



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Genotoxicidad de una muestra ambiental externa a
“Cromatos de México” en células somáticas de
Drosophila melanogaster.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA

Linda Beatriz Muñoz Martínez



Directora de Tesis: Dra. Patricia Ramos Morales

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del Jurado

1. Datos del alumno.

Muñoz
Martínez
Linda Beatriz
56 02 36 96
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
40305389 – 4

2. Datos del tutor

Dra.
Ramos
Morales
Patricia

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Gómez
Arroyo
Sandra Luz

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Montero
Montoya
Regina Dorinda

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
Molina
Álvarez
Bertha

6. Datos del sinodal 4

Biól.
Hernández
Bernal
Blanca Rosa

7. Datos de la Tesis

Genotoxicidad de una muestra ambiental externa a “Cromatos de México” en células somáticas de *Drosophila melanogaster*.
68 p.
2007

Agradecimientos y Dedicatoria

A mi Familia

A mis Amigos

A mis Maestros

El material biológico utilizado en este trabajo fue proporcionado por el Banco de Moscas de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Índice

Resumen	3
Introducción	4
Toxicología	4
Biotransformación	5
Toxicología Genética.....	6
Pruebas de Toxicología Genética.....	7
<i>Drosophila melanogaster</i> como sistema de prueba.....	8
Ciclo de Vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	9
Discos imagales.....	9
Disco imagal de ala.....	10
Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART).....	11
Zona de Estudio Cromatos de México, S.A. de C.V”	16
Cromo.....	21
Justificación	26
Hipótesis	26
Objetivo general	27
Objetivos particulares.....	27
Materiales y Métodos	28
Obtención de la muestra ambiental.....	28
Cruza y marcadores genéticos	28
Experimental.....	29
Índice de Supervivencia e Índice Sexual.....	30
Análisis de SMART.....	31
Resultados	33
Muestra ambiental.....	33
Análisis espectrofotométrico de la muestra ambiental.....	33
Índice de Supervivencia.....	35

Índice Sexual.....	39
Frecuencia de Mutación y Recombinación Somáticas.....	42
Discusión.....	53
Conclusiones.....	59
Referencias.....	60

Resumen

En México existen sitios de alto riesgo para la salud humana, uno de ellos es la fábrica "Cromatos de México" ubicada en el Municipio de Tultitlán, en el Estado de México. Después de reunir evidencias suficientes del efecto tóxico y carcinogénico del Cr[VI] generado por la fábrica en la salud de los trabajadores y los habitantes de zonas cercanas fue clausurada en 1978. Los residuos generados fueron confinados en una estructura de concreto sin las características requeridas para este tipo de desechos químicos. En la actualidad, el confinamiento se encuentra seriamente dañado por la formación de grietas; la filtración de agua ha permeabilizado los residuos a través de las paredes del contenedor y de las casas aledañas. En el presente trabajo se determinó la actividad genotóxica de los residuos colectados de las paredes externas de la fábrica "Cromatos de México" en *Drosophila melanogaster*, mediante la SMART. La cual evalúa la frecuencia de mutación y de recombinación somática en las células que dan origen a las alas, las cuales están determinadas genéticamente permitiendo detectar si a lo largo del desarrollo larvario ocurre alguna alteración que cambie la información genética, conduciendo a la pérdida de heterocigosis, lo que conduce a la formación de tricomas mutantes en las células de las alas de las moscas. Se emplearon larvas de 72 ± 4 hrs provenientes de la cruce SMART y larvas provenientes de la cruce CS (como testigo de línea) se expusieron por alimentación a diferentes concentraciones realizadas por diluciones sucesivas de la muestra ambiental [2000 ppm – 0.00019 ppm]. Se obtuvieron los índices de sobrevivencia (IS) y sexual (ISx) y posteriormente, las alas de moscas de la progenie SMART (libres de inversión, LI y portadoras de inversión, PI) se montaron en laminillas para cuantificar la presencia de manchas mutantes. El análisis químico de la muestra indicó que del total de cromo, el 97% corresponde a cromo Cr[VI] y el resto Cr[II] y Cr[III]. Para las moscas tratadas (CS, LI y PI) se observó menor índice de sobrevivencia a partir de 400 ppm ($p < 0.05$), mientras que la proporción de machos fue menor en 800 ppm ($p < 0.05$). La frecuencia de mutación y recombinación somática se incrementó significativamente en concentraciones altas, a partir de 400 ppm ($p < 0.05$) pero en concentraciones bajas, la muestra presentó un efecto genotóxico diferente al testigo. La distribución de tamaño de manchas, así como el número de manchas que presentan las moscas indican que la actividad genotóxica de la muestra es heredable, gradual y acumulativo en las células de las alas de las moscas, en congruencia con la actividad carcinogénica del cromo, su principal componente.

Introducción

Actualmente se utilizan numerosas sustancias tanto derivadas de la actividad industrial como de la doméstica. Estas sustancias son potencialmente tóxicas y pueden alterar a corto, mediano o largo plazo aspectos fisiológicos, bioquímicos y genéticos, causando enfermedades o inclusive la muerte de los sistemas biológicos (Albert, 1997).

Toxicología

La toxicología es el estudio, identificación y cuantificación de los efectos adversos asociados con la exposición de los organismos a agentes físicos, químicos y biológicos (Timbrell, 2002). En ese sentido, la toxicología abarca desde estudios sobre el mecanismo de acción de los agentes nocivo, hasta la elaboración e interpretación de pruebas estándares para determinar las propiedades tóxicas de los agentes. Entre las ramas de la toxicología existe la clínica, la forense, la de investigación de mecanismos de acción y la reguladora; otra clasificación hace referencia a los sistemas o procesos orgánicos que se ven afectados, como en la inmunotoxicología o la toxicología genética. También las funciones de la toxicología pueden enfocarse en el tipo de actividad, como la investigación relacionada con el tipo de efecto asociado a determinada exposición, la realización de ensayos rutinarios con la finalidad de establecer estándares de seguridad y la evaluación de riesgo (Albert, 1997).

Un agente tóxico es aquella sustancia o agente capaz de producir una respuesta nociva en un sistema biológico, mientras que un xenobiótico es una sustancia externa a un organismo vivo que interacciona con él, generalmente esta sustancia no ha sido producida por la biota, como los productos industriales, drogas terapéuticas, aditivos de alimentos y compuestos inorgánicos, entre otros (Duffus, 1983; Peña, 2001). Para que un agente tóxico o un xenobiótico provoque efectos sobre un sistema biológico es necesario que dicha sustancia o sus metabolitos alcancen un sitio particular (sistema, órgano, tejido o célula) susceptible de ser dañado (órgano diana), por lo que deben estar presentes en una concentración suficiente para producir una manifestación tóxica (efecto crítico) y tengan una vida media que mantenga una concentración del compuesto o sus metabolitos el tiempo suficiente para que se presente el efecto en cuestión (Timbrell, 2002). Dependiendo de la dosis, la duración y la ruta de exposición,

así como de características inherentes al tipo de organismo expuesto, muchos agentes pueden inducir diversos efectos en los órganos y organismos (Holmberg *et al.*, 2001)

Al ingresar al organismo, los xenobióticos pueden ser transformados por las distintas enzimas de las que pueden ser sustrato (Silbergeld, 2001). Al conjunto de reacciones que las convierten en especies químicas distintas que pueden ser menos o más dañinas que el xenobiótico original, se le da el nombre de biotransformación. Si los convierten en sustancias más dañinas se dice que el proceso fue una bioactivación y si lo convierten en sustancias menos peligrosas se dice que el proceso fue desintoxicación (Klaassen y Watkins III, 2005).

La biotransformación consiste en dos fases: a) Fase I, biotransforma a los xenobióticos convirtiéndolos en sustratos de las enzimas de la Fase II, haciendo modificaciones estructurales a la sustancia original mediante oxidación, reducción o hidrólisis obteniendo así un metabolito más hidrosoluble. b) La Fase II incluye reacciones de conjugación en las cuales un metabolito con enlaces de alta energía cede un grupo funcional polar al xenobiótico, o su producto de transformación por la Fase I (Figura 1), haciendo que los procesos de desintoxicación incrementen la polaridad de los xenobióticos lo cual los hace menos difundibles a través de las membranas biológicas y más solubles en el agua, facilitando así su excreción del organismo y reduciendo la magnitud del daño a las células del tejido blanco (Peña, 2001, Silbergeld, 2001).

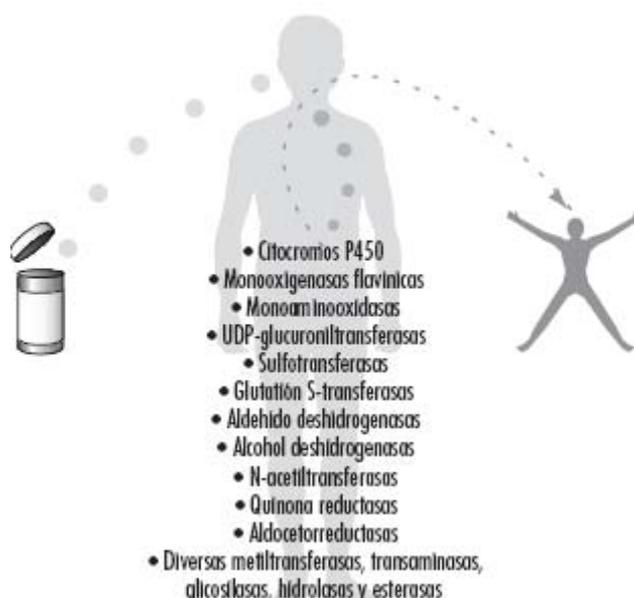


Figura 1. Enzimas de Fase I y Fase II (Silbergeld, 2001)

Estos procesos reducen la cantidad de sustancia que penetra al tejido blanco, así como el tiempo de permanencia del xenobiótico en el organismo y, por lo tanto, la

magnitud del daño probable a las células del tejido blanco, aunque también puede ocurrir en este proceso se generen metabolitos con actividad genotóxica (Silbergeld, 2001).

Toxicología Genética

Dado que un xenobiótico o los metabolitos de éste puede interactuar con el material genético (DNA) alterando la expresión, composición o arreglo del genoma en los organismos; la toxicología genética se encarga del estudio de factores químicos, físicos o ambientales que alteran al DNA, analizando la relación con la exposición, mecanismos de acción y expresión de los efectos genéticos en las células de los organismos (Timbrell, 2002; Klaassen y Watkins, 2005).

Las sustancias o factores capaces de modificar el DNA tienen actividad genotóxica (Misra y Waalkes, 2001). Aunque algunos genotóxicos reaccionan directamente con el DNA y otros son resultado de la activación metabólica, éstos pueden inducir lesiones que deriven en transversión, pérdida, inversión, transición, duplicación, translocación, rompimiento de cromosomas, no disyunción y recombinación (Figura 2), afectando la división y organización celular y, dependiendo del linaje celular afectado, inducir eventos de mutagénesis, teratogénesis o carcinogénesis (Winder, 1993).

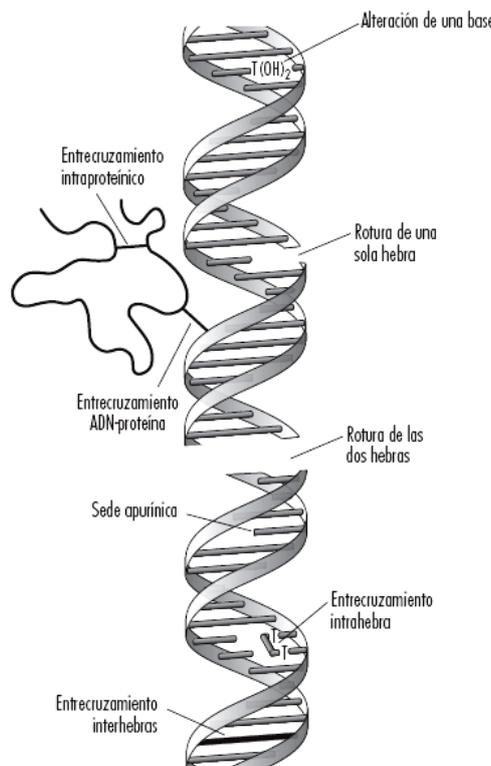


Figura 2. Diferentes tipos de daño al DNA (Silbergeld, 2001)

Los elementos básicos de la mayoría de los procesos de reparación son el reconocimiento del daño, su eliminación y síntesis reparadora y la unión del DNA (Klaassen y Watkins, 2005). Así, la probabilidad de que la lesión genética produzca una enfermedad posterior, depende en última instancia de la naturaleza del daño, la capacidad que posee la célula de reparar o amplificar éste, la oportunidad de expresar la alteración que se haya inducido y la capacidad del cuerpo de reconocer y suprimir la multiplicación de células aberrantes (apoptosis) (Misra y Waalkes, 2001; Klaassen y Watkins, 2005).

Por el tipo de alteración involucrada, los mecanismos de reparación se clasifican en:

- Reparación por escisión de bases – elimina la base dañada.
- Reparación por escisión de nucleótidos – elimina los oligonucleótidos dañados.
- Reparación de roturas bicatenarias – por medio de recombinación homóloga y la unión de extremos no homólogos.
- Recombinación homóloga – produce dos moléculas de DNA (con o sin entrecruzamiento), las cuales no tienen roturas.
- Reparación por O⁶ – metilguanina – DNA etiltransferasa – Protege a las células contra los efectos tóxicos de alquilantes.

Cuando las lesiones no son reparadas o como consecuencia de la reparación la viabilidad de la célula es afectada, ésta puede ser eliminada por apoptosis.

La toxicología genética se basa en la evaluación de eventos genéticos terminales para determinar la genotoxicidad de sustancias o mezclas, sus mecanismos de acción y el efecto causado en el material genético (Huff y DeMarini, 2001; Herrera, 2005) entre éstas se encuentran:

- Daño de integridad al DNA.
- Mutación Puntual.
- Aductos al DNA.
- Aberraciones cromosómicas en linfocitos.
- Micronúcleos.
- Intercambio de cromátidas hermanas.
- Mutación somática y recombinación mitótica.
- Alteraciones del desarrollo.

- Mutaciones letales recesivas ligadas al sexo.

***Drosophila melanogaster* como sistema de prueba.**

Uno de los sistemas de prueba mayormente usado es *Drosophila melanogaster* o mosca del vinagre, la cual ha sido utilizada durante muchos años en estudios de genética básica. Durante el último siglo el estudio de *Drosophila* ha aportado gran cantidad de información. Uno de los avances más importantes se produjo en el año 2000 cuando la secuencia completa del genoma de *D. melanogaster* fue publicada (Adams *et al.*, 2000). Este hecho, junto con la multitud de técnicas y herramientas moleculares para su análisis, ha permitido consolidar a *Drosophila* como organismo modelo en los estudios de Genética.

Entre las principales ventajas de este organismo modelo se encuentran un tiempo de generación relativamente corto (10 días aproximadamente), descendencia abundante, mantenimiento fácil debido a sus reducidas dimensiones, la presencia en el estadio larvario de cromosomas gigantes en las glándulas salivales y un número cromosómico bajo ($2n = 8$).

Otras ventajas de *Drosophila* son la facilidad para producir y combinar mutaciones en su genoma. De esta forma, el fenotipo mutante permite inferir la posible función del gen durante su desarrollo (Török *et al.*, 1993; Deák *et al.*, 1997); además con este organismo es posible verificar la presencia de daño genético *in vivo* en un periodo a corto plazo y los efectos inducidos pueden determinarse tanto en células germinales como en somáticas, pues posee una alta capacidad de activación – desintoxicación (Baars *et al.*, 1980; Kilbey *et al.*, 1981), así como la capacidad de reparar daño genético gracias a la presencia de enzimas dependientes de citocromos P450 cuya actividad se ha probado que es similar a la encontrada en la fracción S9 del hígado de mamíferos (Vogel, 1975; Hällström *et al.*, 1981 a, b; 1982; Clark, 1982); por lo que muestra alta eficiencia en la detección de metabolitos de vida corta ya que no requiere de la adición de un sistema metabólico exógeno (Zijlstra y Vogel, 1988 a, b). Por sus diversas ventajas, *Drosophila* es un organismo ideal para el monitoreo de contaminantes ambientales en dosis sub–letales que permiten la detección de actividad genotóxica de compuestos químicos y mezclas complejas, aportando resultados en la determinación de efectos tanto en células germinales como en somáticas, señalando así, cuándo la exposición a éstos puede ser perjudicial (Ramos *et al.*, 2000).

El ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster es un insecto holometábolo, es decir, presenta 3 etapas larvarias, a los 5 días la larva entra en pupación y se inicia la metamorfosis. Durante este periodo la mayoría de estructuras se formarán principalmente a partir de la reorganización de los: a) discos imagales (cuyas células formarán: la cabeza, alas, antenas, ojos, tórax, patas y genitales de la mosca adulta); b) los nidos histoblastos (que formarán el abdomen del adulto) y c) los grupos de células imagales (dan origen al intestino) (Gilbert, 2003). Posteriormente, el imago emerge de la pupa (Figura 3).



Figura 3. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

Los discos imagales

Son conjuntos de células que permanecen indiferenciadas durante la etapa larvaria y que darán lugar a la formación de los órganos y cutícula del adulto de *D. melanogaster* (Figura 4). Las células precursoras que forman estos discos son alrededor de 10 a 40 al final del desarrollo embrionario, dependiendo del disco imagal; éstas se segregan como invaginaciones de la cutícula embrionaria y se multiplican en número por mitosis (en momentos específicos), la última ronda de división ocurre a las 24 h después de la formación del pupario (Bate y Martínez-Arias, 1991; Cohen, 1993, Amoros, 2006).

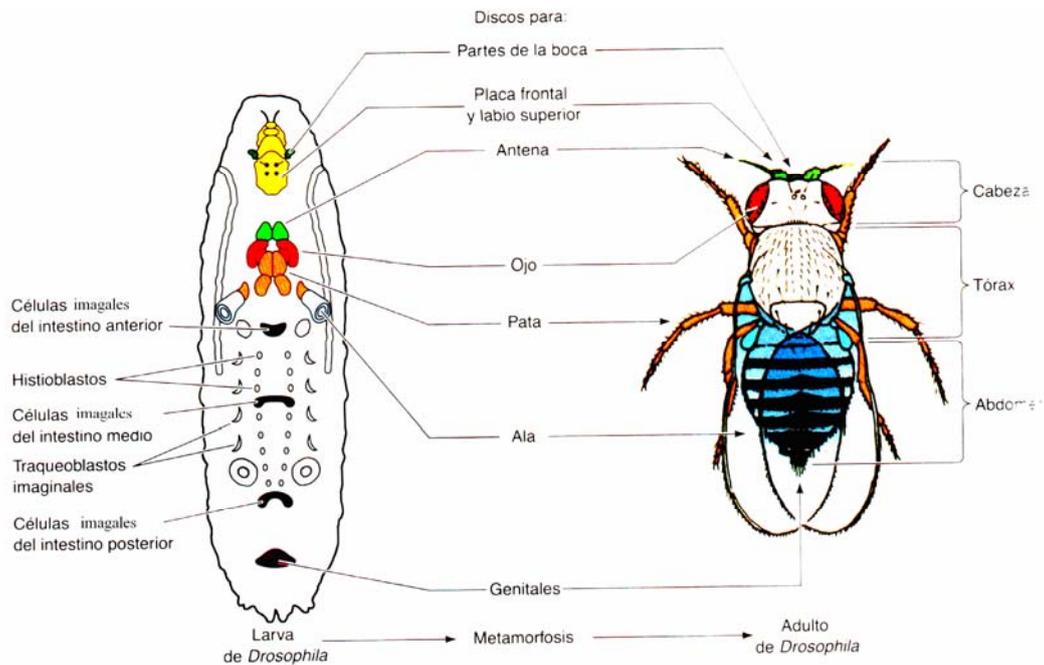


Figura 4. Morfología, localización y estructuras del adulto a las que darán lugar los discos imagales de *Drosophila* (Gilbert, 2003).

A medida que las células proliferan, forman un epitelio tubular que se pliega sobre sí mismo en una espiral compacta. El disco más grande, el del ala, contiene unas sesenta mil células (Fristrom, 1975). En la metamorfosis, estas células proliferan, se diferencian y evierten (Gilbert, 2003).

Existen muchas ventajas por las que se utilizan los discos imagales como modelo de estudio. Se pueden aislar fácilmente, los estudios bioquímicos son posibles debido a que se puede acumular gran cantidad de discos en un período de tiempo relativamente corto y además se pueden mantener *in vitro* en cultivos celulares (Fristrom, 1975), por otro lado, la actividad proliferativa de las células de este tejido le hace ideal para evaluar daño provocado por agentes químicos, físicos y biológicos, así como la inducción de muerte celular.

El disco imagal de ala

Durante la embriogénesis, el disco imagal de ala está formado por un conjunto de unas 40 células, que empiezan a dividirse en la última mitad de la primera etapa larvaria. La proliferación celular continuará durante los demás estadios larvarios, con una división cada 8 horas aproximadamente, hasta obtener un epitelio en monocapa

con 50,000 células aproximadamente (Figura 5) (García-Bellido y Merriam, 1971; González-Gaitán *et al.*, 1994; Milán *et al.*, 1996 a, b).

Durante la segunda etapa larvaria se inicia la expresión del gen *apterous* (*ap*) en las células dorsales y esto especificará la distinción entre dorsal y ventral. Además el acercamiento entre células dorsales y ventrales inducirá la formación del margen del ala (Díaz-Benjumea y Cohen, 1993; Williams *et al.*, 1994; Blair *et al.*, 1995; Milán y Cohen, 2000a).

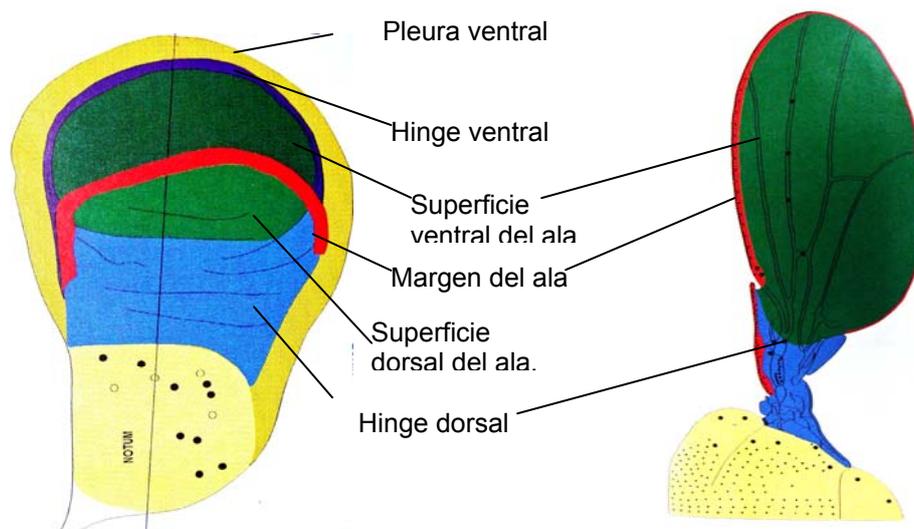


Figura 5. Disco imagal de ala en el tercer estadio larvario. Modificado de Cohen (1993).

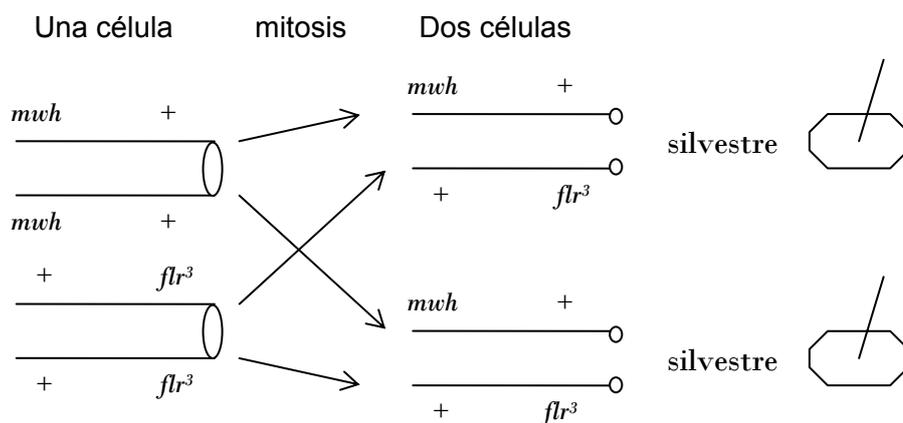
Tras la evaginación del disco, el ala pupal sufre 2 divisiones más que empiezan cerca de las venas y progresan hacia las regiones de intervena (García-Bellido *et al.*, 1971, 1973, 1974; Schubiger y Palka, 1987; Milán *et al.*, 1996b). La primera ocurre a las 18 horas tras la formación del pupario (Schubiger y Palka, 1987; Hartenstein y Posakony, 1989) y se forman extensiones basales entre las caras dorsal y ventral. Aproximadamente a las 22 horas posteriores a la formación del *puparium* tiene lugar la segunda división mitótica, que afecta a un número menor de células. En este momento las 2 capas celulares que conformarán el ala empiezan a unirse por sus superficies basales. A las 40 horas post-formación del *puparium* las alas pupales tienen ya la forma general del ala adulta, y a las 46 horas éstas están plegadas longitudinal y distalmente dentro de la pupa (Gilbert, 2003; Amoros, 2006). Por lo anterior, el ala adulta estará constituida por 2 capas de células continuas (una dorsal y otra ventral, totalmente independientes una de la otra) (Demerec, 1965), en las que se observan tricomas o pelos, formados por la acumulación de fibras de actina en un polo de cada una de las células (García-Bellido y Merriam, 1971; García-Bellido y Dapena, 1974).

Prueba de mutación somática y de recombinación mitótica (Somatic Mutation and Recombination Test, SMART)

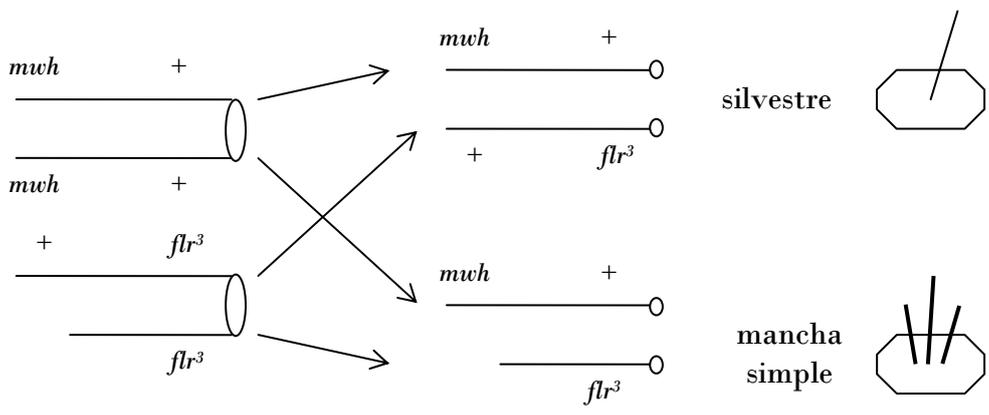
Detecta la actividad mutagénica y recombinogénica de compuestos así como de mezclas complejas en células somáticas de *D. melanogaster* (Graf *et al.*, 1984; Dorantes, 2000; Ramos *et al.*, 2000; Arellano, 2002). Se basa en el empleo de células de los discos imagales que posteriormente darán origen a distintas estructuras del cuerpo de la mosca, en este caso se utilizan las células que darán origen a las alas de la mosca.

Estas células están determinadas genéticamente y al diferenciarse, cada una dará origen a un tricoma, que crece gradualmente; finalmente la célula muere y sólo se observa el tricoma en la superficie de las alas. Por lo mismo se relaciona directamente el número de tricomas (en los sectores) con el número de células que forman el ala (Demerec, 1965; García-Bellido y Merriam, 1971; García-Bellido y Dapena, 1974).

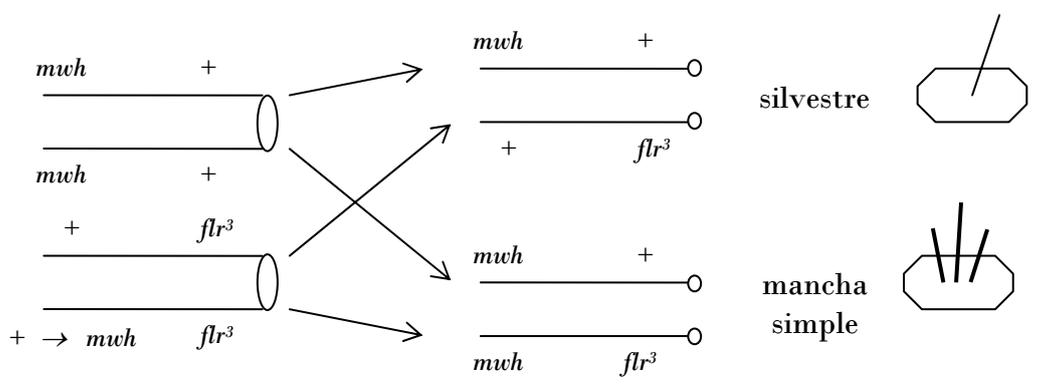
Debido a que las células que darán origen a las alas están determinadas genéticamente se puede detectar si a lo largo del desarrollo larvario ocurre alguna alteración que cambie la información genética, ya sea por eventos de pérdida, recombinación, no disyunción y/o mutación (Figura 6), el cambio será transmitido a las células hijas (descendientes de una célula alterada) dando origen a una mancha distinguible formada por células ó tricomas mutantes en un contexto de células silvestres (Graf *et al.*, 1984).



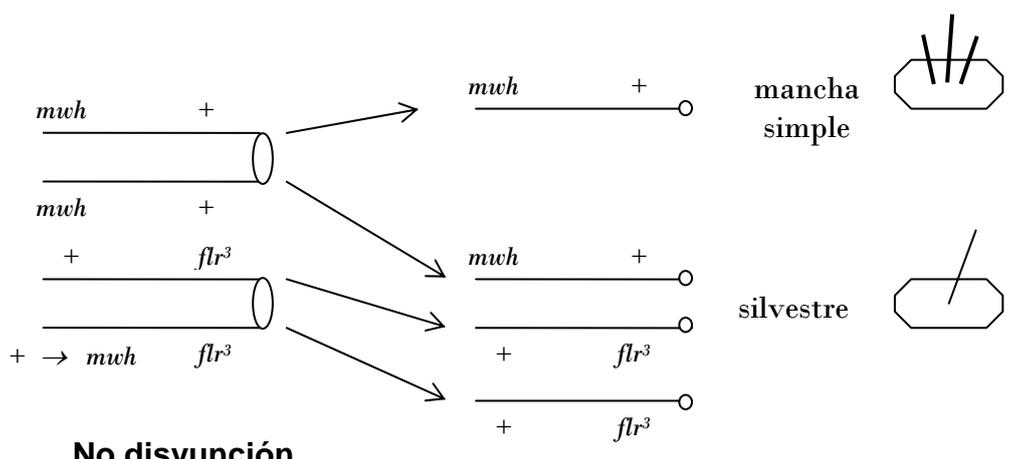
Regular



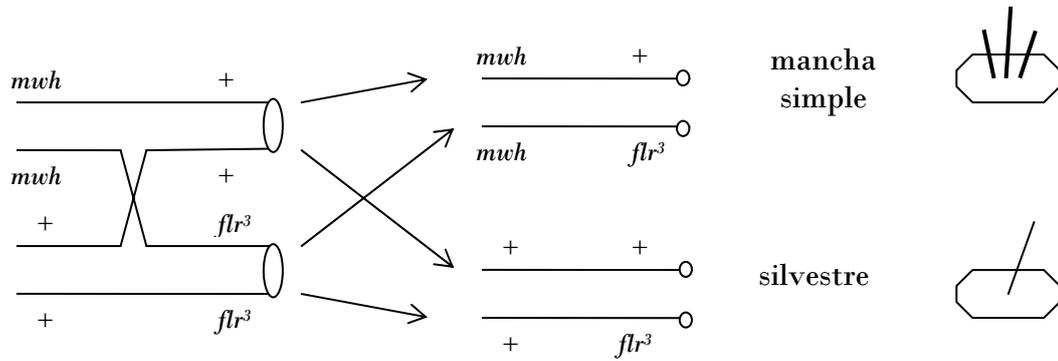
Pérdida



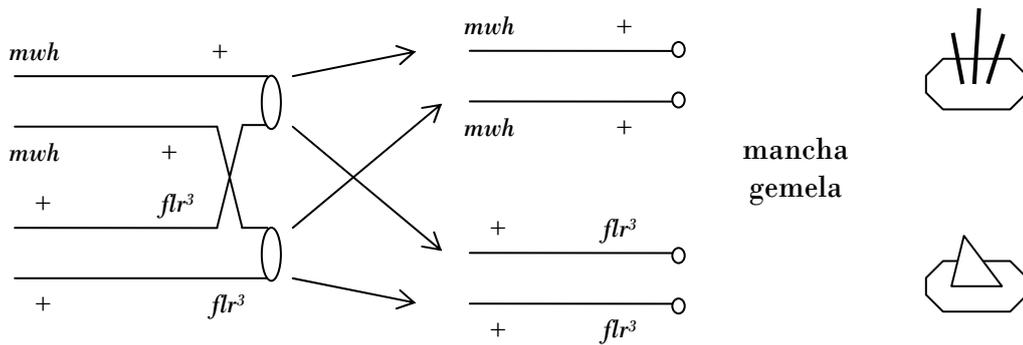
Mutación puntual



No disyunción



Recombinación



Recombinación

Figura 6. Diversas maneras de formación de manchas en la prueba de mutación y recombinación somática, con marcadores genéticos en las células de las alas Modificado de Graf *et al.* (1984).

Los eventos de mutación, no disyunción, pérdida y recombinación entre los marcadores genéticos (*mwh* (multiple wing hair) tricomas múltiples (2 a 7) y *flr³* (flare) tricoma en forma de flama (Graf *et al.*, 1984, Lindsley, 1992), producen manchas simples, pues expresarán solo uno de los dos marcadores involucrados, pero si ocurriera recombinación entre el centrómero y su marcador genético más próximo (*flr³*) se producirán manchas gemelas (la mancha está formada por células mutantes de dos tipos: *mwh* y *flr³*) (Figura 7).

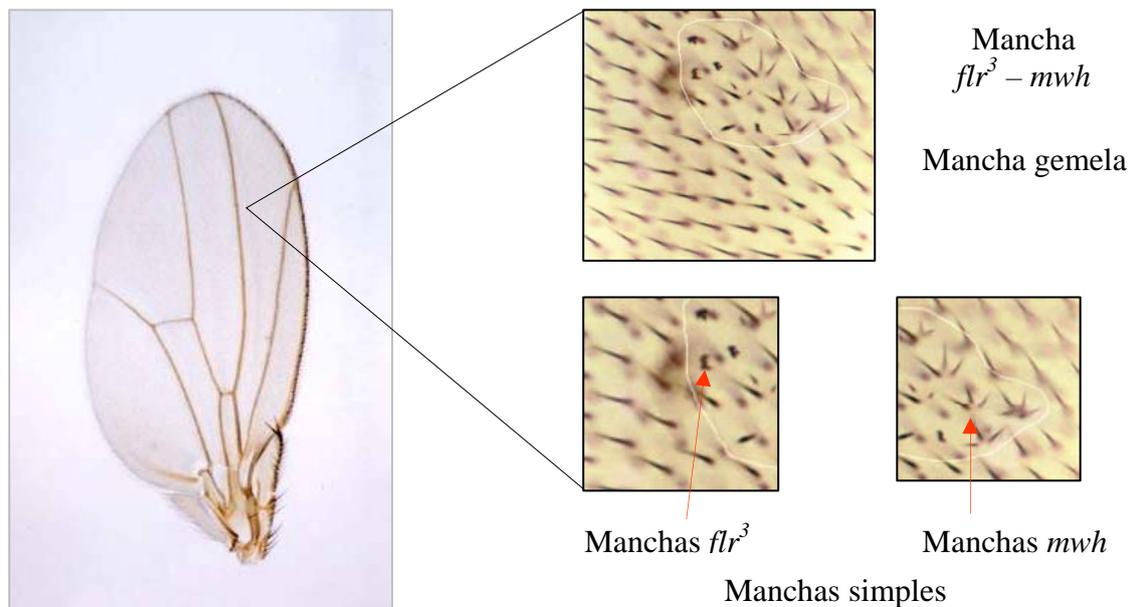


Figura 7. Fenotipo de las manchas mutantes que se observan en las alas.

La aparición y el tamaño de las manchas dependen del número de divisiones celulares que ocurrieron después de la alteración, por lo que puede estimarse el número de ciclos de división involucrados; siempre y cuando no exista muerte celular o arresto mitótico (Graf *et al.*, 1984).

El número de moscas que presentan o no manchas permite la detección de organismos susceptibles a un agente genotóxico. Las moscas no tratadas presentan manchas mutantes con baja frecuencia, pero en las que han sido expuestas, la cantidad de manchas se incrementa afectando a un mayor número de organismos, sin embargo, esta respuesta es variable ya que mientras que algunos individuos presentan gran cantidad de manchas otros no muestran efectos del tratamiento. La identificación de los organismos más susceptibles puede ser de utilidad en la prevención de los efectos dañinos de los genotóxicos (Ramos *et al.*, 2000; Arellano, 2002).

Con esta prueba se han analizado más de 400 compuestos (Vogel *et al.*, 1990, Ramos, 1994) y más recientemente se ha empleado en el biomonitoreo para la detección de agentes genotóxicos en muestras ambientales de agua (Dorantes, 2000; Ramos *et al.*, 2000; Arellano, 2002), así como muestras atmosféricas (Graf y Singer, 1989).

Ramos *et al.* (2000) propusieron que se analice un total de 80 alas por tratamiento en caso de biomonitordeo, permitiendo así, que se puedan establecer decisiones óptimas con respecto a los resultados obtenidos.

Para complementar los resultados de la frecuencia de mutación y recombinación, así como de tamaño de manchas y de manchas por mosca, Arellano (2002) propuso el empleo del índice de sobrevivencia que consiste en determinar la proporción de organismos recobrados después de la exposición a agentes genotóxicos en comparación a organismos no tratados, como una alternativa para obtener información preliminar de posibles efectos genotóxicos para relacionarlos con los obtenidos por la SMART.

Con esto se puede obtener un análisis más completo de los resultados encontrados por los tratamientos ya sea con compuestos o con muestras ambientales, permitiendo un análisis inicial de daño tóxico (evaluado como muerte del organismo) relacionado con el daño genotóxico encontrado.

Zona de estudio:

Cromatos de México, S.A. de C.V.

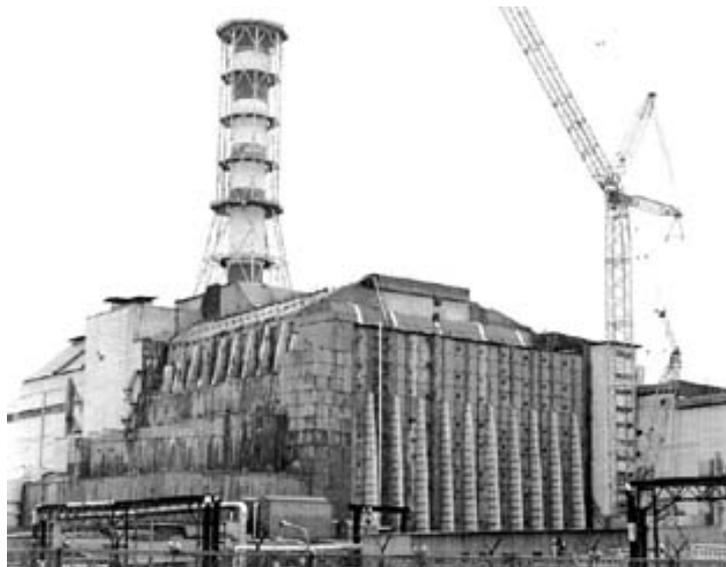
Ubicada en la calle Francisco I. Madero No. 30 de la Colonia Lechería en Tultitlán, Estado de México. El predio ocupa una extensión aproximada de 4.5 hectáreas (Figura 8), colinda al N con una zona deportiva; al S con la Colonia Independencia; al O con estacionamientos recientes y la vía del ferrocarril México – Querétaro y al E con casas y las instalaciones de la escuela “Reforma” (PROFEPA, 1999).



Figura 8. Vista Aérea del Terreno de "Cromatos de México, S.A. de C.V." (Google earth, 2007)

La fábrica estuvo activa por un periodo de 20 años, de 1958 a 1978 (Figura 9). La materia prima era la cromita (FeCr_2O_4) - forma en que se encuentra dispuesto el Cromo de manera natural, cuya procedencia era Sudáfrica -. La composición química de este mineral es: 60% de Cr_2O_3 , < 24% de Al_2O_3 , < 11% de FeO , < 15% de MgO y vestigios de silicio y azufre (PROFEPA, 1999, Castro, 2006); la cromita era refinada, secada y triturada hasta obtener partículas de 74 micrómetros, que eran mezcladas con NaCO_3 o cal, para ser calcinada en el horno rotatorio a temperaturas entre 1,100 y 1,500°C por 4 horas, posteriormente se le agregaba agua para la separación de cromatos solubles y se neutralizaba con H_2SO_4 para filtrar y extraer la alúmina (óxido de aluminio) y el dicromato de sodio formado (PROFEPA, 1999; Castro, 2006). Según un estudio realizado por el Instituto de Geografía, la producción diaria era de 12 toneladas de Cromato de Sodio, 1 tonelada de Cromato de Potasio y casi 8 toneladas de Sulfato de Sodio. De acuerdo con lo anterior se puede inferir que se procesaban materiales por magnitud de 21 toneladas diarias, más el subproducto de dicromato.

Figura 9. "Cromatos de México, S.A. de C.V." antes de ser demolida (Archivo Diario Amanecer)



Durante este proceso se generaban emisiones de cromo no sólo por la chimenea del horno, sino también porque el viento transportaba el polvo, ya que los procesos se llevaban a cabo a cielo abierto, sin control alguno de emisiones ocasionando descargas a los sistemas de drenaje y al aire. Los residuos de este proceso se acumulaban en los terrenos de la empresa y posteriormente se utilizaron como cascajo para rellenar hoyos o nivelar terrenos en los alrededores.

A partir de 1972, la población del lugar inició una serie de reclamaciones a las autoridades, debido a daños a la salud, exigiendo el cierre de la fábrica, así como de la

escuela "Reforma". En 1975, en los trabajadores de la empresa, así como habitantes de la localidad presentaban perforación del tabique nasal, problemas cutáneos (ulceración y dermatitis), irritación de las mucosas y numerosos casos de cáncer lo que dio inicio a inspecciones por parte de las autoridades de salud (Gutiérrez, 1985; Castro, 2006).

En julio de 1976, se realizó el primer análisis de los residuos (polvo amarillo) presente en el escuela y sus alrededores, confirmándose la presencia de cromo en suelo y agua; por falta de cumplimiento en las condiciones de operación y de manejo de sustancias la fábrica fue clausurada temporalmente en marzo de 1977 y en septiembre de 1978 la fábrica se clausuró definitivamente por no acatar las disposiciones ordenadas por los Servicios Coordinados de Salud en el Estado de México (Castro, 2006).

La fábrica es embargada en octubre de 1979 y se empieza el desmantelamiento de las instalaciones con lo que deja al descubierto una cantidad considerable de residuos al aire libre (Gutiérrez *et al.*,1985). En 1983, se llevó a cabo la construcción de un confinamiento con una capacidad aproximada de 30, 000 m³ (Senado de la República, 2004), en el que se almacenaron los residuos de cromo que se encontraban a cielo abierto. En poco menos de 2 meses se detectaron rupturas y deslizamiento de las paredes del confinamiento, dejando al descubierto el material (Gutiérrez *et al.*,1985) por lo que se realizaron trabajos de bacheo en las fisuras.

Tras el cierre de esta empresa el lugar se convirtió en un cementerio de residuos industriales, alojando entre 75 mil y 120 mil toneladas de material residual (Gutiérrez *et al.*, 1985). Quince años después de la clausura, Residuos Industriales Multiquim, S.A de C.V. (RIMSA) presentó una propuesta donde se planteaba la posibilidad de trasladar los residuos a un confinamiento especial, la cual fue rechazada (PROFEPA, 2003).

En el 2000, la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente, en el marco del Programa Nacional de Sitios Contaminados con Residuos Peligrosos, realizó estudios a partir de los cuales se tomó la decisión de declarar a los terrenos de la desaparecida empresa como "zona de contingencia ambiental" (PROFEPA, 2003).

En el 2005, la Dirección General de Residuos Sólidos y Restauración de Suelos Contaminados de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales

(SEMARNAT), dio a conocer que las 75 mil toneladas de residuos enterrados en las instalaciones de la ex-cromadora, conforman el tercer sitio de mayor contaminación química del país, debido a que la sustancia química es corrosiva y al estar mal confinada, también ha contaminado a cuatro pozos de agua (SEMARNAT, 2005).

Finalmente, un grupo multidisciplinario integrado por elementos de la Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental y la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente, la SEMARNAT, la Secretaría de Ecología del Gobierno del Estado de México, el Ayuntamiento de Tultitlán, la Delegación de la SEMARNAT en el Estado de México, el Colegio de Ingenieros Geólogos de México, la Secretaría General de Gobierno y la de Salud del Estado de México y la Agencia Alemana de Cooperación Técnica (GTZ), quienes han realizado análisis en la zona (PROFEPA, 2003) proponen un saneamiento posterior de ésta, después de la demolición de la excromadora en la que se removerá el material a un confinamiento de Mina, en Nuevo León (Universal, 2007) .

El estado actual del contenedor ha permitido que los residuos sean evidentes al exterior debido a la permeabilidad de éstos a través del suelo y las paredes, implicando un posible riesgo para la población aledaña al predio (Figuras 10, 11, 12).



Figura 10. Pared externa del Predio de "Cromatos de México"



Figura 11. Contenedor, las fisuras permiten ver el polvo amarillo característico



Figura 12. Interior de la fábrica "Cromatos de México, se puede ver el polvo amarillo en techo, pared y piso.

Cromo

Entre los contaminantes ampliamente distribuidos en el ambiente están los metales pesados, principalmente aquellos de interés industrial. Con frecuencia, la contaminación por metales pesados tiene su origen en la explotación de éstos, como el cromo el cual es empleado para la industria de cementos, colorantes, construcción, curtidoras, galvanoplastia, material fotográfico, material refractario, metalurgia (producción de acero y otras aleaciones metálicas), pinturas (principalmente las anticorrosivas), entre otros usos (Albert, 1997; Téllez *et al.*, 2004).

Al ser un elemento metálico ampliamente distribuido en la naturaleza, ocupa el cuarto lugar entre los 29 elementos biológicamente más importantes de la corteza terrestre. (Téllez *et al.*, 2004). El cromo no se encuentra solo en la naturaleza, sino formado como cromita (FeOCr_2O_3) o piedra de cromo férrico. El cromo es un metal bastante duro y poco alterable. Aparece como terrones, gránulos, polvo o cristales, es soluble en ácido sulfúrico, su símbolo químico es Cr, número atómico 24, pertenece al grupo VI B de la tabla periódica, situado entre los grupos IIA y IIIA entre los llamados metales de transición. Sus principales propiedades físicas son: peso atómico: 52 g/mol; Densidad: 7.19 g/cm³; punto de fusión: 1.857°C; punto de ebullición: 2.672°C (Galvão, 1987; Albert, 1997; Nordberg, 2001).

Todas las poblaciones están expuestas al cromo, por lo que el riesgo está relacionado no solamente con la presencia de éste, sino también con el estado de oxidación en el que se encuentre y el mecanismo por el que ingresa al organismo, que puede ser por ingestión, respiración y/o contacto. El cromo forma parte de diferentes compuestos dependiendo de sus estados de oxidación: Cr[0] (metal y las aleaciones, biológicamente inerte), Cr[II] (estado cromoso), Cr[III] (cromo trivalente) y Cr[VI] (cromo hexavalente). El estado de valencia [III], es el más estable y produce complejos estables con ligandos orgánicos e inorgánicos (Hartford, 1979), así es como es empleado en la industria. En el estado de valencia [VI], el cromo se encuentra en dicromatos y cromatos (Cotton y Wilkinson, 1980); los cuales se utilizan en operaciones de cromado, manufactura de pigmentos y colorantes, curtido de pieles y tratamiento de madera. Los dicromatos sódico y potásico son usados con frecuencia en la industria como fuente de otros compuestos del cromo, particularmente del óxido de cromo (Tabla 1).

Tabla 1. Compuestos de cromo según su estado de oxidación. Modificada de Téllez (2004).

Compuesto	Fórmula	Estado de oxidación
Óxido cromoso	CrO	II
Hidróxido cromoso	Cr(OH) ₂	II
Tetróxido crómico	CrO ₄	IV
Pentóxido crómico	CrO ₅	V
Óxido crómico	Cr ₂ O ₃	III
Hidróxido crómico	Cr ₂ O ₃ ·xH ₂ O	III
Cromitas	(Cr ₂ O ₄) ²⁻	III
Anhídrido crómico	CrO ₃	VI
Cromatos	(CrO ₄) ²⁻ y (Cr ₂ O ₇) ²⁻	VI

El cromo se encuentra presente en agua y suelo principalmente en dos formas de oxidación: Cr[III] o Cr[VI], pero también puede encontrarse como óxido de cromo, sulfato de cromo, trióxido de cromo, ácido crómico y dicromato (Zouboulis *et al.*, 1995). En presencia de la materia orgánica, el Cr[VI] contenido en agua y suelo es reducido a Cr[III]; sin embargo, las altas concentraciones del ión en estado hexavalente pueden sobrepasar esta capacidad de reducción, lo que impediría su adecuada eliminación (Cervantes *et al.*, 2001).

Tanto los animales como los seres humanos sólo incorporan a su organismo cantidades relativamente pequeñas de cromo por inhalación; la mayoría de las sustancias que contienen cromo ingresan al organismo a través de los alimentos y del agua que se bebe (Téllez, 2004). Pese a que el cromo es un elemento esencial para hombres y animales, niveles elevados de este metal (15 mg en agua de ríos y 0.10 mg /L en agua potable) resultan tóxicos para éstos. Particularmente, el Cr[VI] tiene efectos mutagénicos en bacterias (Viti *et al.*, 2003) y carcinogénicos en animales y humanos (Losi *et al.*, 1994; Viti *et al.*, 2003).

El Cromo [III] es esencial en el desarrollo normal del metabolismo de glucosa, proteínas y grasas, consecuentemente se trata de un elemento indispensable en la dieta (EPA, 2000) pues forma parte de la molécula que constituye el “factor de tolerancia a la glucosa” (FTG). Éste interviene en la unión de insulina con los receptores de la membrana, posiblemente por puentes disulfuros, lo que estimula la absorción de la glucosa del torrente sanguíneo que se transforma a glucógeno. El

estado trivalente es anfótero y es la forma más estable, ya que se requiere una energía considerable para convertirlo en otros estados de oxidación más bajos o más altos (Téllez *et al.*, 2004). Existen incluso complementos alimenticios para aquellas personas que no llevan una dieta balanceada en cromo. El consumo diario promedio de Cr[III] por aire, agua y comida se estima en una cantidad menor de 0.2 a 0.4 microgramos (μg), 2.0 μg y 60 μg , respectivamente (EPA, 1998; ATSDR, 2000).

En contraste con el cromo[III], el cromo[VI] se incorpora activamente a las células, es decir, puede penetrar a la célula con mayor afinidad que el cromo[III], debido al intercambio de aniones fosfato-sulfato (Figura 13) (Mertz, 1969). Sin embargo, una vez dentro de las células, el cromo[VI] es fácilmente reducido a cromo[III] por enzimas como glutatión, ácido ascórbico, cisteína, histidina (DeFlora *et al.*, 1988). Por lo que el metabolismo celular del cromo[VI] puede desempeñar un papel de inducción de genotoxicidad en la célula (DeFlora *et al.*, 1989) debido a que este puede interactuar con macromoléculas dentro de la célula.

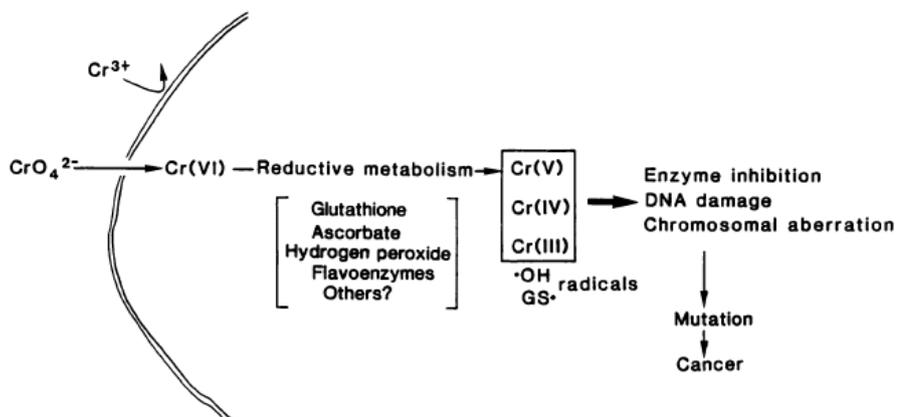


Figura 13. Reducción intracelular de Cromo[VI] (Sugiyama, 1991)

Se ha demostrado que dentro de la célula el Cr[III] puede ser mutagénico tanto para las células eucariotas como para las procariotas (Tabla 2) (DeFlora *et al.*, 1988; EPA, 2000; Borska *et al.*, 2003; Gambelunghe *et al.*, 2003; Viti *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2004; Luippold *et al.*, 2005;). Uno de los posibles mecanismos de genotoxicidad sostiene que si los niveles celulares de Cr[VI] sobrepasan la capacidad de reducción del citoplasma, entonces éste migra directamente al núcleo y puede ser reducido *in situ* sin modificaciones citoplasmáticas, llevando a la producción de radicales de oxígeno y sulfuro muy cerca del DNA (Rom, 1985).

El cromo hexavalente puede disminuir la replicación y fidelidad de la DNA polimerasa, fijándose directamente a los grupos tioles de la enzima lo que produce daño oxidante e interfiere con su función (Téllez *et al.*, 2004). También puede interferir directamente con la síntesis de DNA, ya que disminuye los niveles de nucleótidos en el interior de la célula, por la modificación de los receptores de membrana involucrados en la captación de nucleótidos (nucleótidos permeasas) o su captación por difusión facilitada, llevando a un desbalance de nucleótidos (Rom, 1985; Alexander, 1993).

Además de mutágeno, el cromo es un elemento que se considera clastógeno (DeFlora *et al.*, 1988; Zhitkovich *et al.*, 1996), debido a que causa interacciones con el DNA que provocan tensión en la doble hélice de DNA y producen generalmente rompimientos sencillos o dobles de la cadena: esto es lo que se conoce como actividad clastogénica (DeFlora *et al.*, 1988). También se ha visto que los compuestos de Cr VI presentan efectos citotóxicos y genotóxicos para células bronquiales humanas (Fornace *et al.*, 1981; Singh *et al.*, 1998; Wise *et al.*, 2002), aunque no han sido descritos los procesos específicos de citotoxicidad del Cr[VI], se ha mostrado que induce estrés oxidativo, apoptosis y mutación (Debasis, 2002; Ning *et al.*, 2004).

En estudios realizados en células de ratones (Tsapoakos *et al.*, 1983; Viti *et al.*, 2003) implican al cromo como causante directo de modificaciones en los pares de bases del DNA, así como inductor de alteración de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas y de entrecruzamientos (Fornace *et al.*, 1981). Por otro lado investigaciones realizadas con hepatocitos de ave, muestran que el metabolismo del Cr[VI] está relacionado con la inducción de daño en el DNA debido al incremento en los niveles de glutatión (GSH) y de P450 (Cupo *et al.*, 1985) encontrando que estas enzimas parecen actuar de manera sinérgica, con lo cual inducen mayor cantidad de rompimientos y entrecruzamiento en el DNA (Cupo *et al.*, 1985).

Dado que el cromo tiene gran relevancia por la relativa facilidad de exposición para los organismos, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), clasificó al cromo hexavalente y sus compuestos en el Grupo I de sustancias cancerígenas, es decir que son consideradas como sustancias comprobadamente cancerígenas para el ser humano (IARC, 1997) con base en los resultados de estudios epidemiológicos, así como por bioensayos (bacterias–mamíferos; (Tabla 2)) (Bianchi *et al.*, 1983).

Tabla 2. Pruebas a corto plazo realizadas con cromo hexavalente, Modificado de DeFlora et al. (1988).

Bioensayo	Parámetro medido	
Ácidos nucleicos purificados (DNA, RNA)	Cambios físico – químicos Infidelidad de la replicación de DNA	Ogawa et al., 1989 Borges et al., 1991 Snow, 1994
Bacterias <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i>	Reversión his- → his+ Letalidad selectiva en cepas deficientes en reparación de DNA Inducción de respuesta SOS	Petrilli et al., 1977 Campos et al., 1995 Venier, 1989
Levaduras <i>Schizosaccharomyces cerevisiae</i> <i>Schizosaccharomyces pombe</i> <i>Cryptococcus neoformans</i>	Reversión de mutaciones Recombinación mitótica Conversión mitótica de genes Bioacumulación	Czakó - Vér et al., 1999 Koçberber et al., 2006
Diatomeas marinas <i>Isochrysis galbana</i> Parke <i>Chaetoceros gracilis</i> Schütt	Crecimiento poblacional	Alayo et al., 2004
Células (Gral)	Estimulación de reparación de DNA Aberraciones cromosómicas Intercambio de cromátidas hermanas Transformación (en agar) Transformación morfológica Aneuploidía (alteración del huso) Citotoxicidad Bioadsorción	Cupo et al., 1985 Hamilton et al., 1986 Liebross et al., 1992 Sugiyama et al., 2001 Debasis et al., 2002 Ning et al., 2004 Acosta et al., 2004
Hongos <i>Helminthosporium sp</i> <i>Cryptococcus neoformans</i>		
Plantas <i>Vicia faba</i> <i>Tradescantia paludosa</i>	Aberraciones cromosómicas Micronúcleos	Rendon 1980 Shanker et al., 2005
Insectos <i>Drosophila melanogaster</i>	Prueba de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo Mutación y Recombinación Somática Pérdida de cromosomas sexuales	Amrani et al 1999 Hernández, 2000 Sorensen et al., 2006
<i>Megaselia scalaris</i>	Teratogénesis	Trumble et al., 2004
Peces <i>Boleophthalmus dussumieri</i>	Aberraciones cromosómicas	Krishnaja et al., 1982
Roedores Ratones Hamsters Ratas	Daño a DNA Aberraciones cromosómicas Micronúcleos Letales dominantes Inhibición de reparación en DNA	DeFlora, 1988; 1989
Humanos	Aberraciones cromosómicas Intercambio de cromátidas hermanas	Medeiros et al., 2003 Luoppold et al., 2005

Justificación

Después de la clausura de “Cromatos de México”, los residuos fueron confinados en una estructura carente de características necesarias de acuerdo al tipo de deshecho químico. La incidencia de cáncer y otros problemas de salud fueron relacionados con la presencia de Cr[VI] en los residuos (Neri, 1981) por lo que actualmente las fisuras del contenedor y la permeabilización continua de los residuos hacia el exterior hace necesario evaluar el daño tóxico y genotóxico que los actuales residuos puedan producir. El modelo biológico de la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*), ha sido calibrado como un sistema de prueba para detectar daño en células somáticas de las alas a partir de muestras ambientales complejas de agua (Dorantes, 2000; Ramos *et al.*, 2000; Arellano, 2002)

Hipótesis

Si debido a la cantidad de metales pesados, en particular de Cr[VI] presentes en la muestra ambiental disminuirá e incrementará la frecuencia de mutación y recombinación somáticas en moscas tratadas en comparación con las moscas no tratadas.

Objetivos

General

- Determinar la actividad genotóxica de una muestra ambiental externa a la ex-cromadora en células somáticas de *D. melanogaster*.

Particulares

- Analizar el efecto en el índice de sobrevivencia e índice sexual de *D. melanogaster* de la exposición subcrónica a diferentes concentraciones realizadas con la muestra ambiental.
- Determinar la relación entre el índice de sobrevivencia y la frecuencia de mutación y recombinación somática en las células de las alas de las moscas expuestas.
- Determinar si existe relación entre la concentración de la mezcla y la frecuencia de mutación y recombinación generado en las células somáticas de las alas de *D. melanogaster*.
- Comparar la frecuencia de mutación y recombinación somática de moscas libres y portadoras de múltiples inversiones expuestas a diferentes concentraciones de la muestra.

Materiales y Métodos:

Muestra Ambiental

La muestra ambiental se obtuvo al raspar la pared externa del confinamiento de "Cromatos de México, S.A. de C.V.". Posteriormente, se eliminó la mayor parte de fragmentos de concreto y roca, tras lo cual el material se pulverizó en un mortero. Por medio de espectrofotometría de absorción atómica (NMX051) se cuantificó la cantidad de metales contenidos en la mezcla.

Cruza y marcadores genéticos

Se utilizaron 3 cepas de *Drosophila melanogaster*, 2 de ellas mutantes *flr³/TM3*, *Bd^S* y *mwh,e* (SMART). Mientras que la otra eran moscas silvestres Canton – s (CS), estas últimas se utilizaron como cepa testigo para el índice de sobrevivencia, así como el índice sexual.

a) *flr³/TM3*, *Bd^S*

flr³ (*flare*) está localizado en el cromosoma 3 a 39 u.m., es un gen autosómico recesivo que en homocigosis es letal; los tricomas son reconocidos porque tienen forma de flama, en condición recesiva es letal, por lo cual es necesario de un cromosoma balanceador para mantener este marcador (Lindsley, 1992); *TM3* es un cromosoma balanceador, el cual tiene múltiples inversiones en el cromosoma 3 y como marcador reportero tiene a *Beader^{Ser}* (*Bd^S*), que es un gen letal dominante en condición homocigótica, en las moscas heterocigotas para este marcador se observan muescas en el borde de las alas. La presencia de múltiples inversiones en este arreglo impide que se recuperen eventos viables de recombinación entre los cromosomas, estabilizando el marcador *flr³*. Este esquema de cruza habla de un sistema de letales balanceados, donde sólo se recobran organismos heterocigotos tanto para *flr³*, como *Bd^S* (Lindsley, 1992), ya que los organismos *flr³/flr³* y *Bd^S/Bd^S* mueren.

b) *mwh e*

mwh (*multiple wing hair*) es un marcador autosómico y recesivo, se encuentra en el cromosoma 3 a 0.3 u.m, en condición homociga produce de dos a siete tricomas por célula en lugar de uno como en la condición silvestre. El marcador *e* (*ebony*)

es un gen autosómico y recesivo, por lo que sólo las moscas homocigóticas presentan el cuerpo de color ébano (Lindsley, 1992).

c) Canton- s

Las moscas Canton-S (CS) son de tipo silvestre (Lindsley, 1992).

Para la cruce de SMART se usaron hembras vírgenes *flr³/TM3*, *Bd^S* y machos *mwh,e*, mientras que para la cruce silvestre se utilizaron hembras vírgenes silvestres y machos silvestres CS.

Experimental

Tanto la cruce silvestre CS como la cruce SMART se transfirieron a frascos con medio fresco durante 8 h para recolectar huevos, transcurrido tres días, las larvas de 72 ± 4 h fueron extraídas por medio de un gradiente de densidad con azúcar al 20% (Nöthinger, 1970), la cual hace que las larvas se separen del medio de cultivo y floten.

A partir de una solución stock de 2000 ppm de la muestra ambiental se prepararon las concentraciones a probar mediante diluciones sucesivas, hasta 0.00019 ppm. Aproximadamente 100 larvas se sometieron a tratamiento vía alimentación en tubos homeopáticos de vidrio con 1 g de medio instantáneo (Carolina Biological Supply) y 4.5 ml de dilución de la muestra ambiental. Las larvas permanecieron en este medio por 48 h o hasta la pupación (exposición subcrónica de 72 x 48hrs). Como disolvente y testigo negativo se empleó agua destilada. Para cada concentración se utilizaron al menos 2 series (dos tubos) y el experimento se repitió 7 veces. Emergidas las moscas (Foto 8) se cuantificaron por sexo y fenotipo (en el caso de SMART), para obtener el índice de sobrevivencia (primer indicador de daño al organismo (Arellano, 2002)) e índice sexual (ISx - indica si la mezcla compleja afecta a algún sexo en particular.). Posteriormente se sacrificaron por exceso de anestesia y se fijaron en alcohol al 70%.



Canton – s
Mosca silvestre



flr³/mwhe



mwhe/TM3, Bd^S
Progenie de la cruza SMART

Figura 14. Fenotipos de moscas utilizadas para el tratamiento

Índice de Supervivencia e Índice Sexual

Para obtener el índice de supervivencia se calculó el cociente de la suma total de los organismos recobrados en cada serie de cada concentración entre la suma total de organismos en el lote testigo (Arellano, 2002):

$$\Sigma \text{número total de organismos experimental} / \Sigma \text{número total de organismos control} = \text{IS}$$

Posteriormente los índices de cada serie se promediaron para determinar el $\bar{\text{IS}}$ promedio de cada concentración por tratamiento.

Para calcular el índice sexual se sumaron todos los organismos machos (en este caso) y se dividió entre el total de organismos recobrados (hembras y machos) para cada serie de cada concentración.

$$\Sigma \text{número total de } \text{♂}'\text{s (experimental)} / \Sigma \text{número total de organismos (♀ y ♂) experimental} = \text{ISx}$$

Posteriormente los índices sexuales obtenidos en cada serie se promediaron para calcular el $\bar{\text{ISx}}$ promedio por tratamiento y por concentración.

Los IS de cada una de las concentraciones en los diferentes tratamientos se promediaron y se calculó el error estándar. Para el ISx se procedió de la misma manera. Para establecer si existen diferencias significativas tanto en el IS como en el

ISx, entre las concentraciones, así como entre las cepas, se usó la prueba de ANOVA de dos vías y posteriormente se aplicó una prueba de comparación múltiple de Tukey.

Análisis de SMART

La progenie obtenida de la cruce parental es de dos tipos: 1) moscas libres de inversión (LI; *flr³/mwhe*) y 2) moscas portadoras del balanceador o portadoras de inversiones (PI; *mwhe/TM3, Bd^S*); la diferencia entre estas moscas es que en las primeras se recobran manchas originadas por eventos de mutación, no – disyunción, pérdida y recombinación, mientras que en las otras no se recuperan eventos de recombinación debido a la presencia del cromosoma balanceador; la frecuencia de manchas de ambos tipos de moscas puede ser comparado, para obtener una estimación de la fracción de las manchas derivadas de eventos de recombinación en los organismos expuestos (*Graf et al.*, 1984).

Se realizaron laminillas con 40 alas (20 alas de hembras y 20 alas de machos) según *Graf et al.* (1984); posteriormente fueron revisadas al microscopio óptico a 400X y se analizaron en el programa de computo SMART (basado en la prueba no paramétrica X^2 (Würgler no publicado, *Graf et al.*, 1984; Frei y Würgler, 1988, 1995). Para cada concentración y para cada cepa se analizó un total de 80 alas.

Para determinar la participación de la recombinación en la frecuencia de manchas se analizaron 5 concentraciones (200 ppm – 1000 ppm) de laminillas de moscas PI, que corresponden a concentraciones que dieron respuesta positiva en moscas LI.

Para determinar la frecuencia de mutación y recombinación somática, las manchas se clasificaron por su tamaño en: chicas (1 – 2 células), grandes (> 2 células) y por su fenotipo en: simples y gemelas. La comparación del total de manchas en los lotes experimentales con respecto al testigo puede arrojar los siguientes resultados: positivo, débil positivo, indeterminado o negativo, mediante el contraste de las hipótesis: nula (H_0): las frecuencias en el grupo tratado son iguales a las observadas en el grupo testigo y alternativa (H_a): la frecuencia inducida en el grupo tratado es “m” veces más alta que la frecuencia observada en el grupo testigo (*Graf et al.*, 1984). Donde “m” es la frecuencia basal para cada tipo de mancha, siendo “m= 2” para manchas simples, chicas (las cuales son más frecuentes) y las manchas totales; en ambos casos se requiere duplicar la frecuencia basal para obtener un resultado significativo y “m= 5” para manchas grandes y gemelas (ambos eventos tienen una

frecuencia basal baja, por lo que es necesario incrementar en cinco veces la basal para obtener un resultado significativo) (Frei y Wügler, 1988; Frei *et al.*, 1995).

Las manchas recobradas se ordenan por tamaño para obtener la distribución del tamaño de mancha inducido en las moscas experimentales, la cual se compara cualitativamente con la distribución de manchas de las moscas testigo. El cambio en el tamaño de las manchas recobradas (permite estimar el número de divisiones involucrado en formar a esas manchas) es un indicador de la característica heredable de la lesión inducida por actividad del compuesto o factor en estudio (Dorantes, 2000; Ramos *et al.*, 2000; Arellano, 2002).

Para analizar la distribución de manchas por mosca se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis, seguido de una prueba de comparación múltiple de Dunn's para encontrar diferencias entre las medianas (Steel. *et al.*, 1997) donde se estima la diferente susceptibilidad de los organismos tratados, así como del lote testigo, dado que al exponer organismos ante un mismo estímulo, en este caso un agente genotóxico, algunos organismos van a resultar seriamente afectados, mientras que otros no presentarán evidencias detectables. Identificar a la proporción más susceptible de una población es importante en toxicología genética ya que constituye una alerta temprana de la presencia de cambios ambientales, que al ser detectados y controlados de manera temprana posibilitan la identificación de la fuente genotóxica y con la finalidad de reducir el impacto hacia el resto de la población.

Resultados

Muestra ambiental

Algunos metales como el níquel, hierro, cadmio y el metaloide arsénico pueden estar presentes en las minas de cromo o relacionados con los residuos que producen las cromadoras (Medeiros *et al.*, 2003) y varios han probado tener actividad como mutágenos y carcinógenos (EPA, 1998), por lo que, de estar presentes en la muestra ambiental, podrían contribuir a la genotoxicidad detectada en las pruebas con *Drosophila melanogaster*.

Análisis espectrofotométrico de las muestras ambientales

Las muestras ambientales fueron enviadas a Estudios y Análisis Ambientales S.A. de C.V. y procesadas en el espectrofotómetro de absorbancia atómica para determinar el contenido de metales pesados (Tabla 3), así como total de Cromo[VI], Cromo[III] y Cromo[II] (Tabla 4), de acuerdo al procedimiento descrito por la Norma Mexicana vigente NMX-AA-51-1981.

Tabla 3 Determinación de la cantidad (en gramos por kilogramo) de metales pesados de la muestra ambiental y límites ambientales permisibles.

	Promedio (mg/L)	Desv. Est.	LMPS (mg/L)	LMPA (mg/L)
Arsénico	27	0.03	5.0	0.5
Cadmio	345	0.007	1.0	0.5
Zinc	19900	0.01131	10	6
Hierro	4275000	1.48492	5.0	0.30
Níquel	30000	0.01414	5.0	4
Cromo	9940000	0.00	5.0	0.05

LMPS = Límite máximo Permissible para suelo PROY-NOM-052-ECOL-2001, NOM-052-ECOL-2005;
LMPA = Límite máximo Permissible para agua (uso y consumo humano) NOM-002- ECOL-1996; NOM-127-SSA1-1994

Tabla 4. Determinación de porcentajes de diferentes valencias de cromo a partir de Cromo total

	Promedio %	Desv. Est.	LMPE (mg/m ³)
Cromo Total	100	0	0.5
Cr[VI]	97.79	0.06	0.05
Cr[II, III]	2.21	0.06	0.5

LMPE = Límite máximo Permissible de exposición de contaminantes del ambiente laboral NOM-010-STPS-1999

Dado los resultados obtenidos de los análisis espectrofotométricos, se calculó el contenido de los diferentes tipos de cromo en las diluciones probadas. Así, la concentración stock probada en los tratamientos de 2000 ppm, contiene 200 ppm de cromo. En la tabla 5 se muestran las equivalencias de cromo total y cromo hexavalente que presentan cada una de las concentraciones probadas de acuerdo a los análisis mostrados anteriormente.

Tabla 5. Equivalencias de Cromo total y [VI] en las concentraciones utilizadas para los tratamientos

Muestra Ambiental [ppm]	Cr Total [ppm]	Cr [VI] [ppm]
0.00019	0.00002	0.00002
0.00038	0.00004	0.00004
0.00076	0.00008	0.00007
0.0015	0.00015	0.00015
0.003	0.0003	0.00029
0.0061	0.00061	0.00059
0.0122	0.00121	0.00119
0.0244	0.00243	0.00237
0.0488	0.00485	0.00474
0.097	0.00964	0.00943
0.195	0.0194	0.019
0.39	0.039	0.038
0.78	0.078	0.076
1.56	0.155	0.15
3.125	0.311	0.3
6.25	0.621	0.61
12.5	1.243	1.22
25	2.485	2.43
50	4.97	4.86
100	9.94	9.72
200	19.88	19.44
400	39.76	38.88
600	59.64	58.32
800	79.52	77.76
1000	99.4	97.2
1200	119.28	116.64
1400	139.16	136.08
1600	159.04	155.52
1800	178.92	174.96
2000	198.8	194.4

Índice de Supervivencia (IS).

Como primer indicador para evaluar un efecto tóxico provocado por un tratamiento a organismos expuestos se obtuvo el índice de supervivencia (IS), el cual muestra la cantidad de organismos recobrados en los lotes experimentales con respecto al número de organismos recobrados en el lote testigo (valor referente = 1.0). Dado esto se puede establecer si el tratamiento a 'x' concentración está afectando la supervivencia de los organismos.

Debido a que las moscas libres de inversiones (LI), son heterocigotas para los genes *mwh*, *flr*³ y las moscas portadoras de múltiples inversiones (PI), presentan múltiples inversiones en el cromosoma 3, que impiden la recuperación de eventos viables de recombinación, se emplearon moscas silvestres Canton . s (CS) como referencia o línea testigo para el IS, las cuales no expresan alguna mutación que pudiera interferir con la toxicidad del tratamiento y, en consecuencia puede separarse el efecto de la toxicidad del tratamiento, de la posible interacción entre la toxicidad del tratamiento y el arreglo genético de las moscas utilizadas. Las curvas del IS (promedio \pm error estándar) para las moscas CS, LI y PI se muestran en la Tabla 6 y Figura 15.

Se encontraron diferencias significativas en el IS de los organismos tratados debido a la concentración y el tipo de mosca (ANOVA; $p < 0.05$, Statistics, 1998). Se confirmó la existencia de diferencias significativas para la concentración y el tipo de mosca mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$) (Tablas 7 y 8). La concentración utilizada afectó la supervivencia de las moscas LI y PI a partir de 400 ppm y de las CS a partir de 600 ppm. La LC_{50} para CS, LI y PI se ubicó entre 400 – 600 ppm (Figura 15). Con respecto al tipo de moscas se confirmaron diferencias significativas en el IS de las moscas LI con respecto a las CS y las PI ($p < 0.05$).

Tabla 6. Índices de Supervivencia (IS) de moscas expuestas al tratamiento (promedio \pm error estándar, ES); CS (moscas Canton – S); LI (moscas Libres de Inversión); PI (moscas Portadoras de inversión).

Muestra Ambiental [ppm]	IS CS \pm ES	IS LI \pm ES	IS PI \pm ES
Testigo	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
0.00019	1.05 \pm 0.08	0.96 \pm 0.12	0.84 \pm 0.04
0.00038	1.00 \pm 0.11	1.00 \pm 0.05	0.93 \pm 0.02
0.00076	1.07 \pm 0.16	1.05 \pm 0.12	0.96 \pm 0.08
0.0015	1.12 \pm 0.10	1.04 \pm 0.09	0.86 \pm 0.02
0.003	1.09 \pm 0.21	1.04 \pm 0.56	1.04 \pm 0.21
0.0061	1.06 \pm 0.25	1.40 \pm 0.24	0.73 \pm 0.02
0.0122	1.10 \pm 0.21	1.30 \pm 0.33	0.90 \pm 0.03
0.0244	1.05 \pm 0.26	1.15 \pm 0.26	0.91 \pm 0.21
0.0488	0.94 \pm 0.09	1.04 \pm 0.14	1.04 \pm 0.10
0.0976	1.17 \pm 0.03	1.14 \pm 0.14	0.86 \pm 0.04
0.195	1.19 \pm 0.32	1.20 \pm 0.36	0.92 \pm 0.04
0.39	1.28 \pm 0.41	1.16 \pm 0.12	1.04 \pm 0.21
0.78	1.07 \pm 0.12	1.24 \pm 0.24	1.38 \pm 0.34
1.56	1.15 \pm 0.16	1.23 \pm 0.23	1.19 \pm 0.22
3.125	1.09 \pm 0.07	1.03 \pm 0.11	1.05 \pm 0.09
6.25	1.05 \pm 0.10	1.26 \pm 0.15	1.26 \pm 0.20
12.5	0.95 \pm 0.03	1.01 \pm 0.06	0.92 \pm 0.15
25	0.94 \pm 0.07	1.07 \pm 0.09	0.91 \pm 0.12
50	0.98 \pm 0.02	1.01 \pm 0.07	1.17 \pm 0.31
100	1.05 \pm 0.05	1.17 \pm 0.09	1.21 \pm 0.18
200	1.05 \pm 0.04	0.96 \pm 0.10	0.97 \pm 0.11
400	0.94 \pm 0.11	0.65 \pm 0.07*	0.58 \pm 0.16*
600	0.49 \pm 0.08* **	0.67 \pm 0.07* **	0.47 \pm 0.04* **
800	0.26 \pm 0.03*	0.57 \pm 0.17*	0.26 \pm 0.12*
1000	0.06 \pm 0.02*	0.37 \pm 0.18*	0.21 \pm 0.10*
1200	0.02 \pm 0.00*	0.35 \pm 0.20*	0.20 \pm 0.13*
1400	0.01 \pm 0.02*	0.22 \pm 0.18*	0.12 \pm 0.10*
1600	0.01 \pm 0.01*	0.12 \pm 0.12*	0.05 \pm 0.05*
1800	0.00 \pm 0.0*	0.02 \pm 0.01*	0.01 \pm 0.01*
2000	0.00 \pm 0.0*	0.05 \pm 0.01*	0.01 \pm 0.01*

* Valores significativos con respecto al testigo (ANOVA; P < 0.05) Statistics, 1998; ** LC₅₀

Tabla 7. ANOVA de 2 vías, existen diferencias significativas entre concentraciones y cepas (Statistics, 1998)

1- [PPM], 2-CEPA

	Df Effect	MS Effect	Df Error	MS Error	F	p-level
1	30	3.68773007	633	0.10008696	36.8452568	0
2	2	0.65279049	633	0.10008696	6.52223253	0.00157116
12	60	0.08138133	633	0.10008696	0.81310618	0.84099787

En negritas valores significativos, $p < 0.05$

Tabla 8. Prueba de Tukey (Statistics, 1998); LI fueron diferentes significativamente de CS y PI.

	{1}	{2}	{3}
	.8147203	.8857498	.7748373
CS {1}			
LI {2}	0.03606		
PI {3}	0.34785	0.00035	

En negritas valores significativos con una $p < 0.05$

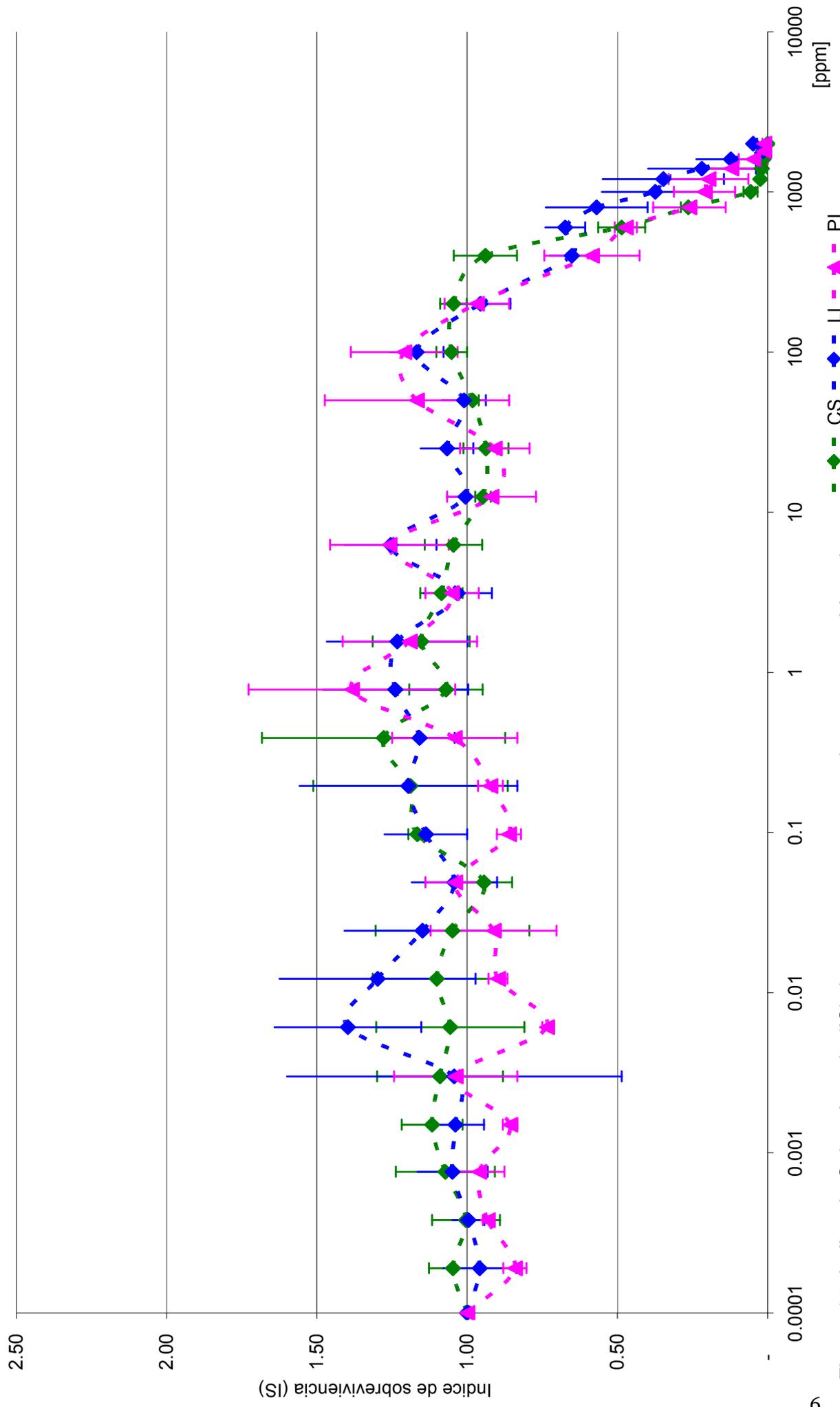


Figura 15. Índice de Supervivencia (IS) de moscas expuestas a la muestra ambiental

Índice Sexual de machos (ISx)

Para determinar si el tratamiento afectó particularmente a uno de los sexos, se comparó la proporción de machos recobrada en las moscas expuestas a la mezcla compleja y los testigos respectivos para cada tipo de mosca. El índice sexual (ISx) (Figura 16) se obtuvo como: número de machos / total de hembras + machos recobrados en ese lote. En la tabla 9 se muestra el ISx (machos) promedio de todas las repeticiones realizadas \pm su error estándar (ES) para moscas CS, LI y PI. Se encontraron diferencias en la proporción de machos obtenida con respecto a la concentración (ANOVA; $p < 0.05$).

Tabla 9. Índices Sexuales (ISx) de moscas expuestas al tratamiento con su error estándar (\pm ES); Cs (moscas Canton - s); LI (moscas libres de inversión); PI (moscas portadoras de inversión).

Muestra Ambiental [ppm]	ISx CS \pm ES	ISx LI \pm ES	ISx PI \pm ES
Testigo	0.48 \pm 0.02	0.51 \pm 0.05	0.52 \pm 0.02
0.00019	0.47 \pm 0.01	0.50 \pm 0.04	0.52 \pm 0.04
0.00038	0.50 \pm 0.02	0.49 \pm 0.03	0.47 \pm 0.01
0.00076	0.52 \pm 0.02	0.48 \pm 0.03	0.52 \pm 0.05
0.0015	0.51 \pm 0.02	0.59 \pm 0.02	0.48 \pm 0.04
0.003	0.55 \pm 0.07	0.53 \pm 0.06	0.53 \pm 0.04
0.0061	0.55 \pm 0.01	0.54 \pm 0.02	0.56 \pm 0.11
0.0122	0.51 \pm 0.003	0.51 \pm 0.05	0.57 \pm 0.03
0.0244	0.51 \pm 0.11	0.53 \pm 0.01	0.45 \pm 0.01
0.0488	0.50 \pm 0.03	0.49 \pm 0.04	0.51 \pm 0.05
0.0976	0.49 \pm 0.01	0.61 \pm 0.07	0.49 \pm 0.02
0.195	0.45 \pm 0.03	0.47 \pm 0.02	0.46 \pm 0.08
0.39	0.51 \pm 0.003	0.47 \pm 0.004	0.51 \pm 0.03
0.78	0.48 \pm 0.01	0.59 \pm 0.04	0.55 \pm 0.03
1.56	0.47 \pm 0.02	0.53 \pm 0.03	0.51 \pm 0.03
3.125	0.50 \pm 0.02	0.54 \pm 0.02	0.51 \pm 0.03
6.25	0.51 \pm 0.02	0.48 \pm 0.02	0.54 \pm 0.03
12.5	0.49 \pm 0.02	0.45 \pm 0.03	0.47 \pm 0.02
25	0.53 \pm 0.1	0.44 \pm 0.03	0.47 \pm 0.04
50	0.53 \pm 0.03	0.52 \pm 0.04	0.48 \pm 0.05
100	0.49 \pm 0.02	0.45 \pm 0.04	0.52 \pm 0.04
200	0.51 \pm 0.02	0.49 \pm 0.02	0.51 \pm 0.02
400	0.54 \pm 0.02	0.48 \pm 0.04	0.52 \pm 0.01
600	0.58 \pm 0.05	0.48 \pm 0.04	0.48 \pm 0.03
800	0.61 \pm 0.04	0.53 \pm 0.05	0.28 \pm 0.15
1000	0.37 \pm 0.21	0.36 \pm 0.20	0.33 \pm 0.17
1200	-*	0.46 \pm 0.04	0.30 \pm 0.2*
1400	-*	0.19 \pm 0.19*	0.12 \pm 0.1*
1600	-*	0.13 \pm 0.13*	0.08 \pm 0.1*
1800	-*	-*	0.28 \pm 0.3*
2000	-*	0.28 \pm 0.28*	-*

- no se obtuvieron machos; * valores significativos respecto al testigo (ANOVA; $p < 0.05$) Statistics, 1998

El ANOVA de dos vías (Tabla 10) aplicado a los datos mostró diferencias significativas entre el ISx debido a las concentraciones probadas ($P < 0.05$), pero no al tipo de mosca (CS, LI y PI) o a la interacción concentración - tipo de mosca. Con la prueba de Tukey se confirmaron diferencias significativas en el ISx de los machos tratados con 800 y 1000 ppm ($p < 0.059$).

Tabla 10. ANOVA de dos vías; existen diferencia significativas entre concentraciones pero no entre las cepas (Statistics, 1998)

1-[PPM], 2- CEPA

	Df Effect	MS Effect	Df Error	MS Error	F	p-level
1	30	0.19921285	222	0.01398829	14.2413998	0
2	2	0.02242638	222	0.01398829	1.60322499	0.20356755
12	60	0.0172646	222	0.01398829	1.23421788	0.14002444

Negritas valores significativos con una $p < 0.05$

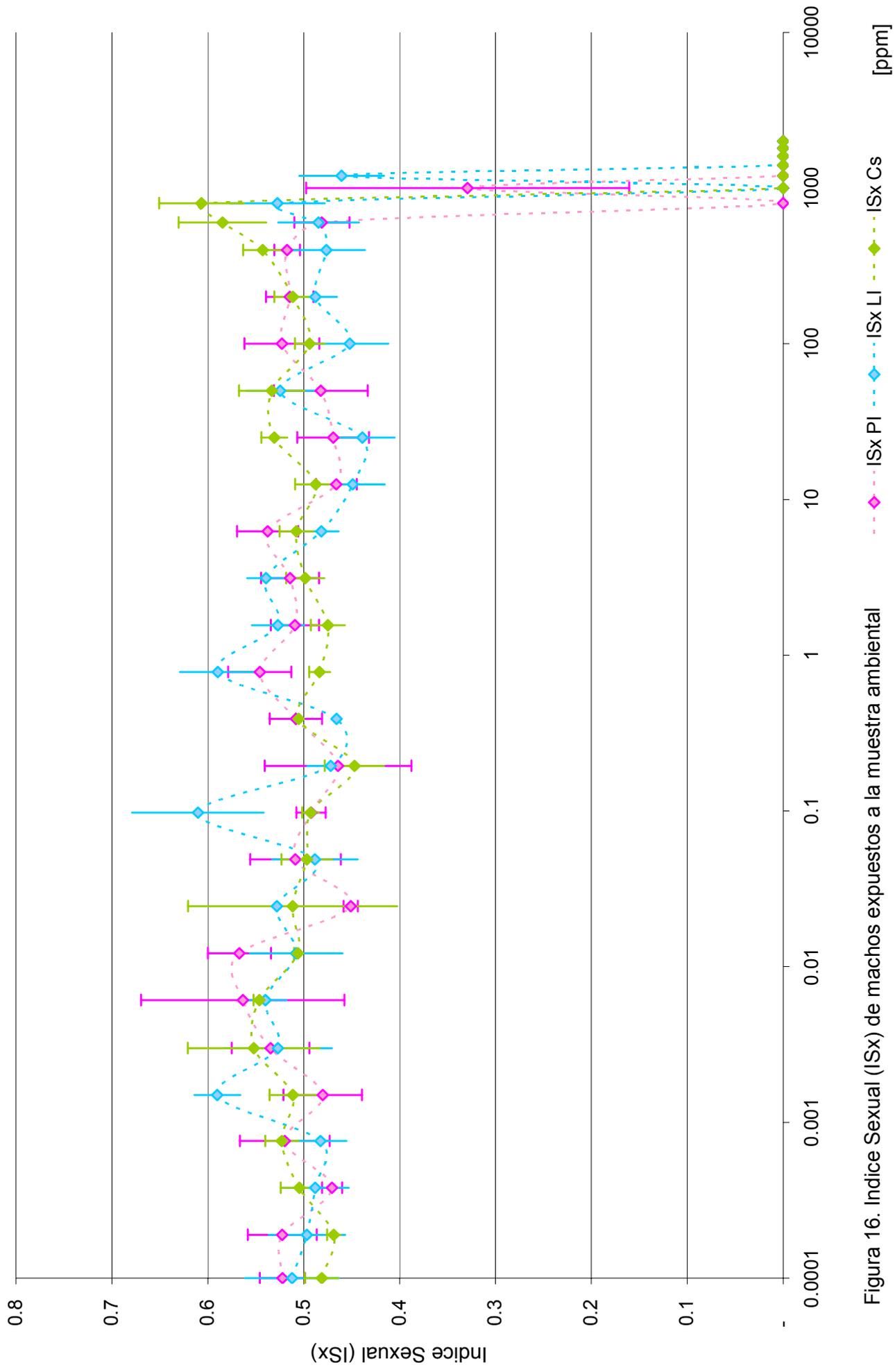


Figura 16. Índice Sexual (ISx) de machos expuestos a la muestra ambiental

Frecuencia mutación y recombinación somáticas.

Para la evaluación genotóxica de los organismos expuestos al tratamiento se utilizaron moscas (LI), que permiten detectar si existe daño causado por el tratamiento debido a eventos de pérdida, mutación puntual, no disyunción y recombinación, mientras que en moscas portadoras de múltiples inversiones (PI) se recobran eventos viables únicamente por mutación puntual, pérdida y no disyunción.

La frecuencia de manchas en las alas en moscas LI se muestra en la tabla 11 y la Figura 17. Se obtuvieron incrementos significativos en la frecuencia de manchas sólo en las concentraciones más altas probadas: para manchas chicas (1 a 2 células) sólo en las moscas expuestas a 800 y 1000 ppm de la mezcla ambiental; para grandes (≥ 3 células) y para el total de las manchas a partir de 400 ppm ($p < 0.05$); no se recobraron manchas gemelas.

En las moscas PI (Tabla 12) sólo se incrementó la frecuencia de manchas grandes en las moscas tratadas con 1000 ppm de la mezcla ($p < 0.05$)

La comparación de la frecuencia de manchas obtenida en las moscas LI y PI mostró que el incremento en la frecuencia de manchas de las moscas LI está relacionada casi en su totalidad con eventos de recombinación (Figura 18).

Debido a que la contribución de las manchas chicas y las grandes a la frecuencia total de manchas no es equivalente (las manchas grandes son eventos raros), la frecuencia de manchas de las moscas experimentales se dividió entre la frecuencia basal obtenida de las moscas testigo, para contrastar la magnitud del incremento como múltiplos de la frecuencia basal de cada tipo de mancha. La Figura 19 muestra los múltiplos correspondientes para manchas chicas, grandes y totales. En las moscas experimentales tratadas con 1000 ppm de la mezcla, la frecuencia de manchas chicas se incrementó 3.3 veces, la frecuencia total en 7.6 veces y la de manchas grandes, 141 veces.

En la Figura 20 se muestra la distribución por tamaño de las manchas obtenidas en cada una de las concentraciones probadas en moscas LI. En las moscas del lote testigo, la mayoría de las manchas son chicas, aunque ocasionalmente aparecen manchas grandes en una frecuencia muy baja. En las moscas experimentales, aún desde las concentraciones más bajas, el número de células que forman las manchas

es gradualmente mayor y a partir de 400 ppm, incluso la forma de la distribución es claramente diferente de la obtenida para las moscas del lote testigo. En las moscas PI, el tamaño de las manchas recobradas también se incrementó con la concentración, aunque en una menor proporción (Figura 21).

En la Figura 22 se muestra la distribución de las manchas recobradas en las moscas LI expuestas a la mezcla ambiental. En las moscas testigo, la mayoría no muestran manchas en sus alas, aunque en ocasiones es posible observar una mancha o un poco más, pero esto constituye eventos relativamente raros. En las moscas de las series experimentales, la cantidad de manchas por mosca tiende a incrementarse. En las moscas LI expuestas a las concentraciones más altas de la mezcla ambiental se recobraron hasta 20 manchas por mosca. Aunque en una proporción mucho menor, en las moscas PI, el número de manchas por cada mosca también fue mayor solo en concentraciones altas (Figura 23).

Para la distribución de manchas por mosca se detectaron diferencias significativas entre las concentraciones con la prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis para las moscas LI ($p < 0.05$; $p < 0.001$, Graphpad Pris, 2006), posteriormente con una prueba múltiple de Dunn´s se confirmaron las diferencias a partir de la concentración 200 ppm hasta 1000 ppm, en el que el número de moscas con manchas es mayor al presentado en moscas no tratadas. Sin embargo, como se muestra en las Figuras 22 y 23, la dispersión en la distribución del número de manchas por mosca se modificó desde concentraciones bajas. En las moscas PI también se encontraron diferencias significativas para el número de manchas por mosca a partir de 600ppm ($p < 0.05$, Graphpad Pris, 2006).

Tabla 11. Resultados obtenidos en la prueba SMART con Moscas $flr^3 / mwh e (LI)$

Muestra Ambiental [ppm]	No. Alas	Manchas Chicas (1-2 células) m = 2			Manchas Grandes (>3 células) m=5			Manchas Gemelas m=3			Total Manchas m = 2		
		No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D	No.	Fr.	D	No.	Fr.	D
0	80	25	0.31	-	1	0.01	-	0	0	-	26	0.32	-
0.00019	80	21	0.26	-	0	0	-	0	0	-	16	0.21	-
0.00038	80	18	0.22	-	2	0.03	-	0	0	-	20	0.25	-
0.00076	76	14	0.18	-	2	0.03	-	0	0	-	16	0.21	-
0.0015	80	22	0.28	-	5	0.06	i	0	0	-	27	0.34	-
0.003	78	26	0.33	-	2	0.03	-	0	0	-	28	0.36	-
0.0061	80	20	0.25	-	2	0.03	-	0	0	-	22	0.28	-
0.0122	80	17	0.21	-	4	0.05	i	0	0	-	21	0.26	-
0.0244	80	16	0.2	-	4	0.05	i	0	0	-	20	0.25	-
0.0488	80	13	0.16	-	5	0.06	i	0	0	-	18	0.22	-
0.098	78	21	0.27	-	4	0.05	i	0	0	-	25	0.32	-
0.195	80	19	0.24	-	2	0.03	-	0	0	-	21	0.26	-
0.39	80	33	0.41	-	2	0.03	-	0	0	-	35	0.44	-
0.78	80	24	0.3	-	1	0.01	-	0	0	-	25	0.31	-
1.56	80	20	0.25	-	2	0.03	-	0	0	-	22	0.28	-
3.12	80	12	0.15	-	2	0.03	-	0	0	-	14	0.17	-
6.25	80	28	0.35	-	4	0.05	i	0	0	-	32	0.4	-
12.5	80	25	0.31	-	6	0.08	i	0	0	-	31	0.39	-
25	80	23	0.29	-	6	0.08	i	0	0	-	29	0.36	-
50	80	29	0.36	-	5	0.06	i	0	0	-	34	0.43	-
100	80	26	0.32	-	6	0.08	i	0	0	-	32	0.4	-
200	80	29	0.36	-	4	0.05	i	0	0	-	33	0.41	-
400	80	14	0.17	-	31	0.39	+	0	0	-	45	0.56	+
600	80	37	0.46	i	73	0.91	+	0	0	-	110	1.37	+
800	80	62	0.77	+	110	1.37	+	0	0	-	172	2.15	+
1000	69	71	1.03	+	97	1.41	+	0	0	-	168	2.43	+

Fr., frecuencia; D., Diagnóstico estadístico (Frei and Würgler, 1988); +, positivo; -, negativo; i, inconcluso; m 5 o m 2, factor de multiplicación. Probabilidad 0.05

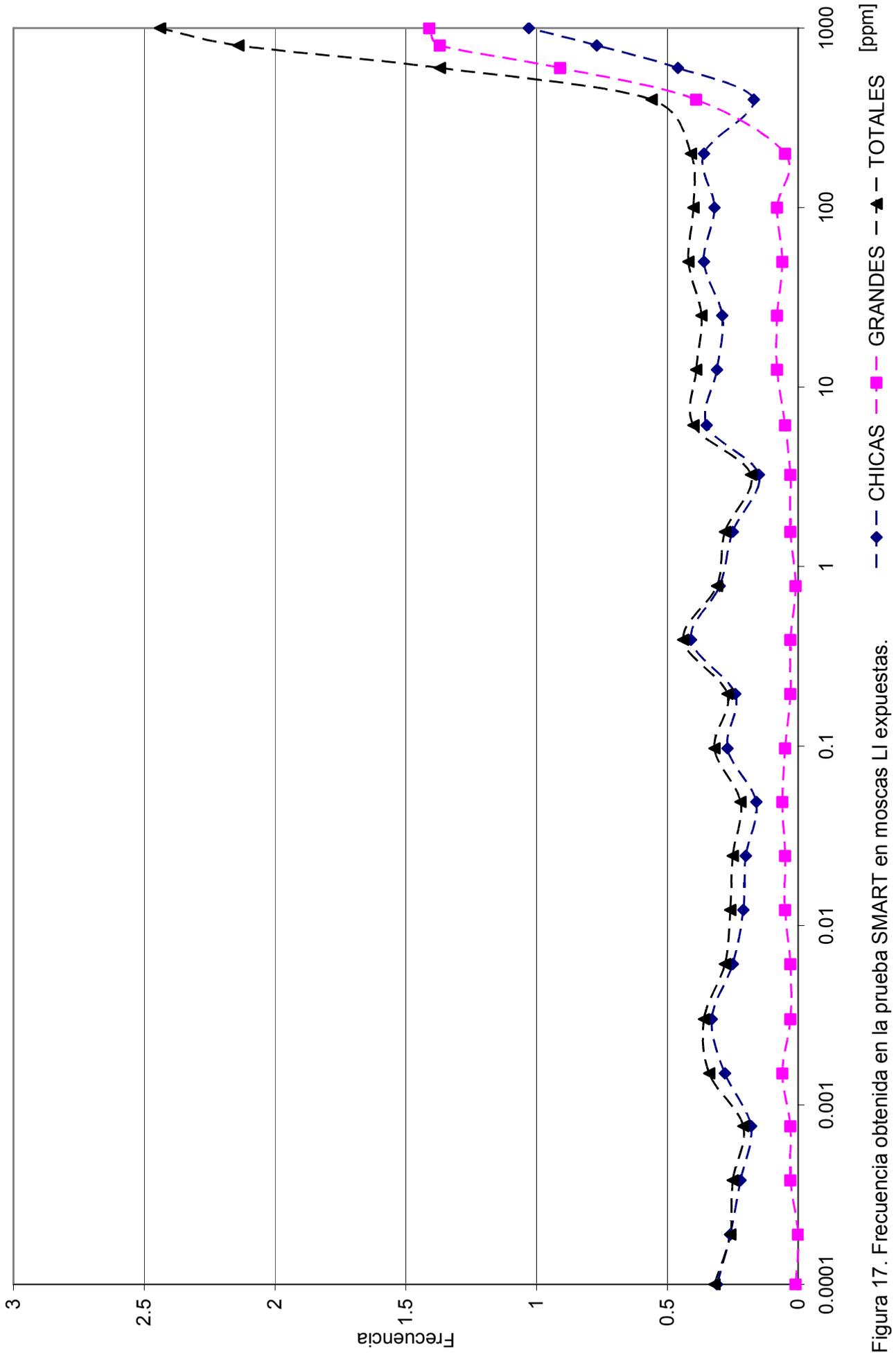


Figura 17. Frecuencia obtenida en la prueba SMART en moscas LI expuestas.

Tabla 12. Resultados obtenidos en la prueba SMART en Moscas *mwh e/TM3, Bd^S (PI)*

Muestra Ambiental [ppm]	No. Alas	Manchas Chicas (1-2 células) m = 2			Manchas Grandes (>3 células) m=5			Manchas Gemelas m=3			Total Manchas m = 2		
		No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.
0	80	21	0.26		1	0.01		0	0		22	0.28	
200	80	15	0.19	-	0	0	-	0	0	-	15	0.19	-
400	68	16	0.24	-	3	0.04	-	0	0	-	19	0.28	-
600	58	13	0.22	-	3	0.05	-	0	0	-	16	0.28	-
800	48	10	0.21	-	2	0.04	-	0	0	-	12	0.25	-
1000	46	14	0.3	-	2	0.04	+	0	0	-	16	0.35	i

Fr., frecuencia; D., Diagnóstico estadístico (Frei and Würzler, 1988);+, positivo; -, negativo; i, inconcluso; m 5 o m 2, factor de multiplicación. Probabilidad 0.05

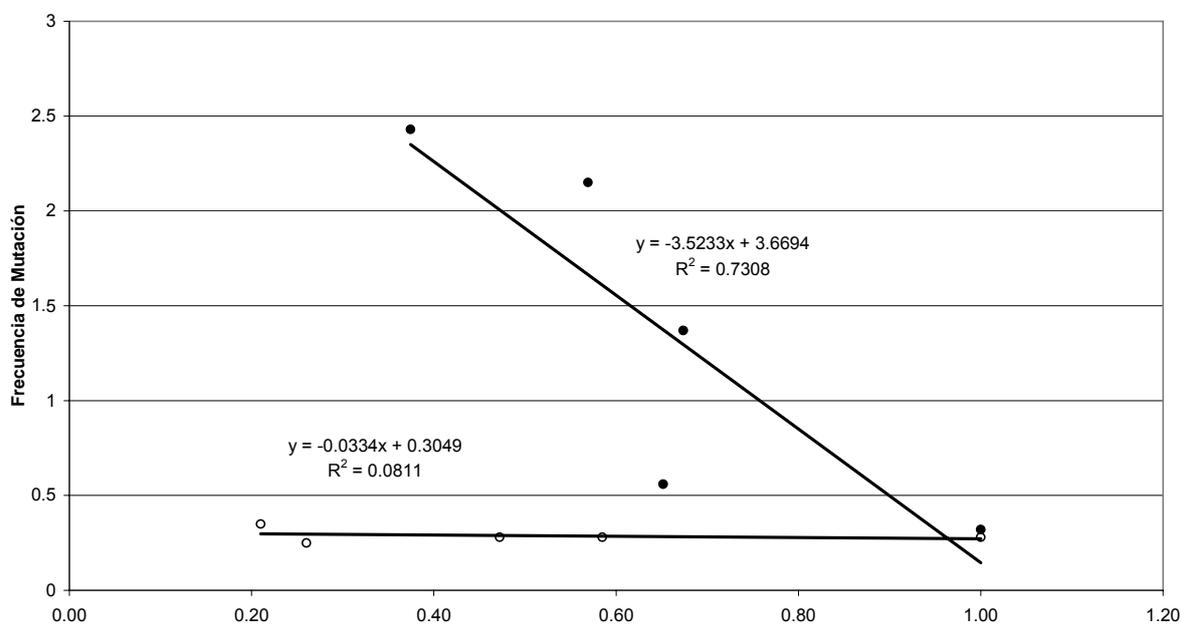


Figura 18. Curva de regresión lineal del Índice de Supervivencia (IS) y la frecuencia de mutación de moscas LI y PI tratadas con la muestra ambiental

● LI ○ PI

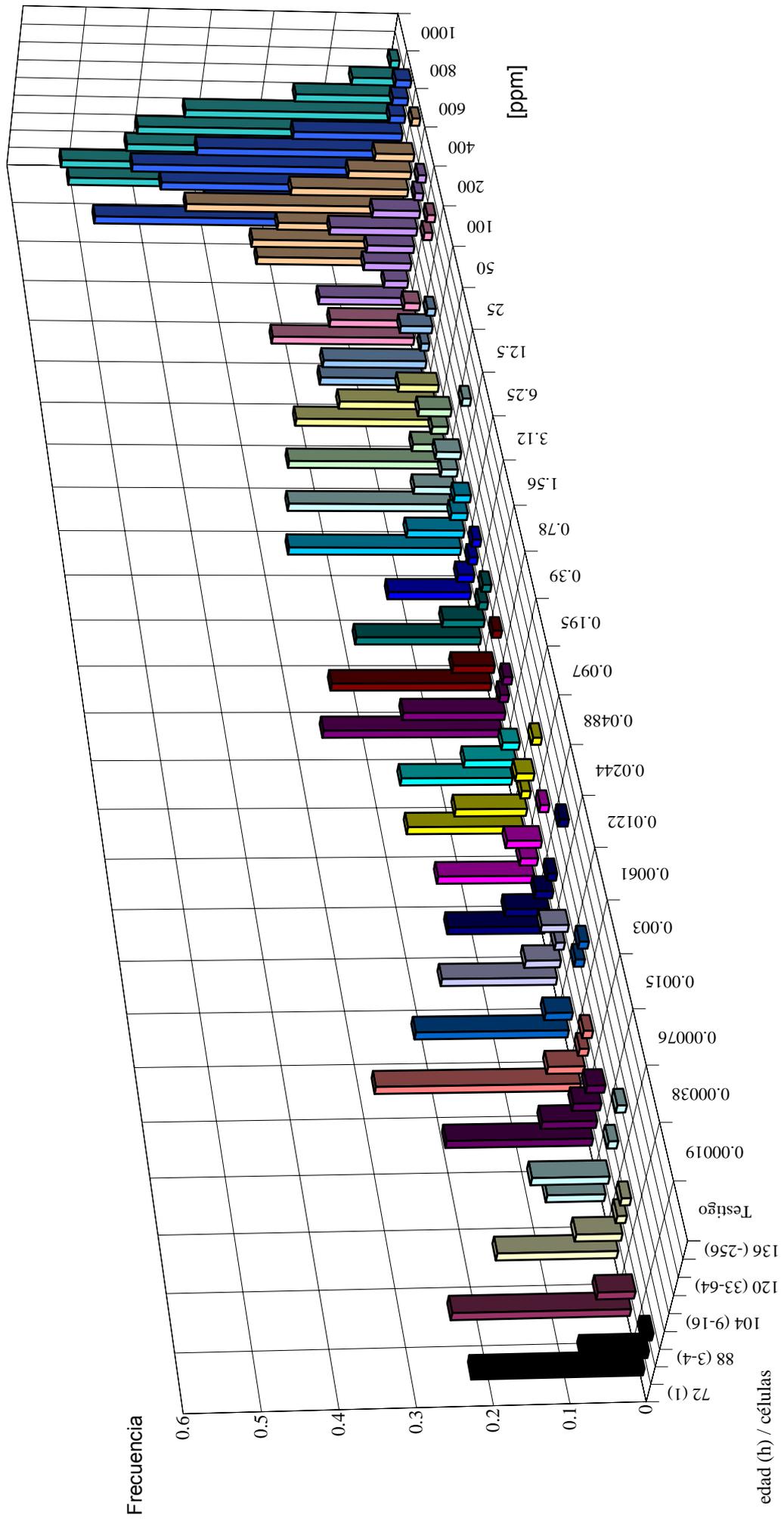


Figura 20. Células por mancha inducidas en moscas LI expuestas a la muestra ambiental.

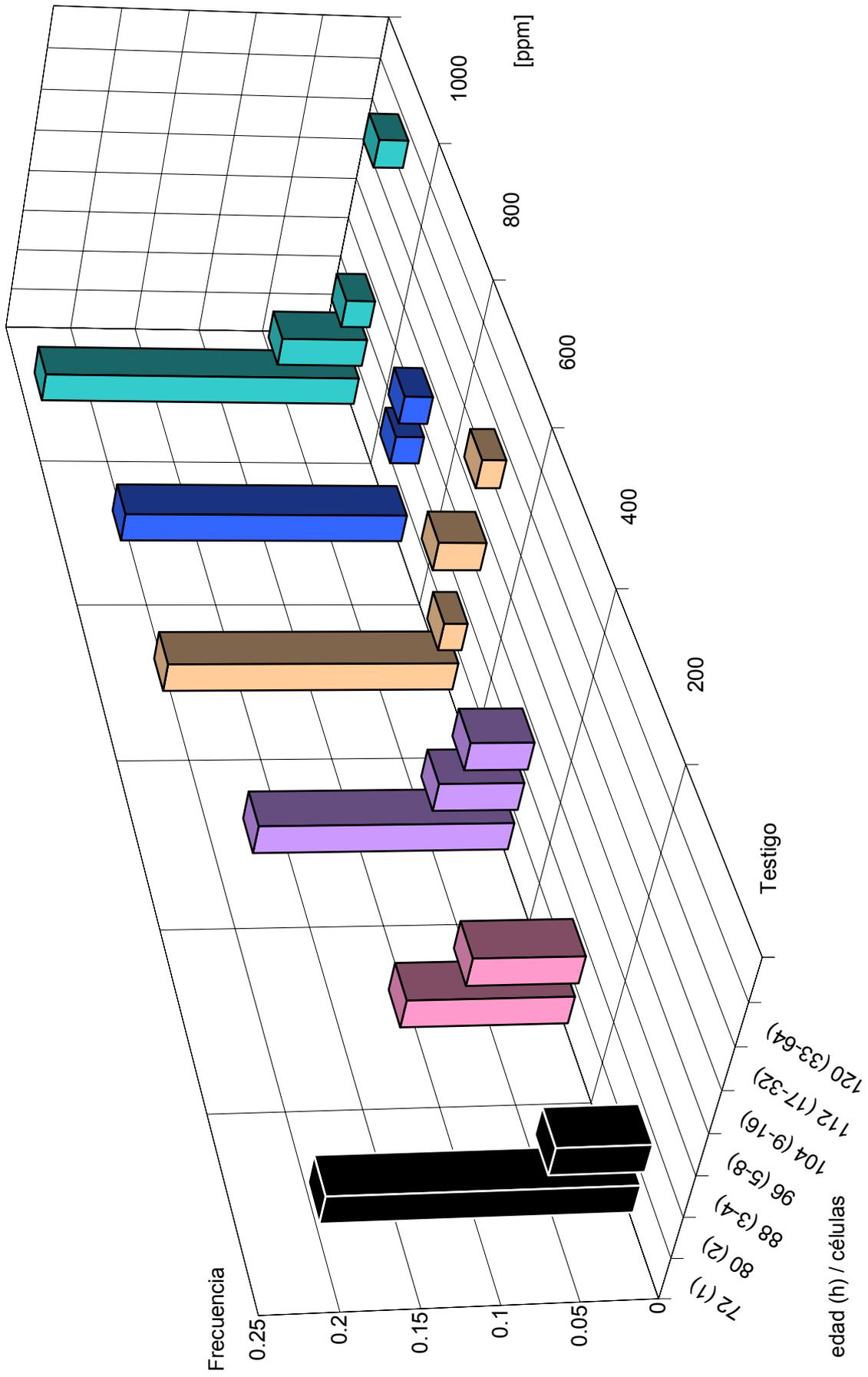


Figura 21. Células por mancha inducidas en moscas PI expuestas a la muestra ambiental

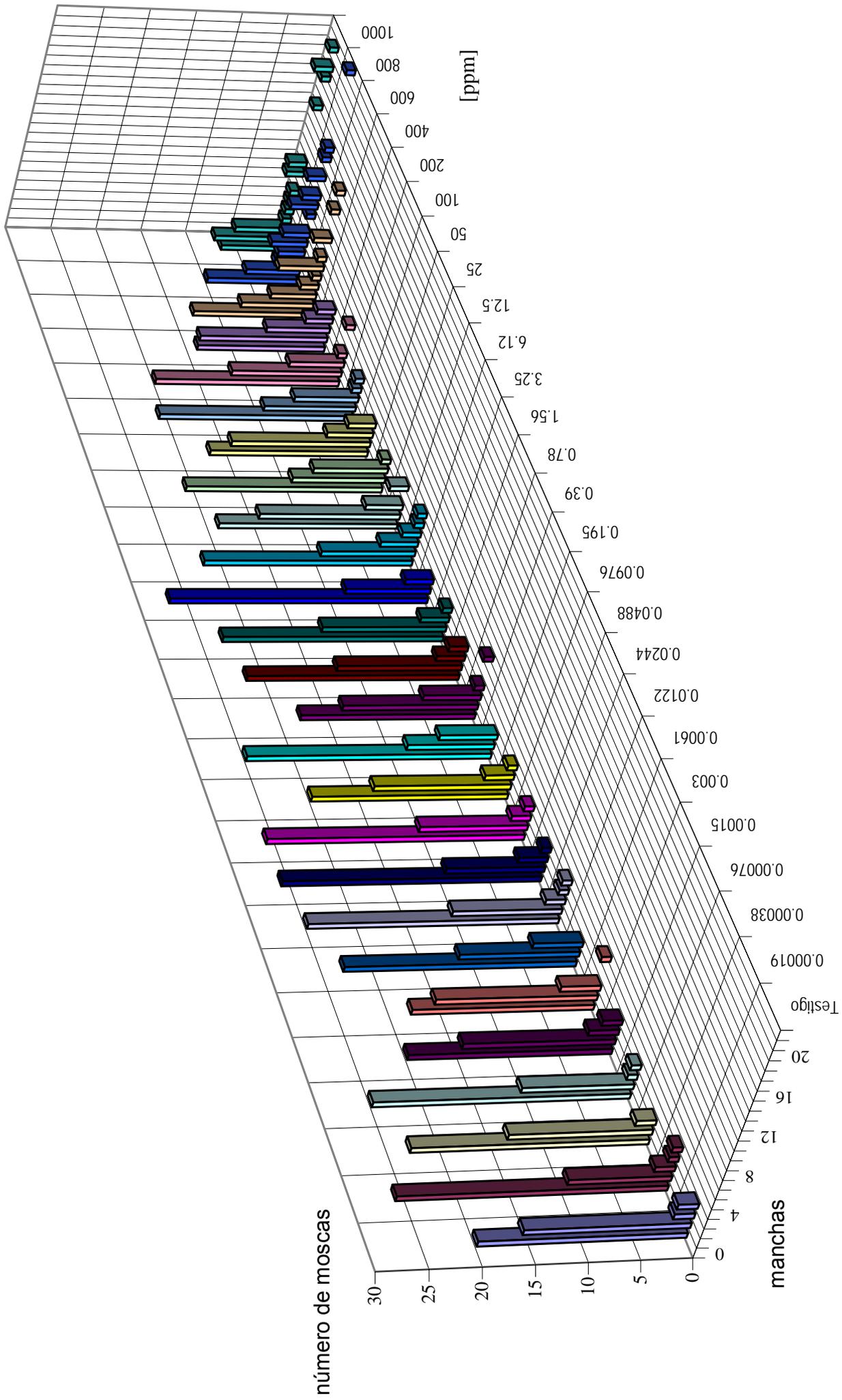


Figura 22. Número de manchas por mosca inducidas en moscas LI expuestas a la muestra.

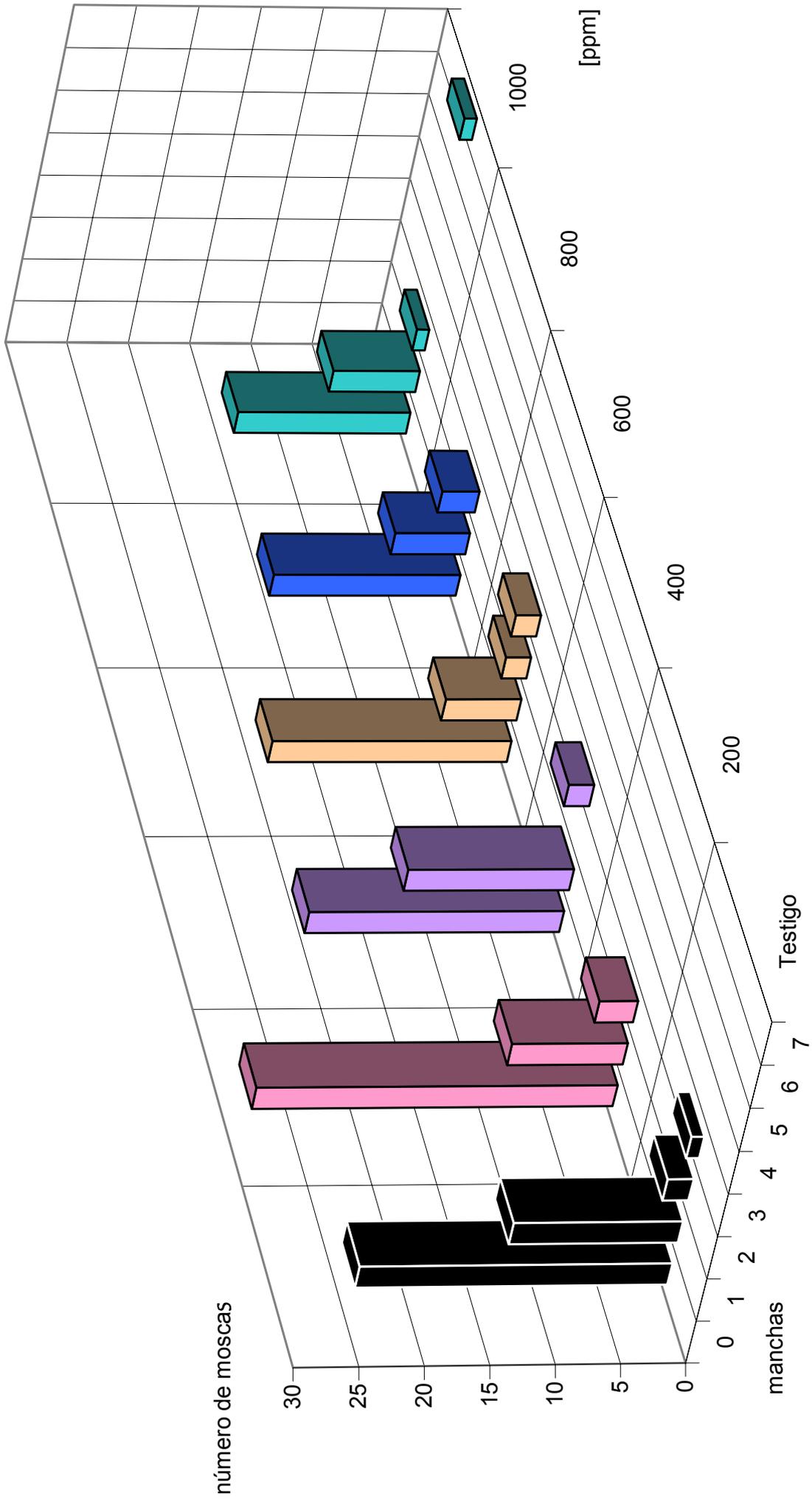


Figura 23. Número de manchas por moscas inducido en moscas PI expuestas a la muestra.

Finalmente, se encontraron malformaciones en el cuerpo de las moscas expuestas a la mezcla ambiental como son: sedas dobladas en un ángulo de 45° (sedas tipo *bent*) en el escutelo, abdomen mal fusionado, patas malformadas, así como, venación extra en las alas de las moscas, pero no se muestran el total de eventos registrados ya que es necesario realizar una prueba adicional a la de SMART para analizar este tipo de daño.

Discusión

El manejo de residuos tóxicos derivados de la actividad humana (industrial y antropogénica) ha sido una preocupación permanente por su relevancia para la salud de los organismos y particularmente del hombre. La clausura de la empresa “Cromatos de México” en la década de los 70 fue una acción basada en las evidencias del efecto dañino de los compuestos utilizados en la actividad de la empresa en la salud de trabajadores y vecinos de las zonas aledañas, así como de los hallazgos reportados utilizando diversos bioensayos, lo que confirmó la presencia de actividad genotóxica en los compuestos de cromo y sentó las bases para establecer su asociación con la inducción de procesos cancerosos (Rosas, 1984; Castro, 2006; Ledezma, 2006).

El confinamiento de los residuos derivados de la actividad de esta empresa constituyó un problema adicional ya que no se disponía de lineamientos adecuados para construir una estructura que contuviera efectivamente a los residuos. De hecho, aún con instalaciones que se construyen considerando el tipo de residuo que albergarán, se considera que no existe un tipo de estructura totalmente seguro. En general, la vida de un confinamiento es de 20 años, después de lo cual se detectan efectos relacionados con el lixiviado de los residuos, la presencia de grietas, fisuras y otros eventos que contribuyen a la liberación del residuo resguardado (INE, 1994).

Uno de los aspectos de mayor importancia en el confinamiento de residuos peligrosos es la composición química de los derivados. En el caso particular de “Cromatos de México”, los derivados consistían de cromato de sodio [VI]; cromato de potasio [VI], sulfato de sodio [VI] y varios dicromatos [VI], todos ellos compuestos con estado de oxidación [VI].

Los residuos se albergaron en una estructura de concreto impermeabilizada parcialmente. En meses se formaron grietas en la estructura y con el tiempo los residuos salieron, tanto por derrumbes parciales, como por la permeabilización de los compuestos a través de las paredes. Actualmente es posible observar residuos de color amarillo en las paredes externas del contenedor, así como en las calles y casas aledañas.

Para establecer si los residuos corresponden a derivados de cromo, el primer paso consistió en determinar la composición de una muestra ambiental. El análisis

espectrofotométrico realizado a la muestra ambiental indicó que alrededor del 10 % de ésta corresponde a compuestos de cromo y de éstos, la mayoría (99.7 %) a cromo [VI], estado de oxidación que ha sido asociado con la inducción de un amplio espectro de daño en los organismos, en especial a nivel genético (DeFlora *et al.*, 1988, 1989; EPA, 1998). Con base en la determinación de contenidos se puede afirmar que actualmente los habitantes de esta zona se encuentran expuestos a niveles mayores a los límites permisibles de acuerdo a las NOMs establecidas en México para suelo, como para uso y consumo de agua y exposición en un ambiente laboral (SEMARNAT, 2007).

Para determinar si la muestra ambiental tiene actividad genotóxica se usó el sistema biológico de *Drosophila melanogaster*. Siguiendo las recomendaciones de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, Environmental Protection Agency) se obtuvo un indicador de toxicidad. En el presente estudio se determinó la toxicidad a través del Índice de Supervivencia (IS) el cual informa de la proporción de los organismos que sobreviven a un tratamiento. También, como testigo de línea para discriminar si el efecto obtenido se debe al tratamiento o a la participación de los marcadores empleados en el bioensayo que pudieran sesgar la respuesta de toxicidad se realizaron tratamientos en paralelo con moscas de tipo silvestres Canton-s (Arellano, 2002).

El IS obtenido fue similar para las moscas de tipo silvestre (CS) y para los dos tipos de progenie derivada de la cruce SMART: libres y portadoras del cromosoma balanceador que presenta múltiples inversiones, LI y PI, respectivamente. A partir de 400 ppm se obtuvo menor supervivencia de la progenie SMART y a partir de 600 ppm fue menor el IS de las moscas silvestres ($p < 0.05$). Para los tres tipos de moscas, la LC_{50} se ubicó entre 400 y 600 ppm de la muestra ambiental y la concentración mayor probada (2000 ppm) resultó prácticamente letal para todas las moscas. El genotipo de las moscas sí tuvo efecto en la toxicidad y de acuerdo con el análisis de Tukey ($P < 0.05$), las moscas LI se comportaron de forma distinta a las PI y las CS, entre las que no se encontraron diferencias; esto sugiere que la presencia de esa combinación de marcadores morfológicos podría intervenir en la expresión de otras funciones no consideradas, como por ejemplo, la modulación de la actividad metabólica en los organismos tratados con la muestra ambiental (Clements *et al.*, 1988; García, 2006); sin embargo, considerando la curva obtenida en su conjunto, se puede asumir que la respuesta de los tres tipos de moscas utilizados fue similar.

La toxicidad del tratamiento afectó por igual a hembras y machos. Sólo en las concentraciones mayores probadas, la proporción de machos fue menor, sin embargo, dada la toxicidad del tratamiento en éstas se recuperaron pocos organismos, por lo que la menor aparición de machos podría estar sesgada por el bajo número de sobrevivientes.

Para evaluar la genotoxicidad de la muestra ambiental en moscas tratadas se utilizó la prueba de mutación y recombinación somática (SMART), la cual ha sido empleada anteriormente para evaluar muestras ambientales (Dorantes, 2000; Ramos *et al.*, 2000; Arellano, 2002), así como la actividad genotóxica del Cr[VI] (Graf *et al.*, 1992; Amrani *et al.*, 1999, Hernández, 2000).

En las moscas LI, la frecuencia de manchas totales y grandes se incrementó a partir de 400 ppm de la mezcla ambiental y la de manchas chicas a partir de 800 ppm, lo que equivale aproximadamente a 40 y 80 ppm de Cr[VI]. No se recuperaron manchas gemelas, de manera que para establecer la participación de la recombinación en la formación de las manchas en las alas se comparó este resultado con la frecuencia de manchas en moscas PI, en las que no se recuperan manchas originadas por recombinación. En las moscas PI sólo se incrementó la frecuencia de manchas grandes en las moscas expuestas a 1000 ppm de la muestra ambiental (aproximadamente 100 ppm de Cr[VI]), por lo que se puede asumir que la recombinación es el principal mecanismo de formación de las manchas. Se ha reportado que el Cr[VI] tiene actividad clastogénica (De Flora *et al.*, 1988, 1989; Ried, 1997; EPA, 1998; O'Flaherty, 2001; Gambelunghe, 2003), lo cual apoya los resultados obtenidos en este trabajo.

Uno de los problemas de los criterios para establecer actividad genotóxica en los diversos sistemas de prueba empleadas es la sensibilidad que los organismos utilizados en éstas puedan mostrar. En particular, en la SMART, se considera que existe actividad genotóxica cuando la frecuencia de manchas totales es duplicada ($m = 2$, donde m es un múltiplo de la frecuencia basal). Las manchas se agrupan por su tamaño en chicas y grandes, siendo las primeras más numerosas, por lo que el criterio para un resultado significativo se mantiene ($m = 2$). Las manchas grandes son menos frecuentes, de manera que para reducir la posibilidad de un diagnóstico falso, el criterio para un diagnóstico significativo es más exigente ($m = 5$). Las manchas grandes tienen una gran relevancia en la respuesta de genotoxicidad porque su aparición hace evidente que después de la inducción de la lesión, ésta se ha reparado

y la célula afectada mantiene la capacidad de proliferar mitóticamente, bajo la suposición de que la edad del organismo expuesto lo hace posible (en este trabajo, las larvas se exponen a partir de las 72 h por lo que todavía transcurrirán 48 h antes de la formación del pupario). Se ha establecido que la última ronda de división de las células de las alas ocurre a las 24 h post formación del pupario (García-Bellido y Merriam, 1971).

Por otra parte, las manchas pueden ser sencillas o gemelas. Las primeras pueden ser originadas por cualquiera de los eventos terminales que evalúa SMART, mientras que las segundas sólo se producen por un tipo de intercambio ubicado entre el marcador distal (*flr*³) y el centrómero, sin embargo, no todos los compuestos inducen este tipo de manchas. Amrani *et al.* (1999) y Hernández (2000) al utilizar SMART para obtener la curva concentración-respuesta de compuestos de cromo, entre ellos dicromato de potasio, reportaron un incremento significativo en la frecuencia de todo tipo de manchas, a partir de 3.2 ppm del compuesto.

Conforme se ha probado mayor cantidad de compuestos en la SMART se han identificado indicadores adicionales para comprender la respuesta de genotoxicidad, de manera que se reduzca la posibilidad de obtener diagnósticos falsos tanto positivos, como negativos. Así, se ha visto que en tratamientos previos a la inducción significativa en la cantidad de manchas, las características de éstas se modifican, tanto en el tamaño, como en la manera en la que se distribuyen en los organismos expuestos.

En los resultados obtenidos se observa que a partir de concentraciones menores se recuperan manchas de mayor tamaño que las que aparecen en las moscas testigo, aunque el número de manchas grandes no es suficiente para provocar un incremento en la frecuencia sino hasta la concentración de 400 ppm. Lo anterior se observa tanto en las moscas LI como en las PI. Si bien, con base en los criterios establecidos para diagnosticar genotoxicidad en esta prueba (Graf *et al.*, 1984) no puede confirmarse la actividad genotóxica en concentraciones menores a 400 ppm de la mezcla, por lo que es importante tomar en cuenta que los organismos tratados muestran cambio en el tamaño de las manchas ya que esto pudiera alertar sobre una respuesta falsa negativa, de manera que con base en estas observaciones es posible sugerir que se prueben concentraciones adicionales o bien, modificar la forma de la exposición, para confirmar o excluir la posible actividad genotóxica. Este punto es de importancia

especialmente cuando las concentraciones utilizadas están reducidas y no se encuentran incrementos claros en la frecuencia de manchas.

Una situación similar se observó con respecto a la distribución de manchas por mosca, ya que conforme la concentración aumenta, también lo hace el número de moscas que presentan manchas múltiples. En las concentraciones mayores se recobraron moscas hasta con 22 manchas cada una.

Para tener una estimación adicional de la magnitud del incremento en la frecuencia de cada tipo de mancha se obtuvo el número de múltiplos que la frecuencia inducida representa con respecto a la frecuencia basal, de esta manera puede apreciarse que aún desde concentraciones menores a las que dieron un diagnóstico significativo, los organismos expuestos muestran efecto del tratamiento y que éste se eleva gradualmente y no de forma repentina (respuesta tipo umbral), como podría sugerir el diagnóstico estadístico de la SMART. Se ha reportado que los agentes cancerígenos inducen daño que se manifiesta gradualmente. Los resultados obtenidos indican que la mezcla ambiental provoca una respuesta acorde con el potencial cancerígeno de su principal componente, el Cr[VI] (De Flora *et al.*, 1988; 1989; Cohen *et al.*, 1993; EPA 1998).

La comparación de los múltiplos de la frecuencia basal resulta útil en casos como el presente en el que el diagnóstico estadístico basado en 120 alas analizadas resulta poco informativo. A partir de los estudios de Dorantes (2000); Ramos *et al.*, (2000) y Arellano (2002), en los que se ha evaluado la aplicabilidad de la SMART para determinar la genotoxicidad de muestras ambientales se ha establecido que para efectos de monitoreo ambiental el número de alas registradas sea de 80, para favorecer el análisis de un mayor número de concentraciones. En esta propuesta se ha incluido el uso del IS como indicador de toxicidad, utilizando a moscas de tipo silvestre como testigo de línea y el análisis del tamaño de las manchas obtenidas, así como su distribución en los organismos expuestos. Así, se espera que un tratamiento será negativo cuando no existan cambios con respecto a la sobrevivencia de las moscas experimentales comparadas con las testigo y la frecuencia de manchas, su tamaño y distribución en los organismos expuestos al tratamiento sean similares a las que se presentan en las moscas testigo.

Aunque la muestra ambiental contenga determinado porcentaje de Cromo, en especial Cr [VI] y los resultados obtenidos se parezcan a trabajos previos con este en la prueba

SMART en *D. melanogaster* (Graf *et al.*, 1992; Amrani *et al.*, 1999; Hernández, 2000), la muestra ambiental es una mezcla compleja que presenta en mayor o menor cantidad los metales que se obtienen del proceso de cromado (Medeiros *et al.*, 2003) por lo que no se probó únicamente Cr[VI]; no obstante, los resultados obtenidos en las frecuencias tanto para manchas chicas, totales y sobre todo grandes parece que el Cr[VI] esta interviniendo en gran medida en la respuesta obtenida.

La presencia de malformaciones en el cuerpo de las moscas expuestas indica que además del daño encontrado en este trabajo (células somáticas), así como por Ledezma en 2006 (efecto clastógeno en células germinales), la muestra ambiental tiene actividad teratogénica. Cabe señalar que este tipo de eventos se recobraron en bajas concentraciones (0.00038 – 3.12 ppm), lo que implica un grave riesgo a las personas que habitan en zonas circundantes y demás organismos que están expuestos a los residuos indefinidamente, esto debido a la actividad que presenta la mezcla compleja de causar daño a diferentes blancos. Dado que no es posible evaluar esto con la prueba SMART, se sugiere analizar este evento teratogénico en pruebas posteriores.

De acuerdo con los resultados obtenidos para la frecuencia de mutación y recombinación, la distribución de tamaño de manchas, así como el número de manchas que presentan las moscas indican que el efecto adverso (genotoxicidad) que presenta la muestra ambiental es heredable (manchas grandes), gradual y acumulativo en las células de las alas de las moscas tratadas.

Finalmente el hecho de que en concentraciones bajas la muestra presente un efecto genotóxico, nos lleva a pensar en el estado actual del contenedor y a la filtración de los residuos hacia el exterior del predio, por lo que la zona cercana al predio se encuentra en un estado de alto impacto ambiental (SEMARNAT, 2007)

Conclusiones

- El tratamiento con la muestra ambiental de Cromatos de México afecta significativamente la sobrevivencia de los organismos a partir de 400 ppm. La LC_{50} se ubicó en 600 ppm.
- La exposición a la muestra ambiental incrementó significativamente y de manera gradual la frecuencia de mutación y recombinación somática.
- La actividad genotóxica del tratamiento es originada por eventos de recombinación a partir de 400 ppm.
- La máxima inducción de genotoxicidad se encontró para manchas grandes de 400 – 1000 ppm incrementando la respuesta hasta 141 veces con respecto a su frecuencia basal.
- Existe una correlación negativa entre el índice de sobrevivencia y la frecuencia de mutación
- Los efectos de los residuos implican un gran peligro para los organismos expuestos, con altas probabilidades de daño al material genético tanto en células somáticas de las alas como del cuerpo en general.

Referencias.

- Acosta I, Rodríguez X, Gutiérrez C y Moctezuma-Zarate M. G. 2004. Biosorption of Chromium (VI) from aqueous solutions onto fungal biomass, *Bioinorganic Chemistry Applications* 2: 1-7.
- Adams M. D., Celniker S.E., Holt R.A., Evans C.A., Gocayne J.D., Amanatides P.G., Scherer S.E., Li P.W., Hoskins R.A., Galle R.F., George R.A., Lewis S.E., Richards S., Ashburner M., Henderson S.N., Sutton G.G., Wortman J.R., Yandell M.D., Zhang Q., Chen L.X., Brandon R.C., Rogers Y.H.C., Blazej R.G., Champe M., Pfeiffer B.D., Wan K.H., Doyle C., Baxter E.G., Helt G., Nelson C.R., Gabor Miklos G.L., Abril J.F., Agbayani A., An H.J., Andrews-Pfannkoch C., Baldwin D., Ballew R.M., Basu A., Baxendale J., Bayraktaroglu L., Beasley E.M., Beeson K.Y., Benos P.V., Berman B.P., Bhandari D., Bolshakov S., Borkova D., Botchan M.R., Bouck J. y col. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185-2195p.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2000. Toxicological Profile for Chromium. U.S. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta, Georgia
- Alayo M, José I y Anita A. 2004. Sensibilidad al cromo: microbiopruebas con las diatomeas marinas *Isochrysis galbana* Parke y *Chaetoceros gracilis* Schütt. *Ecol. applied* 3: 54-161p
- Albert L. 1997. Toxicología Ambiental. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. México. 453p
- Alexander J. 1993. Toxicity versus essentiality of chromium. *Scandinavian Journal Working Environmental Health Suppl.* 1:126-127p.
- Amorós G. M. 2006. Estudio de mutantes del cromosoma III de *Drosophila melanogaster*: el gen ash-2 como regulador de diferenciación celular. Tesis de Doctorado. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. España. 165p.
- Amrani S, Rizky M, Creus A y Marcos R. 1999. Genotoxic activity of different chromium compounds in larval cell of *Drosophila melanogaster*, as measured in the wing spot test. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 34:47 – 51p.
- Arellano A. R. O. 2002. *Drosophila* como modelo in vivo para evaluar el potencial genotóxico de muestras ambientales. Los Azufres, Mich. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 51p.
- Armienta – Hernández M. y Rodríguez C. 1995. Environmental exposure to chromium compounds in the valley of León, México, *Environ. Health Persp.* 103: 47 -51p.
- Baars A.J., Blijleven W.G.H., Mohn G.R., Natarajan A.T. y Breimer D.D. 1980. Preliminary studies on the ability of *drosophila* microsomal preparations to activate mutagens and carcinogens. *Mutation Research*, 72: 257—264p.
- Bate M y Martínez-Arias A. 1991. The embryonic origin of imaginal discs in *Drosophila*. *Development* 112: 755-761p.

- Bianchi V, Celotti L, Lanfranchi G, Marjone F, Marin G, Montaldil A, Sponza G, Tamino G, Vernier P, Zantedechi A y Levis A. 1983. Genetic effects of chromium compound. *Mutations Research*. 117: 279 – 300p.
- Blair S. S. 1995. Compartments and appendage development in *Drosophila*. *BioEssays* 17: 299-309p.
- Borges K. M, Boswell J. S, Liebross R. H y Wetterhahn K. E. 1991. Activation of chromium(VI) by thiols results in chromium(V) formation, chromium binding to DNA and altered DNA conformation. *Carcinogenesis* 12:551-561p.
- Borska L, Fiala Z, Smejkalova J y Tejral J. 2003. Health risk of occupational exposure in welding processes I. Genotoxic risk, *Acta Medica* 46:25-9p
- Campos J, Martínez-Pacheco M y Cervantes C. 1995. Hexavalent chromium reduction by a chromate-resistant *Bacillus* sp strain, *Antonie van Leeuwenhoek*: 68, 203-208p.
- Castro D. J. 2006. Residuos peligrosos y cultura en México, el caso de intoxicación por cromo en Tultitlán. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Antropología e Historia. México. 70pp
- Cervantes C, Campos-García J, Devars S, Gutiérrez-Corona F, Loza-Tavera H, Torres-Guzmán J. C y Moreno-Sánchez R. 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants, *FEMS Microbiology Review* 25:333-347p.
- Clark A. M. 1982. The use of larval stages of *Drosophila* screening for some naturally occurring mutagens. *Mutation Research* 2:89-97p.
- Clements J. H, Phillips M y Todd N. K. 1988 The *Drosophila* wing test: a comparison to the sensitivity of different strains, *Mutation Research*., 203:117-123p.
- Cohen M. D, Kargacin B, Klein C. B, Costa M. 1993. Mechanisms of chromium carcinogenicity and toxicity. *Review Toxicol.* 23:255-81p.
- Cohen S. M. 1993. Imaginal disc development. En "The development of *Drosophila melanogaster*" Vol. II (Ed. M. Bate y A. Martínez Arias). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 13: 747-841.
- Cotton, F.A. y Wilkinson G. 1980. *Advanced Inorganic Chemistry*, 4a Ed. Chichester, UK; John Wiley&Sons,
- Cupo, D. Y y Wetterhahn, K. E. 1985. Modification of chromium (VI)- induced DNA damage by glutathione and cytochrome P-450 in chicken embryo hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 82: 6755-6759.
- Czakó-Vér K, Recek M, Pesti M, Sipiczki M y Raspor P. 1997. Growth Characteristics and Chromium Accumulation of Wild-type and Chromium Sensitive *Schizosaccharomyces pombe* strains. *Acta Microbiol. et Immunol. Hung* 44: 64-65p.

- Deák P, Omar M. M, Saunders R. D. C, Pál M, Komonyi O, Szidonya J, Maróy P, Zhang Y, Ashburner M, Benos P, Savakis C, Siden-Kiamos I, Louis C, Bolshakov V. N, Kafatos F. C, Madueno E, Modolell J y Glover D. M. 1997. P-element insertion alleles of essential genes on the third chromosome of *Drosophila melanogaster*: correlation of physical and cytogenetic maps in chromosomal region 86E-87F. *Genetics* 147: 1697-1722p.
- Debasis B, Sidney J. S, Bernard W. D y Manashi B. 2002. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology*. 180:5-22p.
- De Flora S, Serra D, Basso C y Zancacchi P. 1988. Mechanistic aspects of chromium carcinogenicity. *Arch Toxicol Suppl*. 13:28-39p.
- De Flora S, Serra D, Camoirano A y Zancacchi P. 1989. Metabolic reduction of chromium, as related to its carcinogenic properties. *Biol Trace Elem Res*. 21:179-87p.
- Demerec. M. 1965. *Biology of Drosophila*. Hafner Publishing Co. USA, 633p.
- Díaz-Benjumea F. J y Cohen S. M. 1993. Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*. *Cell* 75: 741-752.p
- Dillon C, Peter A. L, Bonin A. M, Cholewa M, Legge G. J. F, Terrence J. C y Kimberly L. K. 1998. Permeability, Cytotoxicity, and Genotoxicity of Chromium(V) and Chromium(VI) Complexes in V79 Chinese Hamster Lung Cells. *Chem. Res. Toxicol* 11:119 -129p,
- Dorantes V. Y. A. 2000. Aplicación de *Drosophila melanogaster* como biomonitor indicador de contaminación acuática. ENEP Iztacala. UNAM.
- Duffus J. H. 1983. *Toxicología Ambiental*. Ediciones Omega S. A. España 173 p
- Fornace A. J, Seres D. S, Lechner J. F, y Harris C. C. 1981. DNA - protein cross-linking by chromium salts. *Chem. Biol. Interact*. 36: 345-354p.
- Frei H. y Wügler 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutation Research* 203: 297 – 308p.
- Frei H. y Wügler 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Research* 334: 247 – 258p.
- Fristrom D y Fristrom J. W. 1975. The mechanism of evagination of imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* 43: 1-23p.
- Galvão L. y Corey G. 1987. Cromo. Centro panamericano de ecología humana y salud, organización panamericana de la salud, Organización Mundial de la Salud. Serie de vigilancia 5, 66p.

- Gambelunghe A, Piccinini R, Ambrogi M, Villarini M, Moretti M, Marchetti C, Abbritti G y Muzi G. 2003. Primary DNA damage in chrome-plating workers. *Toxicology* 188:187-195p.
- García-Bellido A. y Merriam J. R. 1971. Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* 24: 61-87p.
- García-Bellido A, Ripoll P y Morata G. 1973. Developmental compartmentalization of the wing disc of *Drosophila*. *Nature New Biology* 245: 251- 253p.
- García-Bellido A. y J. Dapena. 1974. Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Genetics* 128: 117 – 130p.
- García M. V. 2006. Participación de inversiones múltiples en la modulación de la respuesta genotóxica de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. UNAM. México
- Gilbert S. F. 2003 *Developmental Biology*. Sinauer Associates, INC., Publishers. USA. 838p
- González-Gaitán M, Capdevila M. P y García-Bellido A. 1994. Cell proliferation patterns in the wing imaginal disc of *Drosophila*. *Mechanisms of Development* 40:183-200p.
- Graf U, Würgler F. E, Katz A. J, Frei H, Juon H, Hall C. B y Kale P. G. 1984. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis* 6:153–188p.
- Graf U y Singer D. 1989. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster* (wing spot test): effects of extracts of airborne particulate matter from fire – exposed and non fire-exposed building ventilation filters. In: Suter K. E., Gruntz U., and Schlatter Ch. (Eds) 1989. Analytical and toxicological investigations of respiratory filters and building ventilation filters exposed to combustion gases of the chemical warehouse fire in Schweirzehalle, *Chemosphere* 19: 1019 -1109p.
- Graf U., Heo O. S. y Olvera O. 1992. The genotoxicity of chromium [VI] oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is over 90% due to mitotic recombination, *Mutation Research* 266:1997 -203p.
- Gutiérrez, M. E., G. Bocco y S. Castillo. 1985. Contaminación por cromo en el norte de la Ciudad de México, un enfoque interdisciplinario. Proyecto de la dirección general de prevención y control de la contaminación. SEDUE.
- Hällström I. A, Sundvall U, Rannug R, Grafstrom y Ramel C. 1981 a. The metabolism of drugs and carcinogens in isolated subcellular fractions of *Drosophila melanogaster* activation of vinyl chloride, 2-aminoanthracene and benzo [a]pyrene as measured by mutagenic effects in *Salmonella typhimurium*. *Chem.-biol. Interactions*, 34:129—143p.

- Hällström I. y Grafstrom R. 1981 b. The metabolism of drugs and carcinogens in isolated subcellular fractions of *Drosophila melanogaster*. Enzyme induction and metabolism of benzo[a]pyrene. *Chem.-biol. Interactions* 34:145-159p.
- Hällström I, Magnusson J y Ramel C. 1982. Relation between the somatic toxicity of dimethylnitrosamine and a genetically determined variation in the level and induction of cytochrome P450 in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Research* 92:161-168p.
- Hamilton JW, Wetterhahn KE. 1986. Chromium (VI)-induced DNA damage in chick embryo liver and blood cells in vivo. *Carcinogenesis* 7:2085–2088p.
- Hartenstein V y Posakony J. W. 1989. Development of adult sensilla on the wing and notum of *Drosophila melanogaster*. *Development* 107: 389-405p.
- Hartford, W. H. 1979. Chromium compounds. In: Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology, 3rd ed., vol. 6. Grayson, M; Eckroth, O. New York: John Wiley and Sons, Inc. 82-120p.
- Hernández B. B. R. 2000. Comparación de la genotoxicidad de cuatro compuestos de cromo (VI) en células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Herrera B. J. J. H. 2005. Efecto de concentraciones bajas de talidomida en la fertilidad de moscas (*Drosophila melanogaster*) expuestas durante el desarrollo larvario. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Holmberg B, Johan H y Gunnar J. 2001. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo; Principios Generales de la Toxicología; Definiciones y Conceptos. Organización Internacional del Trabajo, O.I.T. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. España. 84p.
- Huff J y David M. M. 2001. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo; Evaluación de la Toxicidad genética. Organización Internacional del Trabajo, O.I.T. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. España. 84p.
- IARC. 1990. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 49, Chromium, Nickel and Welding, Lyon, France, International Agency for Research on Cancer 49- 214p.
- Kilbey B. J, Macdonald D.J, Auerbach C, Sobels F.H y Vogel E. W. 1981. The use of *Drosophila melanogaster* in tests for environmental mutagens. *Mutation Research* 85: 141-146p.
- Klaassen C. D y John B. W. 2005. Casarett y Doull. Fundamentos de Toxicología. McGraw – Hill Interamericana, Barcelona. 536pp
- Koçberber N y Gönül D. 2006. Chromium(VI) bioaccumulation capacities of adapted mixed cultures isolated from industrial saline wastewaters. *Bioresource Technology*, 98 :2178-2183p.
- Krishnaja A. P y Rege M. S. 1982. Induction of chromosomal aberrations in fish *Boleophthalmus dissumieri* after exposure in vivo to mitomycin C and heavy metals mercury, selenium and chromium. *Mutation Research* 102:71-82p.

- Ledezma V. P. A. 2006. Actividad genotóxica de afloramientos externos del confinamiento de residuos de cromo de "Cromatos de México" en Lechería, Edo. De México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Liebross R. H y Wetterhahn K. E. 1992. In vivo formation of chromium(V) in chick embryo liver and red blood cells. *Carcinogenesis*. 13:2113–2120p.
- Lindsley D. L y Grell E. H. 1992. Genetic Variations of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Institution of Washington Publication. USA. 471p.
- Losi M. E, Amrhein C y Frankenberger W. T. 1994. Environmental biochemistry of Chromium, *Rev Environ Contam Toxicol* 136: 91-131p.
- Luippold R. S, Mundt M. S, Kenneth A. PhD, Linda D. M. S y Birk T. 2005. Low-Level Hexavalent Chromium Exposure and Rate of Mortality Among US Chromate Production Employees. *Journal of Occupational & Environmental Medicine*. 47:381-385p.
- Medeiros M. G, Rodriguez A. S, Batoreu M. C, Laires A, Rueff J y Zhitkovich A. 2003. Elevated levels of DNA-protein crosslinks and micronuclei in peripheral lymphocytes of tannery workers exposed to trivalent chromium. *Mutagenesis* 18:19-24p.
- Mertz W. 1969. Chromium occurrence and function in biological systems. *Physiol Rev*. 49:163-239p.
- Milán M, Campuzano S y García-Bellido A. 1996a. Cell cycling and patterned cell proliferation in the wing primordium of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 93: 640-645p.
- Milán M, Campuzano S. y García-Bellido A. 1996b. Cell cycling and patterned cell proliferation in the *Drosophila* wing during metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11687-11692p.
- Milán M. y Cohen S. M. 2000a. Temporal regulation of Apterous activity during development of the *Drosophila* wing. *Development* 127: 3069-3078p
- Misra R. M y Waalkes III. 2001. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo; Toxicología Genética. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. España. 84 p.
- Neri R, Gonzalez C. A, Quiñones A. V. Daños a la salud de los Trabajadores de una fábrica de cromatos. *Salud Pública de México*. 22:135-141p.
- Ning C. J. H y Grant M. H. 2004. The cytotoxicity of chromium in osteoblasts: effects on macromolecular synthesis. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 13:47 – 52p.
- Nordberg G. 2001. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo; Productos químicos. Metales: Propiedades químicas y toxicidad. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. España. 84 p.

- Nöthinger 1970. Sucrose density separation: A method for collecting large number of *Drosophila* larvae. DIS 45:177
- O' Flaherty E. J, Kerger B. D, Hays S. M, Paustenbach D.J. 2001. A physiologically based model for the ingestion of chromium(III) and chromium(VI) by humans. Toxicol Sci. 60:196-213p.
- Ogawa T, Masauji U, Chizuko Y y Eiichi I. 1989. Influence of chromium compounds on microbial growth and nucleic acid synthesis. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 43: 254 -260
- Peña C. E, Dean E. C, Felix. A – F. 2001. Toxicología Ambiental Evaluación de riesgos y restauración ambiental. Southwest Hazardous Waste Program. The University of Arizona. USA. 204p.
- Petrilli F. L y De Flora S. 1977. Toxicity and Mutagenicity of Hexavalent Chromium on *Salmonella typhimurium*. Appl Environ Microbiol. 33: 805–809p.
- PROFEPA (Procuraduría Federal de Protección al Medio Ambiente), 1999. Caracterización del Sitio de “Cromatos de México” localizados en Tultitlán, Estado de México. Informe Final. Elaborado por Especialistas Ambientales SA de CV, para PROFEPA, México.
- Rendon O. M. I. 1980. Alteraciones cromosómicas producidas por algunas sales de cromo. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM
- Ried T, Just K, Holtgreve-Grez H, Du Manoir S, Speicher M, Schröck E, Latham C, Blegen H, Zetterberg A, Cremer T y Auer G. 1995. Comparative Genomic Hybridization of Formalin-fixed, Paraffin-embedded Breast Tumors Reveals Different Patterns of Chromosomal Gains and Losses in Fibroadenomas and Diploid and Aneuploid Carcinomas. Cancer Res. 55: 5415-5423p.
- Ramos M. P. 1994. Efectos Genotóxicos de Algunas Sales de Arsénico en *Drosophila melanogaster*. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. UNAM
- Ramos M. P, Ordaz M. G, Dorantes A, Rivas H, Campos P, Martínez M, Hernández B. 2000 *Drosophila* is a Reliable Biomonitor of Water Pollution. Biomonitors and Biomarkers as indicators of environmental change 2. (Butterworth F M, Gunatilaka A and Gonsebatt M E eds) Environmental Science Research, New York 56: 257-299p
- Rom W. 1985. Environmental and occupational medicine. Boston little, Brown and company. 799-805 p.
- Rosas P. I. A. 1984. Aspectos ecotoxicológicos del cromo en una zona industrial del Estado de México. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. UNAM
- Silbergeld. E. K. 2001. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo; Toxicología. Organización Internacional del Trabajo, O.I.T. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. España. 84 p.

- Singh J. L, Bridgewater. C y Steven R. P. 1998. Differential sensitivity of chromium-mediated DNA interstrand crosslinks and DNA-protein crosslinks to disruption by alkali and EDTA. *Toxicological Sciences* 45:72-76p.
- Schubiger M y Palka J. 1987. Changing spatial patterns of DNA replication in the developing wing of *Drosophila*. *Developmental Biology* 123:145-153p.
- Shanker A, Carlos C, Herminia L y Avudainayagam S. 2005. Chromium Toxicity in Plants *Environment International*, 31:739-753.
- Snow E. T. 1994. Effects of Chromium on DNA Replication In Vitro. *Environmental Health Perspectives* 102: 41-44
- Stackpole M. M, Wise S. S, Grlickova-Duzevik E, Munroe R. C, Thompson W. D, Thacker J, Thompson L. H, Hinz J. M y Wise J. P. 2007 Homologous recombination repair protects against particulate chromate-induced chromosome instability in chinese hamster cells. *Mutation Research* 101: 45-58p.
- Steel G. D, Torrie J. H, y Dickey D. A. 1997. Principles and Procedures of Statistics. A Biometrical Approach. McGraw – Hill, New York, 660p.
- Sugiyama M. 1991. Effects of Vitamins on Chromium(VI)- Induced Damage. *Environmental Health Perspectives* 92:63-70p.
- Tsapoakos J. J, Hampton T. H, y Wetterhahn K. E. 1983. Chromium (VI)-induced DNA lesions and chromium distribution in rat kidney, liver and lung. *Cancer Res.* 43: 5662-5667p.
- Téllez M. J, Roxs M. C, Ana M. G. 2004. Aspectos toxicológicos relacionados con la utilización del cromo en el proceso productivo de curtiembres. *Rev. Fac. Med. Univ. Nac. Colomb.* 52 :1 – 12p
- Trimbell, J. 2002. Introduction to Toxicology. CRC press, USA 215p.
- Török T, Tick G, Alvarado M y Kiss I. 1993. P-lacW insertional mutagenesis on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*: Isolation of lethals with different overgrowth phenotypes. *Genetics* 135: 71-80p.
- Trumble J. T y Jensen P. D. 2004. Ovipositional response, developmental effects and toxicity of hexavalent chromium to *Megaselia scalaris*, a terrestrial detritivore. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46: 372-376p.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1998. Toxicological Review of Hexavalent Chromium. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1998. Toxicological Review of Trivalent Chromium. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC.
- Venier P, Roberta M, Mauro Z, Erminio C, Maurizio P y Angelo G. L. 1989. Induction of SOS response in *Escherichia coli* strain PQ37 by 16 chemical compounds and human urine extracts. *Mutagenesis* 4: 51-57p

- Viti C, Pace A y Giovenetti L. 2003. Characterization of Cr(VI)-resistant bacteria isolated from Chromium-contaminated soil by tannery activity, *Current Microbiology*: 46:1-5p.
- Vogel E. 1975. Mutations in *drosophila*: some aspects of the detection of potential mutagenic agents in drosophila. *Mutation research* 29 : 241-25p.
- Vogel E y Szakmary A. 1990. Basic principles and evaluation of results of assays measuring genotoxic damage in somatic cells of *Drosophila*. *Mutation an Environment* , Part b: 149 – 158p
- Williams J. A, Paddock S. W, Vorwerk F y Carroll S. B. 1994. Organization of wing formation and induction of a wing-patterning gene at the dorsal/ventral compartment boundary. *Nature* 368: 299-305p.
- Winder. 1993. The Toxicity of lead. *Mutation Research*. USA. 285: 117 – 124p.
- Wise J. P, Stearns D. M, Wetterhahn K. E y Patierno S. R. 2002. Cell-enhanced dissolution of carcinogenic lead chromate particles: the role of individual dissolution products in clastogenesis. *Carcinogenesis* 10:2249-54p.
- W.H.O. 2000. Principles for Evaluating Health Risk to Progeny Associated with Exposure to Chemicals. World Health Organization, Geneva. 175 p
- Xie H, Amie L, Holmes, Sandra S. W, Nancy G y John P. W. 2004. Lead Chromate-Induced Chromosome Damage Requires Extracellular Dissolution to Liberate Chromium Ions but Does Not Require Particle Internalization or Intracellular Dissolution. *Chem. Res. Toxicol.* 17 :1362 -1367p.
- Zhitkovich A, Voitkun V y Costa M. 1996. Formation of the amino acid-DNA complexes by hexavalent and trivalent chromium in vitro: importance of trivalent chromium and the phosphate group. *Biochemistry* 35:7275-82p.
- Zijlstra J. A, Vogel E. W. 1988 a. Metabolic inactivation of mutagens in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research* 198:73-83p.
- Zijlstra J. A, Vogel E. W. 1988 b. Influence of inhibition of the metabolic activation on the mutagenicity of some nitrosamines, triazenes, hydrazines and seniciphylline in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res.* 202:251-67p.
- Zouboulis A. I, Kydros K. A. y Matis K. A. 1995. Removal of hexavalent Chromium anions from solutions by pyrite fines, *Wat Res*: 29:1755-1760.