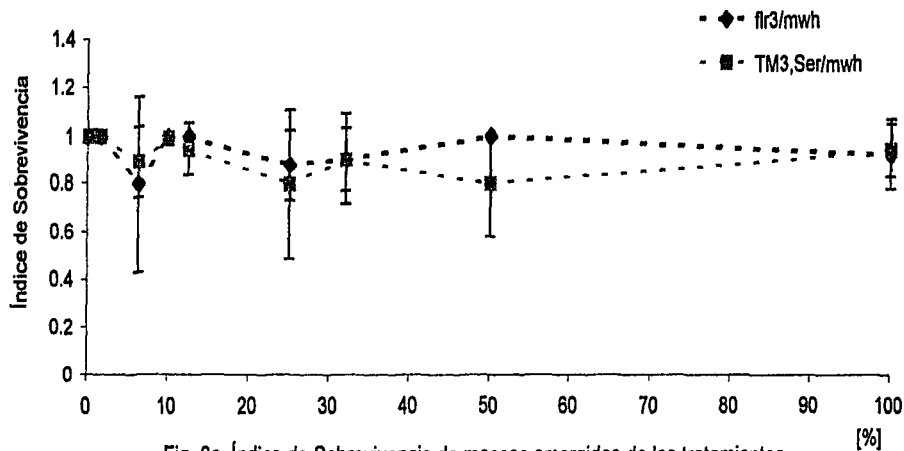


Fig. 8c. Índice de Supervivencia de moscas emergidas de los tratamientos correspondientes al sitio Los Azufres

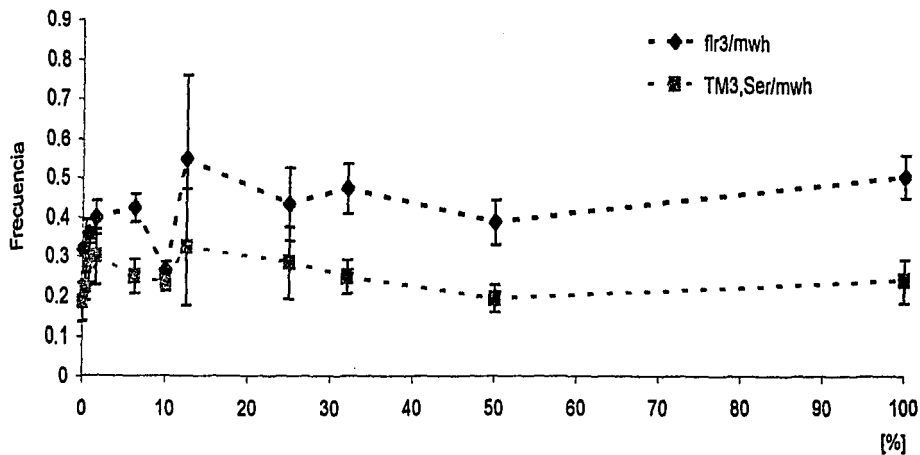


Fig. 9a. Frecuencia de manchas totales de moscas emergidas de los tratamientos correspondientes al sitio Llano grande.

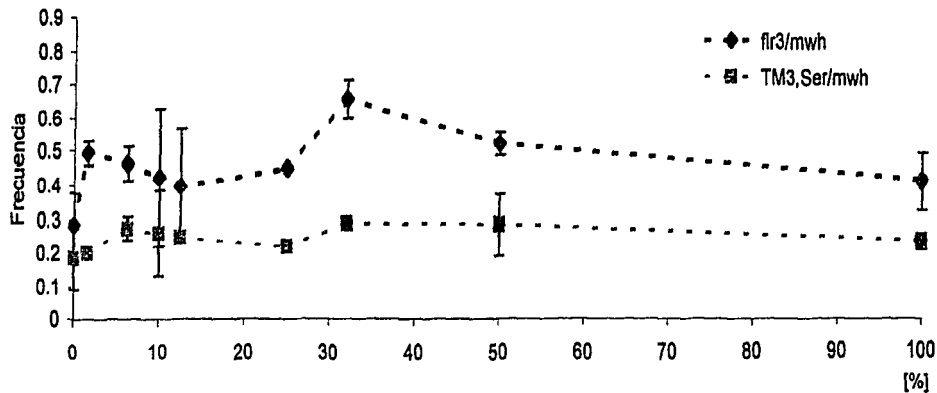


Fig. 9b. Frecuencia de manchas totales en moscas emergidas de los tratamientos correspondientes al sitio Los azufres.

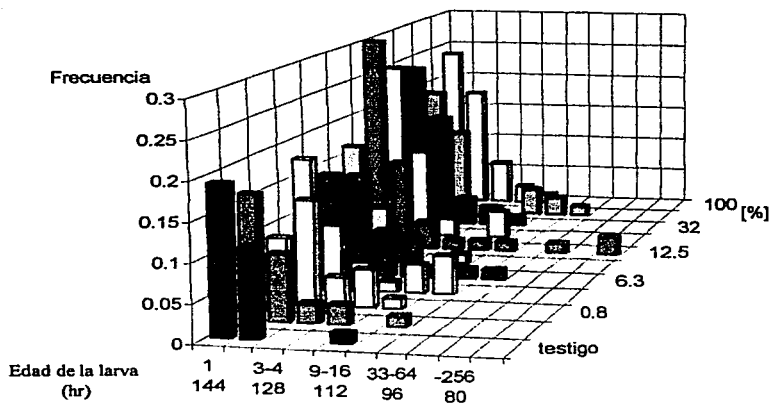


Fig. 10a. Frecuencia de células por mancha, en moscas (*fir*³/*mwh*) emergidas de los tratamientos del sitio "Llano Grande".

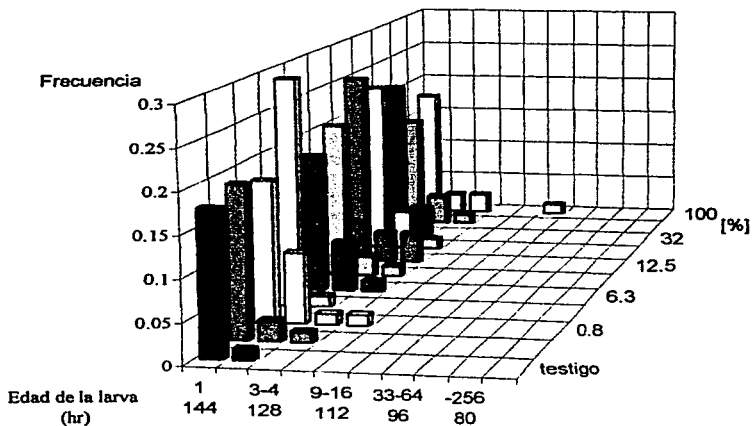


Fig. 10b. Frecuencia de células por mancha, en mosca (*TM3,Ser*/*mwh*) emergidas de los tratamientos del sitio "Llano Grande".

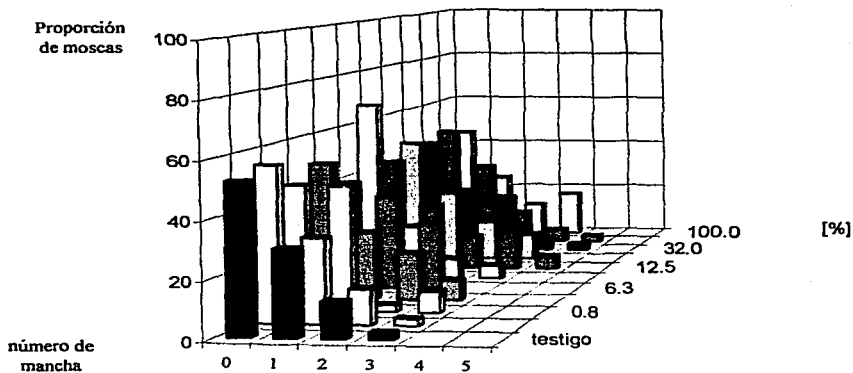


Fig. 11a . Distribución de manchas por moscas (flr^3/mwh), emergidas de los tratamientos con muestras de agua provenientes del sitio "Llano Grande".

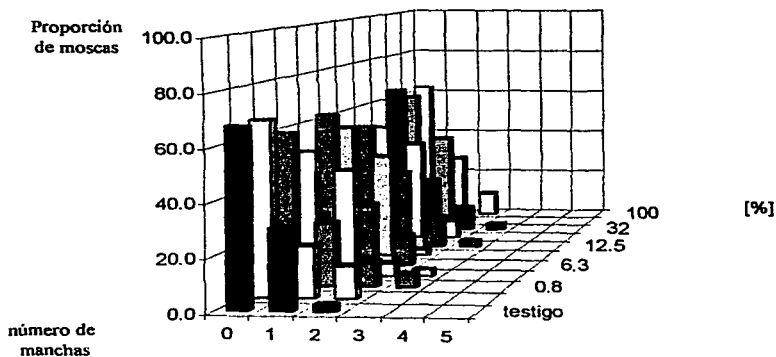


Fig. 11b . Distribución de manchas por mosca ($TM3, Ser/mwh$), emergidas de los tratamientos con las muestras de agua provenientes del sitio "Llano grande".

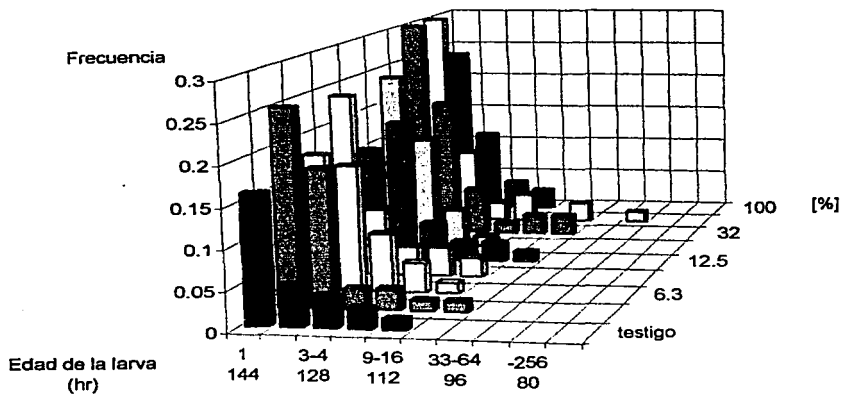


Fig. 12a. Frecuencia de de células por mancha, en moscas (*fir³/mwh*) emergidas de los tratamientos del sitio "Los Azufres".

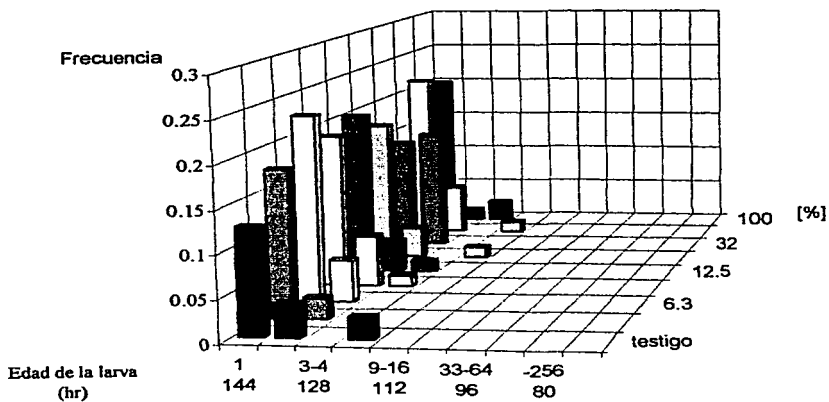


Fig. 12b. Frecuencia de células por mancha, en moscas (*TM3, Ser/mwh*) emergidas de los tratamientos del sitio "Los Azufres".

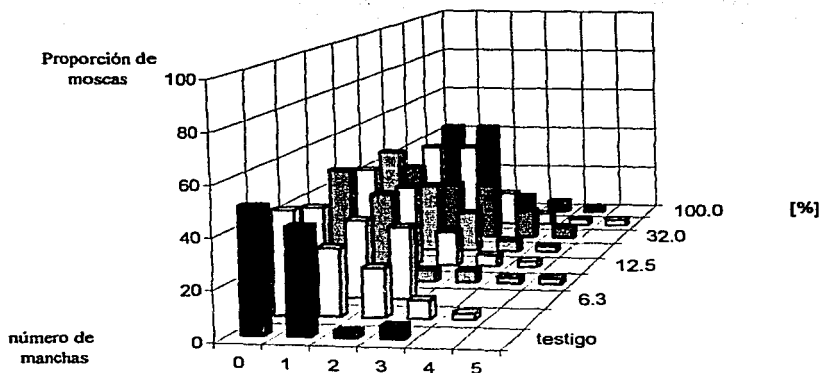


Fig. 13a. Distribución de machas por mosca (flr^3/mwh), emergidas de los tratamientos con las muestras de agua provenientes del sitio "Los azufres".

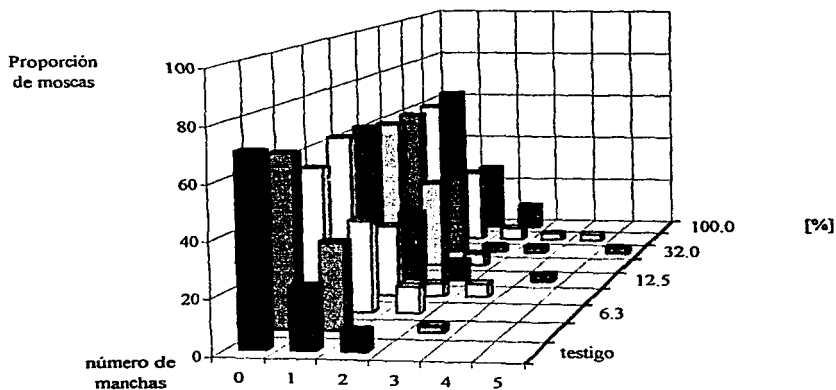


Fig. 13b. Distribución de machas por moscas ($TM3, Ser/mwh$), emergidas de los tratamientos con las muestras de agua provenientes del sitio "Los azufres".

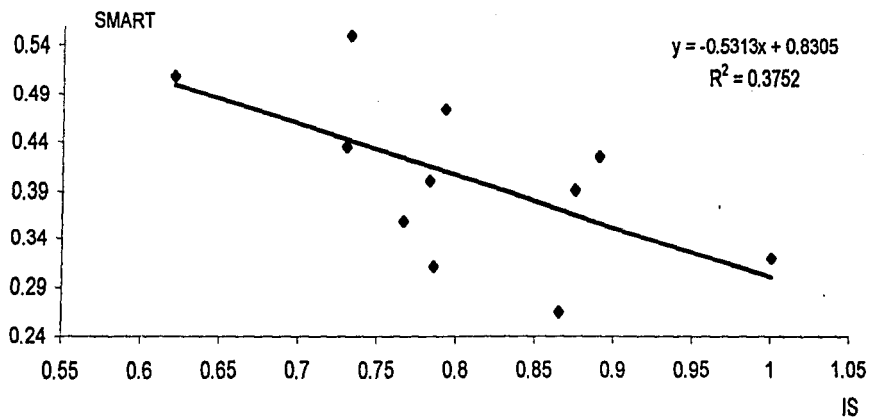


Fig. 14. Análisis de correlación Pearson ($r = -0.6125$; $p < 0.05$) en moscas (flr^3/mwh) emergidas de los tratamientos de la localidad Llano grande.