



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Curva concentración - efecto para tres
biomarcadores de toxicidad y genotoxicidad en
moscas *Drosophila melanogaster* expuestas durante
el desarrollo a Mitomicina C**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ROSALBA LÓPEZ CUEVAS



**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. PATRICIA RAMOS MORALES**

2011



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.

1. Datos del alumno

López

Cuevas

Rosalba

58 49 58 41

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

09034935-3

2. Datos del tutor

Dra.

Patricia

Ramos

Morales

Dra.

Patricia

Guevara

Fefer

Dr.

Jesús Javier

Espinoza

Aguirre

M. en C.

Octavio

Villanueva

Sánchez

M. en C.

Alfonso José

Vilchis

Peluyera

3. Datos de la Tesis

Curva concentración - efecto para tres biomarcadores de toxicidad y genotoxicidad en moscas *Drosophila melanogaster* expuestas durante el desarrollo a Mitomicina C.

48 p.

2011



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ

Director General

Dirección General de Administración Escolar

Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Curva concentración-efecto para tres biomarcadores de toxicidad y genotoxicidad en moscas Drosophila melanogaster expuestas durante el desarrollo a mitomicina C.

realizado por **López Cuevas Rosalba** con número de cuenta 0-9034935-3 quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dra. Patricia Guevara Fefer

Propietario Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre

Propietario Dra. Patricia Ramos Morales
Tutora

Suplente M. en C. Octavio Villanueva Sánchez

Suplente M. en C. Alfonso José Vilchis Peluyera

Atentamente,

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, D. F., a 12 de enero de 2011

Vo. Bo.

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

MAG/czs

Agradecimientos

Al maestro y profeta Jesús por su guía y su luz.

A mi madre y colega Rosa Cuevas, por su apoyo y su ejemplo de lucha y perseverancia.

A mi padre Antonio López por su exigencia, por ayudarme a ser la mujer que soy ahora.

A mi hija Rommy, por ser el motor de mi vida.

A mis hermanos Toño, Pablo, Beto y Guadalupe por estar presentes en todo momento.

A Octavio Herrera, por su apoyo de principio a fin.

A mi maestro y amigo: Octavio Villanueva por aparecer justo a tiempo.

A la doctora Patricia Ramos, por ocuparse de la calidad, por su paciencia y comprensión.

A mis sinodales, mis profesores, a los de toda la carrera, desde la primaria, especialmente mis profesores en el laboratorio Armando Muñoz, Blanca Hernández, Adriana Muñoz y Hugo Rivas.

A la maestra Cuellar de la secundaria 17, por enseñarnos a amar la biología.

A mi amigo Jesús Godoy por su apoyo incondicional y motivación siempre presente.

A mis compañeras (os), especialmente a Yanelli Trujillo por caminar hombro a hombro conmigo.

Especialmente agradezco a todos aquellos que jamás dejaron de creer en mí y a todos los que de alguna manera participaron en una parte de este hermoso proyecto.

INDICE

RESUMEN	6
I. INTRODUCCIÓN	8
Justificación	18
Objetivo	19
Hipótesis	19
II. MATERIALES Y MÉTODOS	20
III. RESULTADOS	27
IV. DISCUSIÓN	30
V. CONCLUSIONES	38
VI. REFERENCIAS	39

RESUMEN

En la regulación de los límites de seguridad en el uso de sustancias caracterizadas como peligrosas para los seres vivos, es fundamental disponer de información suficiente que abarque un amplio rango de concentraciones, de manera que los diferentes efectos que su actividad puede provocar en los seres vivos sean reducidos tanto como sea posible. En general, la información acerca de los efectos de la exposición prolongada a bajas concentraciones de sustancias peligrosas es escasa. Aunado a esto, se asume que mientras menor sea la concentración a la que los organismos son expuestos, menor será la probabilidad de que éstos resulten afectados, sin embargo no se dispone de evidencias experimentales suficientes que soporten esta suposición.

En este trabajo se obtuvo la curva concentración - efecto para tres biomarcadores: Índice de Supervivencia (IS), Proporción Sexual (Psex) (biomarcadores de toxicidad) y Frecuencia de Mutación y Recombinación Somática (FMRS) (biomarcador de genotoxicidad). Se utilizaron larvas de *Drosophila melanogaster* trans-heterocigotas para mutaciones recesivas que afectan la morfología de los tricomas de las alas. Las larvas fueron expuestas subcrónicamente a 15 diluciones sucesivas de mitomicina C, utilizando moscas silvestres como referencia. La pérdida de heterosis en las células afectadas lleva a la formación de una mancha mutante en el contexto silvestre del ala de la mosca. Las manchas pueden ser producidas por no disyunción, mutación puntual, delección y recombinación mitótica. Los resultados mostraron que el tratamiento afectó la supervivencia de las hembras y machos de manera similar, pero la curva concentración – efecto, construida con las diversas concentraciones no fue lineal. El efecto fue similar para las moscas silvestres y las libres y portadoras de inversiones, por lo que la construcción genética de los organismos utilizados no fue un factor relevante en la supervivencia y la proporción sexual de los organismos recobrados.

Con respecto al biomarcador de genotoxicidad, la frecuencia de manchas en las moscas libres de inversiones para las concentraciones menores a 1 μM , fue similar a la de las moscas testigo: A partir de 2 μM , la frecuencia se incrementó gradualmente, con excepción de la concentración mayor en la que se recobró

una frecuencia baja y no significativa de manchas en las alas. En las moscas portadoras de inversiones, la MMC también incrementó la frecuencia de manchas, aunque en menor proporción que lo observado para las moscas libres de inversiones, lo que confirma la capacidad mutagénica y recombinogénica de la MMC.

No se logró establecer correlación entre los tres biomarcadores, sin embargo, el uso de indicadores de efecto en diferentes variables de respuesta brinda elementos que contribuyen a una evaluación más completa de la actividad de una sustancia.

I.INTRODUCCION

La dinámica de la actividad humana en la actualidad, obliga a los seres vivos a estar inmersos en una gran cantidad de **agentes tóxicos** que son potencialmente perjudiciales y de los cuales, en su mayoría, se desconoce su **toxicidad** a corto o a largo plazo; sus efectos pueden ser diversos, dependiendo del blanco afectado, como la inducción de cáncer, desórdenes neurológicos y reproductivos, entre otros. Algunos de estos compuestos se distribuyen en grandes cantidades y son peligrosos tanto para la salud humana como para el ambiente; estos presentan una amplia diversidad en cuanto a su constitución química, mecanismos de toxicidad, distribución y posibilidad de **exposición**.

El estudio de los agentes tóxicos mediante la **toxicología genética y ambiental** es importante, tanto para prevenir como para controlar la exposición.



Fig.1. El triángulo de la toxicidad define la relación entre una sustancia potencialmente tóxica y los efectos producidos por la interacción con organismos y el ambiente (Gary, 2002)

Exposición y rutas de entrada

Las sustancias tóxicas suelen presentarse en estado líquido, sólido o gaseoso y encontrarse dispersas en el *aire* o depositarse en el agua y el suelo.

Existen muchas formas en las cuales los agentes tóxicos pueden ingresar al organismo: por *inhalación*; por *absorción* ó por *ingestión*, asimismo se consideran la *vía* intramuscular, intravenosa, intraperitoneal o subcutánea (Lippman, 2000). Después de la exposición, los primeros efectos, conciernen entonces a las barreras epiteliales del tracto respiratorio, tracto gastrointestinal

o de la piel. Una vez que el agente tóxico ha ingresado al organismo, la naturaleza química (polaridad, pH), el tamaño y la forma de las moléculas, determina su habilidad para difundirse **pasivamente**. Algunas moléculas como los aminoácidos y los azúcares, requieren de proteínas acarreadoras especializadas para transportarse a través de las membranas (**transporte activo**) (Curtis, 1985). Hay varios estados de discriminación biológica y por lo tanto existen diferencias entre las concentraciones de contaminantes en el ambiente y la concentración interna de los organismos.

Cuando se encuentra en circulación general, un compuesto puede ser distribuido; en este proceso, éste puede (1) permanecer sin cambio o (2) ser biotransformado, pero también (3) ser almacenado en algún sitio donde puede o no ejercer su acción tóxica ó (4) ser excretado. Una sustancia es absorbida, distribuida y excretada por el organismo en relación con las condiciones en las que se realizó el contacto. La acumulación de un compuesto ocurre con frecuencia cuando su nivel en el organismo excede la capacidad de éste para eliminarlo o excretarlo. Si el sitio de acumulación no es el sitio de acción tóxica, el secuestro selectivo puede ser un mecanismo de protección. Si los sitios de acumulación están saturados, una cantidad del compuesto se encuentra libre; por otra parte, la acumulación selectiva limita la cantidad de contaminante que es excretado y la acumulación prolongada puede producir enfermedades que se desarrollan lentamente (Klaassen y Watkins, 2005).

Para evaluar el riesgo de la exposición a tóxicos es importante desarrollar métodos capaces de detectar de manera temprana los efectos producidos por la exposición así como para establecer qué grado de riesgo es tolerable para una población de seres vivos (Clayson, 1985).

Relación Dosis- Respuesta

Prácticamente todas las sustancias tienen el potencial de ocasionar lesiones o incluso la muerte. Para que provoque efectos tóxicos sobre un biosistema es necesario que la sustancia o sus metabolitos (**biotransformación**) alcancen, en el lugar apropiado del cuerpo y durante un tiempo adecuado una concentración suficiente. El que tenga lugar o no la respuesta tóxica dependerá

de las características químicas y físicas de la sustancia, de la vía y tipo de exposición, de la metabolización del agente por parte del sistema y de la *sensibilidad* del propio biosistema o individuo. Los orígenes de la variabilidad incluyen niveles de actividad, edad, sexo, estado de salud, o bien, aspectos inherentes a la especie como la raza, la estatura y el peso.

Por su duración, la exposición a las sustancias químicas se divide en cuatro categorías: aguda, subaguda, subcrónica y crónica. Sin embargo, el efecto no necesariamente corresponde a la exposición; por ejemplo: una sola exposición al agente tóxico (exposición aguda) puede ocasionar un efecto crónico, como es el caso de la acrilamida, de la cual se ha probado su potencial carcinógeno en roedores después de una sola administración oral (Koop, 2008). La exposición subcrónica tiene como objetivos principales establecer el nivel de mínimo efecto adverso observable (LOAEL, *lowest observed adverse effect level*), determinar el NOAEL (*no observed adverse effect level*): nivel sin efecto adverso observable, además identifica y caracteriza el órgano u órganos específicos afectados por la sustancia investigada después de su administración repetida. Las exposiciones crónicas ó repetitivas afectan la dosis, pues la retención y los efectos en los tejidos blanco son, con frecuencia, acumulativos y el margen de recuperación es menor. La dosis de interés puede estar determinada por acumulación; sin embargo, cuando el agente es rápidamente eliminado o cuando los efectos son rápida y completamente revertidos, el parámetro para determinar la dosis primaria, se modifica.

Las características de la exposición y el espectro de los efectos se enmarcan en una relación correlativa denominada habitualmente relación dosis-respuesta. Al analizar la forma de esta relación en una población, observar las inflexiones de la **curva de dosis-respuesta** resulta más realista que identificar umbrales absolutos. La saturación de las vías de biotransformación, de los puntos de unión de las proteínas o de los receptores, y la disminución de los cofactores intracelulares son algunos de los mecanismos que influyen en la aparición de inflexiones bruscas.

En la actualidad, algunos investigadores se han cuestionado si los estudios controlados de exposición ambiental tienen significado toxicológico (Resnik, 2007), ya que para los diversos factores que afectan la relación dosis

respuesta, parámetros como la **DL50** (Dosis Letal 50) y la **CL50** (Concentración Letal 50) son valores puntuales del efecto tóxico de las sustancias y no reflejan el espectro total de la toxicidad, ya que se sabe por ejemplo que algunas sustancias cuya toxicidad aguda es baja pueden, a dosis que no provocan signos evidentes de toxicidad, actuar como teratógenos (ej. talidomida) o provocar daño en la progenie de otra generación filial al alterar el material genético de las células germinales; asimismo, la exposición repetida a ciertos productos químicos por largos períodos puede afectar a las células somáticas y ser el origen de un proceso canceroso. A pesar de esta interrogante, es común que en los estudios para determinar toxicidad y actividad mutagénica se utilicen concentraciones suficientemente altas para lograr identificar y cuantificar el o los efectos producidos, pero al mismo tiempo, se carece de parámetros que permitan establecer simultáneamente el significado biológico de los efectos descritos.

Para agentes tóxicos y mutágenos de referencia de diferente naturaleza como el aluminio (Krewski et al, 2007), O₃, mitomicina C, DMN y PCBs, entre otros se describen curvas concentración – efecto que sugieren que existe una relación directa causa-efecto entre el nivel de exposición a un tóxico y la magnitud de la respuesta a éste; no obstante, es recomendable tomar en cuenta otros aspectos implicados en la relación dosis-respuesta, ya que una sustancia determinada puede tener numerosas relaciones de dosis-respuesta; por ejemplo, una sustancia que produce cáncer, lesiones hepáticas a través de la inhibición de una enzima específica, y efectos en el SNC por diversos mecanismos tendrá tres relaciones distintas de dosis- respuesta, una para cada variable (Klaassen y Watkins, 2005). Estos estudios suelen aportar una información más específica sobre los acontecimientos que conducen al efecto letal y sobre los órganos blanco y a menudo ofrecen alguna sugerencia del posible mecanismo de toxicidad. Aunque las curvas de las dosis eficaces y letales pueden discurrir prácticamente paralelas, el mecanismo de acción del fármaco no es necesariamente el mismo por el que causa los efectos letales. Esta advertencia es aplicable a cualquier par de curvas “de efecto” paralelas o a cualquier otro par de curvas de toxicidad.

Asimismo, se sabe que ciertas sustancias tóxicas como el ácido nítrico en humanos y en *Drosophila*, el arsénico trivalente, la PCBs en humanos (Selevan et al 2003, Blanck et al, 2000), el O₃ en ratones (Perelman et al, 1986; Boezen, 2005), afectan de manera diferente a hembras y machos, probablemente por el balance particular que se establece entre los genes dependiendo del tipo de cromosomas sexuales de cada individuo.

Sea cual sea la respuesta elegida para su medición, la relación entre el grado de respuesta del sistema biológico y la cantidad de sustancia tóxica administrada adopta una forma tan constante que hace que sea considerada como el concepto más importante y general de la toxicología.

Toxicidad y genotoxicidad

Cualquier aspecto, producto o variable de respuesta de un **biomonitor**, es un **biomarcador**, este último debe permitir la determinación de los efectos biológicos de los contaminantes que ingresen al organismo. Los biomarcadores de toxicidad como la **letalidad**, la **morbilidad** (Butterworth et al, 2002), la **proporción de sexos** o el índice de **sobrevivencia** se basan en la cantidad de organismos de una población que sobreviven después de ser expuestos a un agente tóxico. Estos biomarcadores caracterizan las relaciones entre la dosis y la respuesta. Los marcadores de genotoxicidad, como la **frecuencia de mutación**, se basan en eventos genéticos, para identificar a los posibles mutágenos, entender él o los mecanismos de inducción del daño genético y establecer el riesgo de la exposición a éstos.

Una vez que un agente químico se encuentra en el interior de una célula, este puede dañar directamente al ADN (agentes de acción directa), o bien ser metabolizado y algunos de sus metabolitos afectar al ADN (agente indirecto). Los compuestos que no son mutágenos ni carcinógenos por sí mismos, pero que adquieren esta capacidad por efecto del metabolismo de los organismos se conocen como **promutágenos y procarcinógenos**.

Una mutación puede comprender la sustitución de un solo par de bases, la delección o la inserción de uno a más pares de bases, o puede constituir una alteración importante de la estructura de un cromosoma. Las alteraciones

pueden alcanzar muchas funciones celulares, como es el caso cuando ocurre una no disyunción (la falla de los cromosomas al separarse).

Existen muchos procesos que permiten a la célula enfrentarse a la gran cantidad de daños que puede sufrir su ADN. Si el daño es extensivo, la célula podría ser eliminada (por **apoptosis** o por **necrosis**), o bien, inducir mecanismos de reparación.

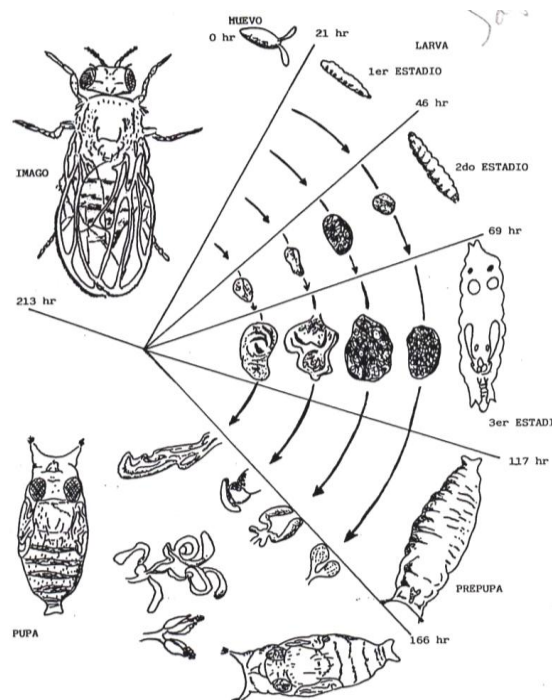
Los elementos básicos de la mayoría de los procesos reparadores son el reconocimiento del daño, su eliminación, la síntesis reparadora y la unión. Algunos de los tipos de mutación más comunes surgen durante la replicación, cuando la DNA polimerasa inserta un nucleótido incorrecto, la enzima controla su propia síntesis realizando una corrección de pruebas, detectando el 99 % de los errores, cuando se inserta un nucleótido incorrecto durante la polimerización y la enzima lo detecta, se frena la síntesis, digiere parcialmente la hebra hija que se estaba sintetizando eliminando la base errónea y reinicia la síntesis de la hebra hija. Después de síntesis, además de la reparación por escisión se han reportado otras alternativas de reparación. La reparación post-replicativa ocurre cuando la doble hebra de ADN presenta lesiones. Cuando se replica un ADN que contiene una lesión de cualquier tipo (como un dímero de pirimidina), la DNA polimerasa puede detenerse en la lesión y saltar por encima de ella, dejando un hueco en la cadena recién sintetizada. Para corregir el hueco, la proteína *RecA* dirige un intercambio por recombinación con la región correspondiente de la cadena progenitora con la misma polaridad no dañada (la cadena [[donante]]). Cuando el segmento de ADN no dañado reemplaza el segmento dañado, se origina un hueco en la cadena donante. Este hueco puede rellenarse mediante síntesis reparativa al continuar la replicación. Puesto que en este tipo de reparación del ADN se produce un suceso de *recombinación*, la reparación post-replicativa también se denomina reparación por recombinación homóloga (Klug, 2006).

Pruebas de genotoxicidad, bioensayos

Para llegar al conocimiento de los efectos de las sustancias tóxicas en los organismos se hace uso de los **bioensayos**, estos se basan en organismos cuya respuesta podría ser similar a la que se presentaría en el hombre bajo

condiciones parecidas de exposición y deben ser evaluados con base en su capacidad de respuesta. Solo aquellos que resulten sensibles y capaces de discriminar entre los diferentes tipos de daño, son aceptados y puestos en práctica. Determinados organismos se prestan a la inducción de mutaciones, que pueden detectarse y estudiarse con facilidad. Estos modelos incluyen los virus, las bacterias, los hongos, las moscas de la fruta y los ratones (Klug, 2006).

Fig. 2.- Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (Modificado de Becker, 1985, Ramos et al, 1993).



Drosophila como bioensayo

- Su mantenimiento en laboratorio es económico y requiere de espacio reducido.
- Los efectos pueden ser observados en varias generaciones en un corto período de tiempo ya que su ciclo de vida es relativamente corto (10 días), pero suficientemente largo para posibilitar el empleo de dosis agudas, sub-crónicas y crónicas.
- Permite el rápido análisis de gran tamaño de muestra (numerosa progenie).
- Tiene un amplio espectro de actividades metabólicas.
- Se pueden detectar compuestos que actúan como promutágenos y/o procarcinógenos debido a que posee un complejo microsómico denominado P-450, cuya acción es muy similar a la que presenta el complejo enzimático S9 del hígado de los mamíferos.
- Es un modelo bien establecido para el estudio de enfermedades humanas dado que se conoce su genética y su biología del desarrollo mucho mejor que la de cualquier otro organismo. Sorprendente nivel de conservación de su genoma.

(Botas, 2007).

Para la valoración del riesgo genotóxico, es indispensable la validación de los bioensayos y de las perspectivas que presentan los protocolos en desarrollo; para esto, así como para el estudio de mecanismos, es común recurrir al uso de genotóxicos de referencia, mutágenos o carcinógenos cuyos efectos son conocidos. La Mitomicina C es un antibiótico derivado de la bacteria *Streptomyces caespitosus*. Es un agente promutágeno transformado por las enzimas del metabolismo intermedio como cP450 en una reacción monooxidasa que inserta O₂ utilizando como sustrato a la MMC. Una vez activada, sus metabolitos pueden formar grandes aductos de desoxiguanosina ya sea intercadena o intracadena con el ADN estableciendo enlaces de tipo covalente que resultan en roturas mono o bicatenarias y llevan al desemparejo o pérdida de bases. Actúa como agente alquilante bifuncional ó trifuncional del ADN, evita la síntesis del mismo.

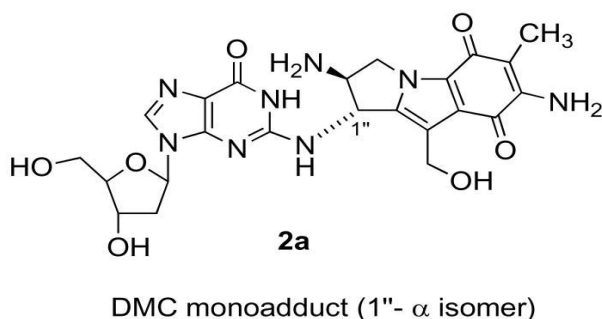


Fig.3. La Mitomicina C puede formar aductos no tóxicos como la **diaminomitosisina (2,7-DAM)**; por otra parte la **10-decarbomilmitomicina (2; DMC)** o la **2,7-diaminomitosisina (3; 2,7-DAM)** generan citotoxicidad. Estos aductos fueron cartografiados en células tumorales de ratones EMT6 (Tomado de Paz et al, 2008)

Al mismo tiempo en cada experimento se necesita de testigos negativos contra los cuales se compara el efecto provocado por el tóxico en cuestión. Para los testigos negativos se utilizan sustancias que se suponen inocuas, como los disolventes o los vehículos en los que se administra a los genotóxicos y cuyo fin es someter a los organismos a la misma manipulación a la que se somete a los grupos expuestos.

Los testigos se emplean tanto para conocer la frecuencia basal o espontánea de la alteración que se pretende analizar, como para la evaluación de la sensibilidad y especificidad que presenta el sistema. Las pruebas de toxicidad

no están concebidas para demostrar si una sustancia es segura, sino para identificar los efectos tóxicos que pueda provocar (Klaassen y Watkins, 2005). En 1974, se desarrolló una metodología para la detección de actividad mutagénica y recombinogénica de posibles genotóxicos, conocida como SMART por sus siglas en inglés (Somatic Mutation and Recombination Test) (PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACION SOMATICA), para la cual se utilizan larvas trans-heterocigotas de *Drosophila melanogaster* para mutaciones recesivas que modifican el fenotipo de los tricomas de las alas. Las larvas son expuestas a compuestos con probable actividad genotóxica. Las mutaciones inducidas son detectadas como manchas mutantes en el contexto silvestre de las alas de los adultos sobrevivientes. Por el fenotipo que muestran, las manchas mutantes sugieren el tipo de evento que podría haberlas originado (Figs. 5, 9).

La formación de clones en células somáticas de *Drosophila* puede deberse a mutación, deleción o recombinación, las estructuras que se emplean en la detección de este tipo de daño son los discos imagales (Fig. 4), los cuales se presentan en la larva como pequeños sacos y más adelante las células imagales de estos sacos formarán prácticamente todas las estructuras externas del adulto y también parte de las estructuras internas (Wilkinns, 1985), las células de los discos imagales se diferenciarán hasta que el organismo llegue a la etapa de metamorfosis, si durante este proceso ocurre una alteración heredable en cualquiera de las células imagales, ésta dará origen a una estirpe celular con la misma característica alterada originando así un *clon* que será observado como una mancha si se emplean los marcadores fenotípicos adecuados.

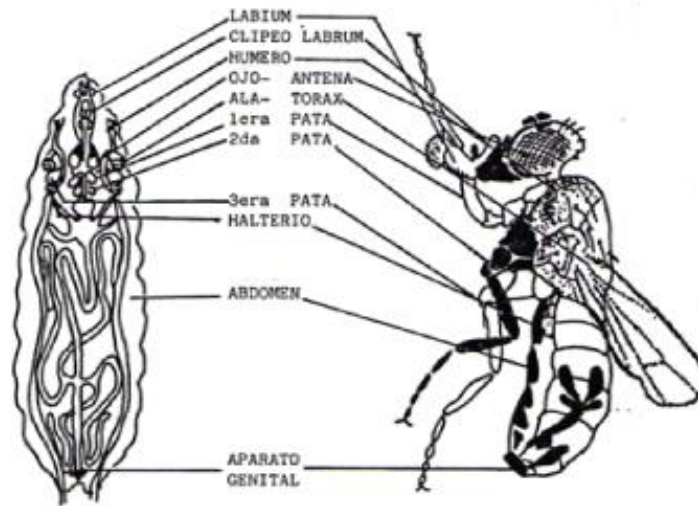


Fig. 4.- Discos imagales y su correspondencia con las estructuras a que van a dar origen en el adulto o imago (tomado de Wilkins, 1985)

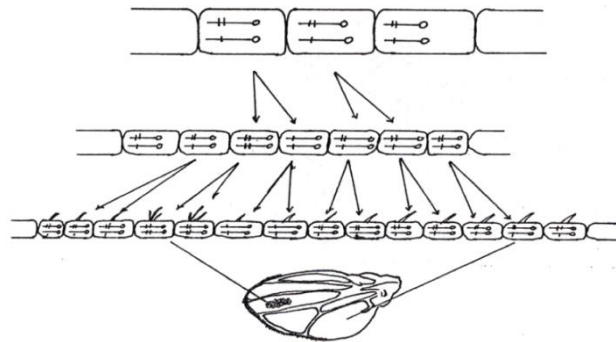


Fig.5.- Formación de clones (Modificado de Graf et al,1984).

JUSTIFICACIÓN

El uso y producción antropogénica de sustancias, se respalda en estudios previos de toxicología. Con frecuencia, la aplicación o restricción en el uso de sustancias se basa en los estudios realizados en diversos bioensayos y en los que se utilizan concentraciones o niveles de exposición que garantizan que el efecto de la exposición sea registrable. Sin embargo se dispone de poca información acerca del efecto de exposiciones prolongadas a concentraciones sumamente bajas de genotóxicos y de la posible relación entre diferentes marcadores o variables de respuesta registradas. El conocimiento de la forma en la que los valores característicos de diversos marcadores se modifican en función de la intensidad de la exposición a tóxicos y genotóxicos es relevante porque contribuirá a la comprensión de cuáles son las primeras señales de alerta de los organismos expuestos a condiciones ambientales peligrosas. El uso de genotóxicos conocidos como el antibiótico promutágeno MMC (Mitomicina C) que se utiliza principalmente como antineoplásico, facilita el seguimiento de varias variables de respuesta con respecto a la concentración utilizada, además de que profundiza en la caracterización de la actividad genotóxica de este compuesto a bajas concentraciones.

OBJETIVOS

Objetivo general

- ◆ Obtener la curva concentración-efecto para 3 biomarcadores en moscas *Drosophila melanogaster* expuestas a MMC.

Objetivos específicos

- ◆ Obtener la curva concentración-efecto para el Índice de sobrevivencia (IS) de moscas *Drosophila melanogaster* expuestas a mitomicina C (MMC).
- ◆ Elaborar la curva concentración-efecto para determinar la Proporción de sexos (P_{Sex}) de las moscas expuestas a MMC.
- ◆ Obtener la curva concentración-efecto para genotoxicidad a partir de la Frecuencia de mutación y recombinación somática (FMRS) de las moscas expuestas a MMC.
- ◆ Determinar si existe correlación entre los biomarcadores: Índice de Sobrevivencia, Proporción de sexos y Frecuencia de mutación y recombinación somática.

HIPÓTESIS

Cuando la concentración de MMC sea más alta, el Índice de sobrevivencia tendrá un valor menor y se inducirá mutación y recombinación somática igual en ambos sexos.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Agentes químicos: **Mitomicina C (MMC).**

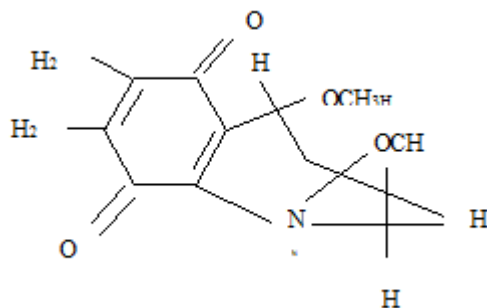


Fig.6. Estructura química de la Mitomicina C. Fórmula química $C_{15}H_{18}N_4O_5$ [1 a S- (a α , 8 β , 8a α , 8b α)] - 6 - amino - 8 - [[(aminocarbonilo) oxy] metil] -1, 1 α , 2, 8, 8 α , 8b-hexahidro- 8 α - metoxi- 5- metilazirino [2', 3': 3,4] pirrolo [1, 2-a] - indole-4, 7-dione, Ameticina, MMC, Mutamicina. (Gallipead et al, 1989)

Concentraciones:

Mediante diluciones sucesivas, se prepararon 15 concentraciones de MMC, desde 135.50 hasta 0.0083 μ M. Se colocaron 5 ml de cada concentración en 1 tubo homeopático con 1 gr. de medio para moscas (Carolina Biological Supply), Para cada línea de moscas y para cada concentración se realizaron 2 series experimentales. Como disolvente y testigo negativo concurrente para cada serie, se utilizó agua destilada para hidratar el medio para moscas.

Descripción de los marcadores de *Drosophila melanogaster*.

mwh.- “multiple wing hairs”. Se localiza en el cromosoma 3 a 0.0 um. Fenotipo.- Afecta a los tricomas (pelos) de todo el cuerpo. Es un gen recesivo que en homocigosis codifica para la producción de más de un pelo por célula de las alas, en contraste con un solo pelo en las células de tipo silvestre.

e.- ebony. Localización. 3-70.7. Cuerpo de varios colores ligeramente más oscuros que el tipo silvestre. En la etapa larvaria presentan color oscuro en la vaina del espiráculo. Viabilidad menor al 80% en el tipo silvestre.

***flr*: flare**. Se encuentra en el cromosoma 3 a 38.8 u.m. Alelos: Tres alelos: flr^1 , flr^2 y flr^3 .

flr^3 : Se distingue fenotípicamente por la presencia de tricomas de forma irregular. En condición homociga es letal, pero cuando ocurre esta situación en algunas células del organismo sí se expresa. Para el mantenimiento de esta línea se requiere de la presencia de un cromosoma balanceador.

TM3, Ser.- Cromosoma balanceador, presenta múltiples inversiones que abarca una gran parte del cromosoma 3, porta el marcador “Serrata” (Ser), que por ser dominante permite reconocer a los individuos que portan la inversión, con alas con bordes discontinuos. El marcador “Serrata” es una mutación letal en condición homocigótica, por lo que solo se recobran en cada generación individuos heterocigóticos tanto para flr^3 como para “Serrata”.

(Lindsley, 1992).

Cruzas para la prueba:

Hembras: $fIr^3/TM3, BdSer$ Machos: $mwh, e/mwh, e$

machos/hembras	fIr^3	$TM3, BdSer$ (cromosoma balanceador)
fIr^3	fIr^3/fIr^3 <u>letal</u>	$fIr^3/TM3, BdSer$ Serrata
$TM3, BdSer$	$fIr^3/TM3, BdSer$ Serrata	$TM3, BdSer/TM3, BdSer$ <u>letal</u>

Fig.7. Letales balanceados empleados para la cruce (Graf et al., 1984).

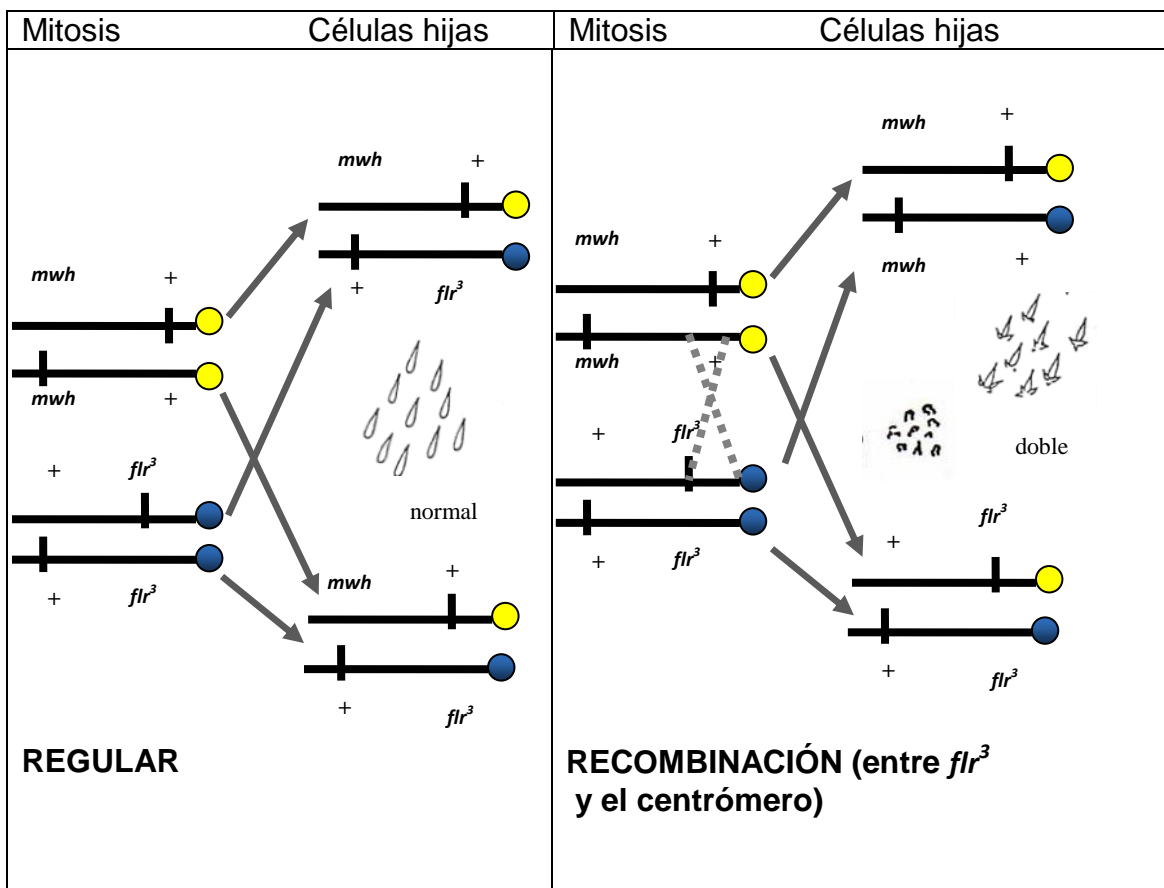
machos/hembras	$+/fIr^3$	$+/TM3, BdSer$ Serrata
$mwh, e/+$	$mwh, e/fIr^3$	$mwh, e/TM3 Ser$ serrata
$mwh, e/+$	$mwh, e/fIr^3$	$mwh, e/TM3 Ser$ serrata

Fig. 8. Cruza estándar modificada para detectar eventos de mutación somática y recombinación mitótica (SMART): Se obtiene el 50% de progenie libre de inversiones y 50% de progenie portadora (Serrata) (Muñoz, 1997).

Eventos genéticos que detecta la prueba SMART

Durante el proceso mitótico que ocurre en las células de los discos imagales en la etapa larvaria de las moscas, se duplica el material genético y las células hijas presentarán información para producir un fenotipo regular en los tricomas de las alas. Al ocurrir recombinación mitótica, ya sea como consecuencia de un proceso de reparación inducido o como evento espontáneo, se da un

entrecruzamiento entre $f1r^3$ y el centr6mero que da lugar a manchas gemelas. Si el intercambio ocurre entre mwh y $f1r^3$ dar1 lugar a manchas simples. Las manchas simples tambi6n se originan por otro tipo de eventos como deleción, mutaci6n puntual o no disyunci6n. Por carecer de homol6gía, la recombinaci6n mit6tica no se lleva a cabo en las larvas portadoras de inversiones m1ltiples (TM3, Ser); as1, al comparar la frecuencia de manchas simples entre moscas libres y portadoras de inversiones, es posible estimar la contribuci6n de la recombinaci6n a la frecuencia de manchas obtenida.



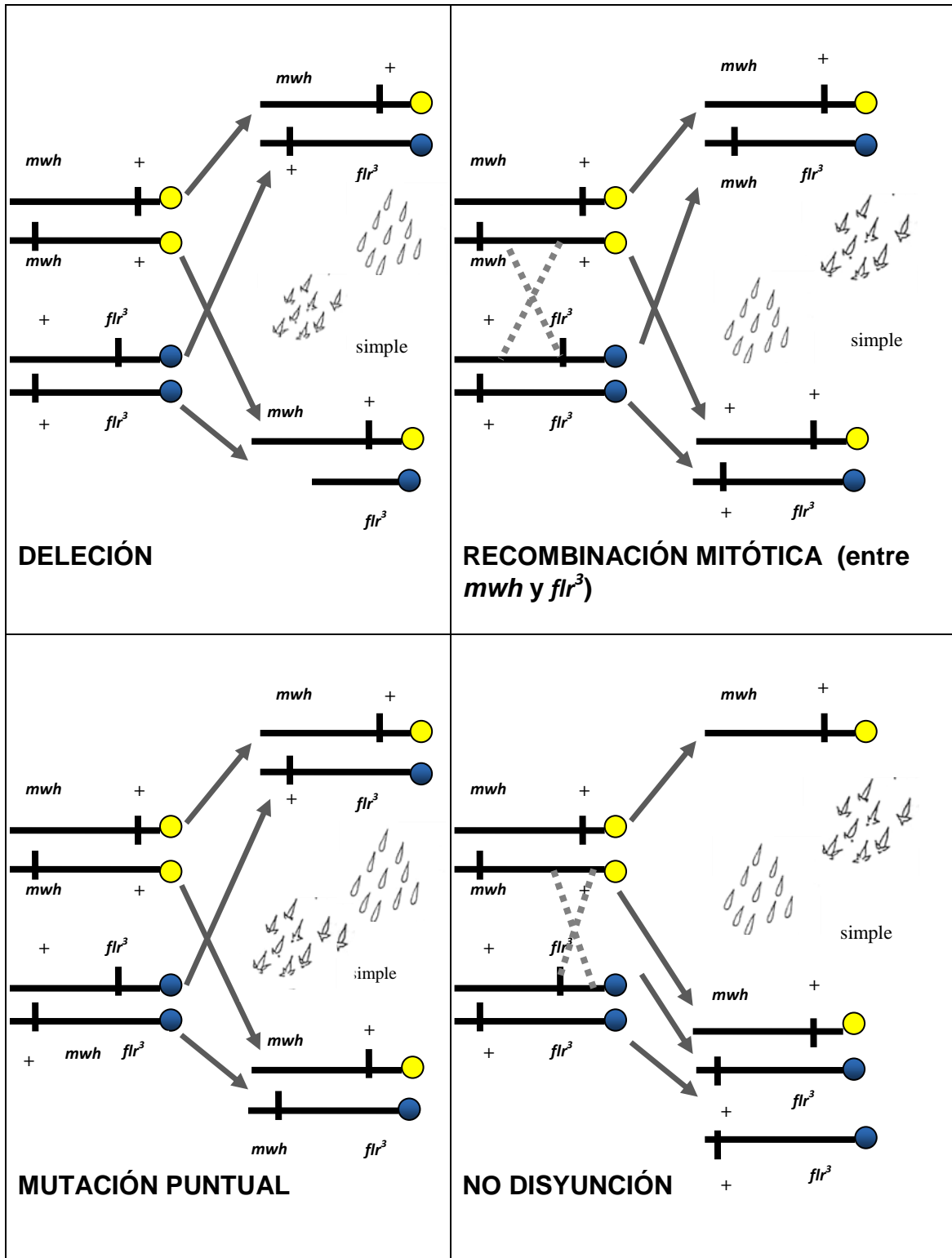


Fig. 9. Eventos genéticos inducidos en la prueba SMART (Modificado de Graf et al, 1984).

Cruza progenitora y obtención de larvas

Se seleccionaron hembras vírgenes *fir³/ TM3, Ser* y se cruzaron con machos *mwh +/e (ebony)*. Tres días después, los progenitores se colocaron en medio fresco por un período de 8 h para recobrar huevecillos. A las 72 horas de la sincronización se obtuvieron las larvas de tercer estadio.

Para la obtención de larvas de la línea silvestre (la cual se utilizó como referencia para evaluar la toxicidad) se realizó la cruce entre hembras vírgenes y machos de tipo silvestre (Canton-s) sincronizando de la misma manera.

Procedimiento:

Para extraer a las larvas del medio de cultivo se utilizó el procedimiento de Nothiger (1970). Este método se basa en la formación de un gradiente de densidad con sacarosa. Las larvas se vertieron en un embudo de separación con diámetro de 3-4 mm, sostenido en un soporte universal. Por ser menos pesadas, las larvas flotan y después de dos enjuagues se reciben en una malla de nylon y con una espátula se colocan grupos de 100 larvas aproximadamente en los tubos homeopáticos para su tratamiento. Se permitió que continuaran su desarrollo hasta la etapa adulta. Se realizó el conteo de machos y hembras adultos recuperados y se fijaron en alcohol al 70%.

Análisis de resultados

Se registró el fenotipo y número de moscas hembras y machos que se recobraron en las series experimentales y en la serie testigo. Para obtener el Índice de Supervivencia se comparó la relación de moscas del lote experimental con respecto a las moscas testigo según la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de Supervivencia (IS)} = \frac{\text{Moscas en la concentración}}{\text{Moscas en el lote testigo}}$$

Para obtener el Índice de Supervivencia (IS) se dividió el número de individuos recobrados en la concentración entre el número de individuos recobrados en el lote testigo por serie. Se calculó el Índice de Supervivencia (promedio \pm error estándar) de las dos series por cada concentración, para la Psex se realizó el mismo cálculo, referido para machos.

$$\text{Proporción sexual (Psex)} = \frac{\text{Machos en la concentración}}{\text{Total de individuos x conc.}}$$

Elaboración de laminillas

Para cada concentración, se elaboraron laminillas con las alas de 20 hembras y 20 machos, tanto provenientes de moscas de la línea estándar libres de inversión, como portadoras de inversiones (que se distinguen por el borde de las alas, tipo *Notch*). Las alas se montaron en portaobjetos, utilizando solución Fauré. Se analizó el fenotipo de las alas de las moscas y se registró el tipo y número de manchas por ala.

Análisis estadístico

Para determinar la diferencia en el IS de las series experimentales y testigo se realizó un ANOVA con un $\alpha = 0.5$. La frecuencia de manchas en las alas de moscas de la línea Estándar en los lotes experimentales y testigo (progenie libre y portadora de inversiones) se comparó con el programa SMART basado en X^2 , también con un $\alpha = 0.5$. Un compuesto se considera mutagénico si duplica la frecuencia de manchas totales ($m = 2$). El resultado puede analizarse también por el tipo de mancha. Para manchas pequeñas (1 a 2 células), la frecuencia del testigo debe ser duplicada ($m = 2$); para manchas grandes y gemelas (que tienen una frecuencia espontánea muy baja), la frecuencia basal debe ser quintuplicada ($m = 5$), para evitar diagnósticos falsos (Frei y Würgler, 1992).

III.RESULTADOS

Índice de Supervivencia (IS).

Mediante el ANOVA se determinó que no existen diferencias significativas entre las medias muestrales para el IS entre los tres grupos de moscas: silvestres, libres y portadoras de inversiones, con un nivel de confianza de 95%. En todos los casos, el número de moscas del lote testigo correspondiente se tomó como referencia de la supervivencia obtenida en los lotes experimentales.

La curva de supervivencia – concentración de MMC no mostró linealidad (Tabla I). La concentración más alta resultó tóxica y provocó la pérdida de más del 90 % de las moscas recobradas en el lote testigo. Se recobraron valores de supervivencia de 70% o menos que la del testigo, pero no de manera proporcional (0.0166, 0.5312, 1.06, 8.5, 68 y 135.5 μM de MMC), sin embargo, el análisis no confirmó diferencias significativas entre los lotes experimentales y el testigo.

Para las moscas de la cruce estándar, el tratamiento produjo una respuesta similar y no lineal. La concentración más alta también resultó claramente tóxica para las moscas libres de inversiones, pero en estas moscas sólo a partir de 34 μM de MMC se obtuvieron valores de supervivencia de 70 % o menores.

En las moscas portadoras de inversiones múltiples (Balanceador TM3, Ser), la curva obtenida tampoco fue lineal y nuevamente en algunas concentraciones se recobró menos del 70% de supervivencia con respecto al lote testigo (0.0332, 1.0624 y a partir de 17 μM de MMC). De las tres curvas de supervivencia obtenidas, la correspondiente a las moscas portadoras de inversiones mostró mayor variación (Fig. 11). Los valores de supervivencia del grupo de moscas con inversiones fueron menores a los de los otros dos grupos.

En general, a medida que las moscas fueron expuestas a concentraciones mayores, la variación determinada por el error estándar fue menor (Tabla I).

Proporción sexual (Psex)

Los valores experimentales se encuentran cercanos al testigo, se observan valores ligeramente mayores en 1.06 μM y 34 μM para moscas libres de inversiones y un valor menor en 0.0083 μM en las moscas portadoras (Tabla I) aunque en ninguno de los casos las diferencias fueron significativas ni entre concentración ni entre tipo de mosca (Fig. 12).

Frecuencia de mutación y recombinación somática (FMRS)

a) Frecuencia de manchas

En las moscas libres de inversiones se indujeron manchas a partir de la concentración 0.26 μM y desde 2.12 μM en las moscas portadoras. Sólo se presentan dos eventos para manchas gemelas en las moscas libres de inversiones en 17 μM y 135.5 μM (Tabla II). En concentraciones menores a 0.26 μM , la frecuencia total de manchas es más baja respecto al lote testigo para los dos grupos de moscas; pero los valores más altos en general los presentaron las moscas libres de inversiones. En concentraciones mayores a 2.12 μM , la respuesta se disparó (Fig.13).

b) Frecuencia de células por mancha (tamaño de la mancha).

Para los dos tipos de progenie los lotes testigo están representados por manchas chicas (1-2 células). Hay más manchas chicas que grandes (>2 células) en general. No se observa una relación lineal entre la frecuencia y la concentración. La respuesta se incrementó en las concentraciones mayores a 4.25 μM . A medida que aumenta el tamaño de la mancha, disminuye la frecuencia. Hay una distribución más uniforme entre el tamaño de la mancha en los experimentales desde 2.12 μM ., aunque predominan las manchas grandes (Figs. 14-15).

c) Frecuencia de manchas por mosca.

En los dos tipos de progenie, las moscas del lote testigo tienen por pocas manchas en sus alas (< 5). En concentraciones menores a $1.06 \mu\text{M}$ predominan pocas manchas (< 7) a excepción de la concentración $0.53 \mu\text{M}$ en la que ambos tipos de progenie muestran individuos con muchas manchas (>37). En concentraciones mayores a $2.12 \mu\text{M}$, el número de manchas está más distribuido entre las concentraciones y casi todas las categorías están representadas en ambos tipos de progenie, aunque esta respuesta se refleja más en las moscas portadoras de inversiones (Figs.16-17)

IV. DISCUSIÓN

El medio ambiente es un sistema complejo, en el cual influyen factores bióticos y abióticos, espaciales y temporales (Wu et al, 2008; Cannone, 2008), además de los sociales, políticos, culturales y económicos (López, 2006), sin embargo; es evidente la forma en que el ser humano ha contribuido en su desequilibrio, debido, entre otras cosas, al uso indiscriminado de sustancias tóxicas; arriesgando el entorno y su existencia misma como especie. Paradójicamente, los diversos estudios, comúnmente no se llevan a cabo de forma interdisciplinaria, debiendo considerar al ser humano y a cada organismo como parte de un entorno y al individuo mismo como otro sistema complejo.

Índice de sobrevivencia

La exposición en un ambiente natural obliga a los organismos a adaptarse para poder sobrevivir (presión selectiva), de esta manera se modifica su ADN y por lo tanto surgen alelos que les confieren diferentes capacidades en la respuesta a estímulos externos, como ejemplo de ello el gen CYP1A2, que modifica en ciertos grupos étnicos etíopes la capacidad para metabolizar algunas drogas, compuestos endógenos y procarcinógenos por la producción de cierto tipo de enzimas (Browning et al, 2010).

Para establecer el impacto de factores ambientales en el material hereditario de los organismos es conveniente recurrir a los organismos silvestres para establecer un marco de referencia ya que no muestran la expresión de genes recesivos deletéreos que pudieran afectar la respuesta de genotoxicidad. Las moscas de tipo silvestre se utilizaron para determinar si la respuesta observada posterior al tratamiento; es decir el daño inducido por la MMC no es atribuible a la presencia de los marcadores en las moscas de tipo estándar (objeto de este estudio), debido precisamente a que los alelos *mwh*, *flr3* y el balanceador TM3, Ser pudieran atribuir a las moscas una capacidad de respuesta diferente respecto de los genes silvestres para los biomarcadores aquí analizados (Greenspan, 2001). Al no encontrar diferencias significativas para el Índice de sobrevivencia, esto se pudo corroborar y de esta manera construir la curva para biomarcadores de genotoxicidad. El Índice de sobrevivencia es un buen

biomarcador de toxicidad pues muestra la respuesta integral del individuo ante la exposición a genotóxicos, independientemente del blanco particular que pudiera resultar afectado.

Las moscas fueron expuestas subcrónicamente por alimentación, la respuesta a la concentración interna de MMC se analizó tanto de forma poblacional como interindividual (variación). Al administrar desde concentraciones letales hasta concentraciones inocuas fue posible caracterizar la curva de una manera más amplia. Se observó una respuesta característica para cada concentración, a nivel poblacional para los tres grupos de moscas y a nivel interindividual, considerando que cada organismo metaboliza al agente tóxico de forma particular (Boice, 2003), por ello es importante tomar en cuenta no solo la respuesta a nivel grupal. La respuesta tóxica registrada a bajas concentraciones podría explicarse si el estímulo no resulta suficiente para inducir la respuesta de desintoxicación del organismo (Klaassen y Watkins, 2005). En contraste, concentraciones mayores desencadenan esta respuesta generando además un estado de “alerta” en los organismos expuestos. En las concentraciones altas se recuperaron incluso más individuos que en los grupos testigo; esto bien pudiera deberse a que se disparó la respuesta de protección, donde se activan enzimas como las monooxidasas del citocromo P450 (Feyereisen, 1999).

Así, al eliminarse radicales libres disminuye la respuesta tóxica; sin embargo, si se acumula la sustancia, puede ocurrir un daño ulterior en las células somáticas o germinales. Recientemente se observó que ratas gestantes que fueron expuestas a sulfonato perfluorooctano (PFOS), no resultaron aparentemente afectadas, sin embargo la progenie presentó alteraciones en el gen GSTP (Wan, 2010). En humanos se reportan casos para diversas sustancias que causan procesos cancerosos a largo plazo (Forand, 2004); para analizar tal efecto tendría que extenderse este estudio hacia otros biomarcadores.

Las concentraciones más altas resultaron tóxicas, es decir, la proporción de organismos recobrados fue mínima en comparación con los grupos testigo, esta respuesta indica que el daño provocado por la mitomicina C rebasó los mecanismos de desintoxicación (Klaassen y Watkins, 2005).

La variación, determinada por el error estándar muestra la respuesta a nivel poblacional que resultó diferente entre los tres grupos de moscas. La variación mayor para las moscas portadoras de inversiones es probable que se deba a que estos individuos al presentar un cromosoma 3 con inversiones múltiples, responden de manera diferente a los estímulos, como sucede con otros organismos con un alto grado de alteraciones genéticas que son más susceptibles al daño, ya que los balanceadores son cromosomas modificados, producto de rompimientos y re-ensambles (Greenspan, 2001).

Las moscas de tipo silvestre presentaron los valores de variación menores entre los tres grupos, esta respuesta puede atribuirse a una mayor estabilidad debido al menor número de alteraciones que presentan estos organismos respecto de las moscas de tipo estándar.

La variación también nos habla de la respuesta interindividual: en las concentraciones más altas se recuperó solo una pequeña fracción de la población en comparación con los lotes testigo en los tres grupos de moscas, la respuesta interindividual fue más homogénea, en este caso, se confirma que la variación como un estimador adicional es útil, ya que para las concentraciones tóxicas, se espera que sobrevivan solo los organismos con metabolismos parecidos capaces de soportar concentraciones sumamente altas de mitomicina C y por lo tanto la respuesta sea más homogénea, comúnmente estos organismos presentan un metabolismo con mayor capacidad de desintoxicación y reparación celular (Klaassen y Watkins, 2005).

Existen puntos en la curva donde convergen dos o tres de los grupos de moscas, concentraciones a las cuales estos responden de una manera similar; pareciera que el estímulo en estos casos, resultara ser un factor más relevante para la respuesta que la diferente construcción genética de estos organismos, aunque esta respuesta pudiera deberse solo al azar, sin embargo, es conveniente explorar este tipo de respuestas para caracterizarlas.

Proporción de sexos (Psex)

La proporción de sexos, es un biomarcador de toxicidad, que indica si un agente tóxico afecta de manera diferente a hembras y machos, esto es posible que suceda debido al balance particular que se establece entre los genes dependiendo del par de cromosomas sexuales de cada individuo (Klug, 2006) y se ha reportado para algunas sustancias tóxicas como el ácido nítrico y el arsénico (Selevan et al, 2003; Blanck et al, 2000); sin embargo, no se han reportado casos donde la MMC afecte de manera diferente a hembras o machos en *Drosophila melanogaster*. En concentraciones altas de MMC la proporción de machos resultó mayor, aunque se debe tomar en cuenta que para estas concentraciones sobrevivieron muy pocos individuos. En la curva se encuentran valores alejados a los lotes testigo, pero estas diferencias no son significativas y se atribuyen a la distribución natural misma de la muestra.

Frecuencia de mutación y recombinación somática (FMRS)

El utilizar un tamaño de muestra apropiado y extender el rango de concentraciones al construir una curva concentración- efecto ayuda a entender mejor la manera en que cambia la respuesta del metabolismo respecto al estímulo. Para estimar el daño que una sustancia tóxica puede ocasionar a los seres vivos, no es suficiente analizar su efecto tóxico a nivel organismo, también es importante analizar la respuesta a nivel genético, ya que en si misma se puede observar desde diferentes perspectivas, ya sea analizando las células somáticas así como el daño a las células germinales. Por ello, en este trabajo se utilizó la FMRS. Este biomarcador de genotoxicidad proporciona información acerca de los eventos genéticos por los cuales se indujo mutación y recombinación somática en las células de los discos imagales. Se analizó el daño a las células somáticas utilizando los marcadores fenotípicos *mwh* y *flr*³.

La actividad genotóxica se evaluó para los dos tipos de progenie de las moscas estándar (libres y portadoras de inversiones) y está dada por la comparación de la frecuencia de manchas entre los lotes experimentales y el testigo.

Dependiendo de la actividad genotóxica y de la eficiencia de los mecanismos de reparación del ADN para contrarrestar la actividad mutagénica inducida por la MMC, resultó el nivel de daño a las células somáticas de los discos imagales.

Frecuencia total de manchas

Se observó que la frecuencia de manchas en general es mayor para las moscas libres de inversiones, es muy probable que se deba a la reparación por recombinación somática, que se da entre el centrómero y *flr3* y entre *mwh* y *flr3*, lo que no es posible que ocurra en las moscas portadoras debido a la falta de homología, presentando el resto de los eventos genéticos inducidos como son deleción, mutación puntual y no disyunción.

Existe una frecuencia basal de mutación y recombinación somática, es decir, que aunque con la mitomicina C se indujo daño al ADN, existen eventos espontáneos de mutación somática (Klug, 2006) de esta manera observamos que se presentaron manchas en los lotes testigo.

A partir de las concentraciones donde se indujeron manchas, la MMC provocó una respuesta exponencial, gran cantidad de células fueron dañadas, este daño rebasó los mecanismos de reparación, los cuales; sin embargo, fueron activados, aunque muchas células pudieron ser eliminadas por apoptosis o necrosis, como se podría explicar por la baja frecuencia de manchas registrada en la concentración mayor para moscas libres de inversiones (Klug, 2006).

Frecuencia de células por mancha (Tamaño de la mancha)

El tamaño de la mancha está determinado por la proliferación de clones de células transformadas, (divisiones mitóticas).

En concentraciones bajas y los lotes testigo, se recuperaron manchas chicas en general y aunque se registraron algunas manchas grandes para estas concentraciones, éstas fueron más abundantes en concentraciones mayores

probablemente porque la sustancia alcanza más pronto el sitio de acción tóxica y las células afectadas, una vez reparado el daño tienen más posibilidades de dividirse, lo que incrementa el tamaño de la mancha recobrada (Taleisnik, 2006).

La respuesta resultó diferente para ambos tipos de progenie, presentando una distribución más uniforme entre las frecuencias y el tamaño de la mancha en las concentraciones mayores las moscas portadoras de inversiones, pero se deben tomar en cuenta a cuantos organismos corresponden estas distribuciones.

.

Frecuencia de manchas por mosca

El número de manchas por mosca representa el número de células que fueron dañadas y la distribución de estas entre los individuos por concentración, es decir, refleja tanto la respuesta a nivel grupal (por lote) como la respuesta interindividual (dentro del lote), de esta manera se puede observar que los individuos responden de manera diferente al estímulo, independientemente de la presencia de los marcadores, ya que se presentaron casos aislados donde las moscas presentaron una gran cantidad de manchas en concentraciones bajas de MMC.

En concentraciones bajas las moscas presentaron pocas manchas y en concentraciones mayores el número de manchas está más distribuido entre los individuos en ambos tipos de progenie, esto se debe a que la concentración de MMC provocó una respuesta genotóxica, donde más células fueron dañadas en concentraciones altas, pero hay una distribución uniforme entre los individuos, según lo describe la curva; es decir que la MMC provocó una respuesta genotóxica que cambia pero no es lineal.

Correlación entre los biomarcadores (IS, Psex y FMRS).

La respuesta para los tres biomarcadores de toxicidad y genotoxicidad, es diferente, es decir; en las concentraciones de MMC donde se produjo una respuesta tóxica, no necesariamente se indujo daño celular y la forma de la curva es muy distinta ya que para el IS ésta fluctúa de una forma muy irregular, lo que no sucede para la FMRS, que tiene una forma exponencial.

En estudios con biomarcadores de toxicidad y genotoxicidad para otras sustancias tóxicas, donde se ha trabajado con la mosca de la fruta (Inamdar, 2010; Singh, 2010; Betham, 2010), se han observado resultados diferentes en el sentido de la forma en la curva, aunque cada sustancia actúa de forma particular y los individuos responden característicamente de acuerdo a la forma de metabolizar la sustancia, pero comúnmente se utiliza un solo biomarcador y un número bajo de concentraciones o dosis.

Para medir la toxicidad a dosis sumamente bajas se ha trabajado comúnmente con radiación (Quon et al, 2011, Pignol et al, 2011).

Respuesta fenotípica generalizada

Aunque los marcadores *mwh* y *flr3* indican el daño en los tricomas de las alas, el daño es generalizado a otros tejidos, aunque para los fines de este estudio, no se contabilizaron y la presencia de otras malformaciones no puede atribuirse de manera directa al efecto del tratamiento; sin embargo, no deben pasarse por alto la presencia de estos eventos fenotípicos (Fig. 10).

Supuestos

La construcción de la curva concentración-efecto de toxicidad y genotoxicidad utilizando un amplio rango de concentraciones para diferentes biomarcadores en este trabajo es aplicable para cualquier sustancia tóxica y nos traduce la complejidad de los organismos para responder ante un daño inducido, lo cual sucede todo el tiempo en las poblaciones expuestas de manera natural. Las

ponderaciones, son posibles, debido entre otros aspectos a los complejos microsómicos P-450, que presenta *Drosophila melanogaster*, cuya acción es muy similar a la que presenta el complejo enzimático S9 del hígado de los mamíferos; es decir metabolismos de desintoxicación parecidos (Botas, 2007) es preocupante entonces, pensar que las sustancias tóxicas utilizadas de “forma segura” podrían traer consecuencias ulteriores o daños secundarios que no han sido debidamente catalogados.

Según estudios estadísticos, en los últimos 10 años, de la misma manera en que se ha incrementado el uso de sustancias químicas ya sea en cuestiones ambientales, en la industria farmacéutica, alimentaria o cosmética, ha aumentado la incidencia de enfermedades como el cáncer, específicamente el cáncer de mama en la mujer y de próstata en el hombre (INEGI), así como el número de abortos espontáneos y esterilidad en la mujer.

Los resultados de este estudio hacen evidente la importancia que tiene el uso de diferentes biomarcadores en estudios de Toxicología debido al riesgo asociado al uso de estas sustancias en la sociedad actual, no solo por la necesidad que se tiene de utilizarlas, sino por la responsabilidad que implica el mantener un equilibrio ambiental y una mejor calidad de vida para generaciones presentes y futuras.

V. CONCLUSIONES

- 1) La respuesta para el índice de sobrevivencia en relación a la concentración de MMC en los tres grupos de moscas nos indica que el efecto del tratamiento con Mitomicina C no es lineal, independientemente del tipo de mosca utilizado.
- 2) El tratamiento con MMC afectó de manera similar a ambos sexos.
- 3) La recombinación somática como resultado del intercambio de material genético en el cromosoma 3 se atribuye al efecto del tratamiento.
- 4) La frecuencia de manchas aumentó en relación exponencial a la concentración.
- 5) No se encontró correlación entre los tres biomarcadores.

VI. REFERENCIAS

- Betham, B; Shalhout, S; Márquez, VE; Bhagwat, A.S. (2009). Use of *Drosophila* deoxynucleoside kinase to study mechanism of toxicity and mutagenicity of deoxycytidine analogs in *Escherichia coli*. **DNA Repair** 49:153-60.
- Blanck, HM; Marcus, M; Tolbert, P.E; Rubin, C; Henderson, A.K; Hetzberg, V.S; Zhang, R.H; Cameron, L. (2000). Age at menarche and tanner stage in girls exposed in utero and postnatally to polybrominated biphenyl. **Epidemiology** 1:641-7.
- Boezen HM, Vonk JM, van der Zee SC, Gerritsen J, Hoek G, Brunekreef B, Schouten JP, Postma DS. (2005). Susceptibility to air pollution in elderly males and females. **The European Respiratory Journal** 25:1018-24.
- Boice, Judith (2003). Lo que no nos cuentan los médicos. AMAT. México. 224 p.p.
- Botas, Juan. (2007). *Drosophila*, researchers focus on human disease. **Nature Genetics** 39: 589-591.
- Browning SL, Tarekegn A, Bekele E, Bradman N, Thomas MG. (2010). CYP1A2 is more variable than previously thought: a genomic biography of the gene behind the human drug-metabolizing enzyme. **Pharmacogenet Genomics** 20:647-64.
- Butterworth SA, Panton ON, Klaassen DJ, Shah AM, McGregor GI. (2002), Morbidity and mortality associated with intraperitoneal chemotherapy for *Pseudomyxoma peritonei*. **American journal o surgery** 183:529-32.
- Cannone N, Diolaiuti G, Guglielmin M, Smiraglia C. (2008). Accelerating climate change impacts on alpine glacier forefield ecosystems in the European Alps. **Ecological applications** (18):637-48.
- Clayson, D. (1985). Toxicological risk assessment Vol II. General criteria and case studies. CRC PRESS. USA. 264 p.p.
- Curtis. Helena. (1985). Biología. Editorial Médica Panamericana. México. 1255 p.p.
- Feyereisen, R. (1999) Insects P450 enzymes .**Annual review of entomology** 44:507-33.
- Forand, S.P. (2004). Leukaemia incidence among workers in the shoe and boot manufacturing industry: a case-control study. **Environmental health** 30:7
- Frei y Würigler (1995) Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) en *Drosophila*. **Mutation Research** 334: 247-258.
- Gallipead, J. (1989) . 11a. Ed. An encyclopedia of chemicals, drugs and biological. Merck and Co., Inc. Rahway, New Jersey. U.S.A. 1606 p.p.

- García- Bellido, J.R. (1971). Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. **Developmental biology** 24: 61-87.
- Gary, Moore, S. (2002). Living with the earth: second edition. Concepts in Environmental Health Science. U. S. A. 596 p.p.
- Graf, U, et al. (1984). Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental mutagenesis** 6:153-188.
- Greenspan, J. R. (2001). Fly Pushing. The Theory and Practice of *Drosophila* Genetics. Second Edition. The Neurosciences Institute. San Diego, California. 25 p.p.
- Inamdar AA, Masurekar P, Bennett JW. (2010). Neurotoxicity of fungal volatile organic compounds in *Drosophila melanogaster*. **Toxicological sciences**. 117:418-26. 2010.
- INEGI. World Health Organization (2006). *Cancer Control. Knowledge into action*. www.ceprec.org/CancerMx2010.pdf
- Klaassen, D, Curtis y Watkins, John, B. (2005). Fundamentos de Toxicología. McGraww-Hill. Interamericana. México. 535 p.p.
- Klug W., Cummings M. and Spencer C. (2006). Conceptos de genética. 8ª ed. Pearson. Prentice Hall. México. 884 p.p.
- Koop; Wolfgang, D. (2008).Toxicokinetics of acrilamida in rats and humans following single oral administration of lox doses. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 2008.235:2
- Krewski D, Yokel RA, Nieboer E, Borchelt D, Cohen J, Harry J, Kacew S, Lindsay J, Mahfouz AM, Rondeau V. (2007) Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. **Journal of toxicology and environmental health** 1:1-269.
- López G.T. (2006) La reforma fiscal ecológica en la unión europea: Antecedentes, Experiencias y Propuestas. **Revista de Economía Institucional**. 15: 321-332.
- Lippman, Morton (2000). Environmental toxicants human exposures and their health effects. Wiley- Interscience. New York. 987 p.p.
- Lindsley Dan L y Zimm G, Georgianna. (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, Inc. USA. 1132 p.p.
- Muñoz Hernández, Adriana. (1997). Comparación del potencial aneuploidógeno de compuestos citostáticos en células de las alas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Paz MM, Ladwa S, Champeil E, Liu Y, Rockwell S, Boamah EK, Bargonetti J, Callahan J, Roach J, Tomasz M. (2008) Mapping DNA adducts of mitomycin C and decarbamoyl mitomycin C in cell lines using liquid chromatography/ electrospray tandem mass spectrometry. **Chemical research in toxicology** 21:2370-8.

- Perelman RH, Palta M, Kirby R, Farrell PM.(1986). Discordance between male and female deaths due to the respiratory distress syndrome. **Pediatrics** 78:238-44.
- Pignol JP, Keller BM, Ravi A. (2011). Doses to internal organs for various breast radiation techniques - implications on the risk of secondary cancers and cardiomyopathy. **Radiation oncology** 14:5
- Quon H, Cheung PC, Loblaw DA, Morton G, Pang G, Szumacher E, Danjoux C, Choo R, Thomas G, Kiss A, Mamedov A, Deabreu A. (2011).Hypofractionated Concomitant Intensity-Modulated Radiotherapy Boost for High-Risk Prostate Cancer: Late Toxicity. **International Journal of radiation oncology, biology, physics** Jan.
- Ramos Morales, P y col. (1993). Manual de laboratorio de Genética para *Drosophila melanogaster*. Mc Graww-Hill.131 p.p.
- Resnik, D B. (2007) Intentional exposure studies of environmental agents on human subjects: assessing benefits and risks. **Accountability in research** 4:35-55.
- Selevan SG, Rice DC, Hogan KA, Euling SY, Pfahles-Hutchens A, Bethel J. (2003) Blood lead concentration and delayed puberty in girls. **The new England Journal of medicina** 348:1527-36.
- Singh MP, Ram KR, Mishra M, Shrivastava M, Saxena DK, Chowdhuri DK. (2010). Effects of co-exposure of benzene, toluene and xylene to *Drosophila melanogaster*: alteration in hsp70, hsp60, hsp83, hsp26, ROS generation and oxidative stress markers. **Embryotoxicology** 79:577-87.
- Stanley, E. Manahan. (1992). Toxicological chemistry. Lewis Publishers. U.S. A. 449 p.p.
- Taleisnik, S. (2006). Receptores celulares y la transducción de señales. Temas de Biología Celular. Encuentro grupo editor. Brujas. Córdoba. 253 p.p.
- Wan YJ, Li YY, Xia W, Chen J, Lv ZQ, Zeng HC, Zhang L, Yang WJ, Chen T, Lin Y, Wei J, Xu SQ. (2010). Alterations in tumor biomarker GSTP gene methylation patterns induced by prenatal exposure to PFOS. **Toxicology**. 274:57-64.
- Wilkins, A. S. (1985). Genetic analysis of animal development. John Wiley and Sons Eds. Nueva York. USA. 1500 p.p.
- Wu RS, Chan AK, Richardson BJ, Au DW, Fang JK, Lam PK, Giesy JP. (2008). Measuring and monitoring persistent organic pollutants in the context of risk assessment. **Marine pollution bulletin** 57:236-44

Glosario

Agente tóxico.- Cualquier sustancia capaz de producir una respuesta nociva en un sistema biológico.

Apoptosis.- Proceso controlado genéticamente en el que la célula se suicida si el daño en el ADN o en los cromosomas es muy grave.

Bioensayo.- Uso de organismos cuya respuesta podría ser similar a la que se presentaría en el hombre bajo condiciones parecidas de exposición.

Biomarcador.- Cualquier aspecto, producto o variable de respuesta de un biomonitor en la que pueda ser evaluado el impacto de los contaminantes ambientales a través de un cambio detectable.

Biomonitor.- Organismo que sirve como modelo centinela.

Biotransformación.- Conversión metabólica de las sustancias químicas endógenas y xenobióticas en compuestos más hidrosolubles .

Delección.- Cuando un cromosoma se rompe en uno o más sitios y se pierde una parte del mismo, el trozo perdido se denomina *delección*. La delección puede ocurrir cerca de un extremo o en la parte interna del cromosoma. Estas se denominan delecciones terminales o intersticiales, respectivamente .

Dosis.- Cantidad de una sustancia química.

Dosis eficaz.- La que causa efecto eficaz.

Dosis efectiva.- Es la cantidad de tóxico que llega a un sitio crítico en el cuerpo y es proporcional a las concentraciones disponibles en el ambiente .

Dosis Letal.- Dosis que es necesario administrar para que mueran todos los organismos de una población dada.

Dosis umbral.- Dosis mínimamente eficaz de cualquier sustancia química que provoca una respuesta de todo o nada aún cuando no pueda ser calculada experimentalmente.

DL50, CL50.- Dosis/ concentración de una sustancia química que es necesario administrar para causar la muerte del 50% de los animales tratados.

Exposición.- Contacto entre una sustancia química y un organismo.

Mutación.- Proceso que da lugar a una alteración en el ADN en la estructura de un cromosoma; es el origen de la mayoría de los alelos.

No disyunción.-Es el fallo de los cromosomas o de las cromátidas en separarse y desplazarse a los polos opuestos en división.

Toxicidad.- Es una medida de la capacidad de intoxicación de un producto químico. Es una característica invariable.

Toxicología ambiental.- Se centra en el impacto que tienen los contaminantes del ambiente sobre los seres vivos.

Toxicología.- Es el estudio de los efectos nocivos que ejercen las sustancias químicas sobre los organismos vivos.

Toxicología genética.- Estudia el daño que se puede provocar en el material hereditario.

Fig. 10. Se observaron *alteraciones en el fenotipo*, como: Ojos reducidos o en barra, cuerpo reducido, interrupción de venas en las alas, ausencia de sección en las alas, alas reducidas así como *problemas en el desarrollo* de algunas moscas recuperadas del tratamiento con MMC como: Retraso en el desarrollo de las pupas, problemas de polaridad en pupas. **(10-1)** Moscas adultas con fenotipo normal, una hembra y un macho con fenotipo libre de inversiones de la línea ESTANDAR, la proporción de tamaño entre la hembra y el macho es normal, así como el tamaño y la forma de los ojos. **(10-2)** Machos adultos de la línea ESTANDAR *con fenotipo serrata*, Obsérvense la diferencia en el tamaño del cuerpo y los ojos alargados (en barra). **(10-3)** Macho de la línea SILVESTRE, obsérvense los ojos muy reducidos.

Material biológico proporcionado por el Banco de Moscas de la Facultad de Ciencias. UNAM.



Fig. 10-1



Fig. 10-2



Fig. 10-3

Tabla I. Índice de sobrevivencia y Proporción sexual promedio +/- ee de moscas tipo Silvestre y Estándar expuestas durante el desarrollo a MMC.

MMC [μ M]	SILVESTRE							ESTANDAR													
								LIBRES						PORTADORAS							
	N	Is	±	ee	Psex	±	ee	N	Is	±	ee	Psex	±	ee	N	Is	±	± ee	Psex	±	± ee
Testigo	184	1.00	±	0.00	0.52	±	0.02	44	1.00	±	0.00	0.48	±	0.02	65	1.00	±	0.00	0.64	±	0.06
0.0083	175	0.95	±	0.07	0.51	±	0.04	34	0.80	±	0.09	0.43	±	0.12	36	0.79	±	0.50	0.32	±	0.18
0.0166	130	0.70	±	0.22	0.54	±	0.08	40	0.88	±	0.32	0.48	±	0.03	36	0.75	±	0.42	0.60	±	0.10
0.0332	193	1.06	±	0.17	0.56	±	0.02	43	0.99	±	0.11	0.48	±	0.01	42	0.53	±	0.30	0.49	±	0.02
0.0664	173	0.93	±	0.19	0.50	±	0.05	32	0.69	±	0.39	0.52	±	0.14	44	0.99	±	0.66	0.52	±	0.08
0.1328	181	0.98	±	0.00	0.59	±	0.00	36	0.78	±	0.47	0.58	±	0.08	43	0.98	±	0.67	0.48	±	0.08
0.2656	151	0.82	±	0.07	0.42	±	0.05	55	1.27	±	0.23	0.45	±	0.15	49	1.04	±	0.60	0.54	±	0.07
0.5312	122	0.65	±	0.28	0.42	±	0.02	32	0.75	±	0.29	0.55	±	0.12	38	0.72	±	0.28	0.47	±	0.05
1.0624	125	0.67	±	0.13	0.50	±	0.09	43	0.99	±	0.11	0.71	±	0.05	32	0.64	±	0.30	0.50	±	0.06
2.1248	227	1.23	±	0.19	0.49	±	0.02	44	0.98	±	0.27	0.43	±	0.01	42	0.73	±	0.50	0.52	±	0.14
4.2500	214	0.94	±	0.28	0.50	±	0.05	41	0.94	±	0.06	0.51	±	0.08	36	0.75	±	0.25	0.62	±	0.04
8.5000	109	0.60	±	0.06	0.48	±	0.03	42	0.94	±	0.18	0.37	±	0.03	40	0.74	±	0.26	0.51	±	0.09
17.000	149	0.80	±	0.12	0.52	±	0.01	42	0.99	±	0.40	0.42	±	0.14	41	0.64	±	0.01	0.43	±	0.06
34.000	135	0.72	±	0.22	0.56	±	0.01	23	0.52	±	0.02	0.66	±	0.13	33	0.55	±	0.09	0.59	±	0.04
68.000	123	0.67	±	0.03	0.55	±	0.02	23	0.55	±	0.25	0.45	±	0.17	29	0.57	±	0.26	0.54	±	0.11
135.50	14	0.08	±	0.01	0.85	±	0.02	12	0.27	±	0.11	0.72	±	0.05	21	0.24	±	0.18	0.72	±	0.27

ee, error estándar

Tabla II. Frecuencia de manchas en moscas libres y portadoras de inversiones expuestas subcrónicamente a MMC durante el desarrollo larvario.

MMC [μ M]	LIBRES DE INVERSIIONES								PORTADORAS DE INVERSIONES							
	Total de Alas	Manchas chicas (1 -2 células) m=2		Manchas grandes (□ 2 células) m=5		Manchas gemelas m=2		Totales m=2		Total de Alas	Manchas chicas (1 -2 células) m=2		Manchas grandes (□ 2 células) m=5		Totales m=2	
		No	Frec.	No	Frec.	No	Frec.	No	Frec.		No	Frec.	No	Frec.	No	Frec.
Testigo	78	26	(0.33)	0	(0.00)	0	(0.00)	26	(0.33)	66	19	(0.29)	1	(0.02)	20	(0.31)
0.0083	54	14	(0.26) -	1	(0.02) -	0	(0.00) -	5	(0.28) -	64	7	(0.11) -	4	(0.06) i	11	(0.17) -
0.0166	66	15	(0.23) -	0	(0.00) -	0	(0.00) -	15	(0.23) -	68	16	(0.24) -	1	(0.01) -	17	(0.25) -
0.0332	80	13	(0.16) -	4	(0.05) i	0	(0.00) -	17	(0.21) -	80	14	(0.17) -	0	(0.00) -	14	(0.17) -
0.0664	54	11	(0.20) -	2	(0.04) -	0	(0.00) -	13	(0.24) -	38	4	(0.11) -	0	(0.00) -	3	(0.11) -
0.1328	70	12	(0.17) -	1	(0.01) -	0	(0.00) -	13	(0.18) -	80	12	(0.15) -	2	(0.03) -	13	(0.18) -
0.2656	80	17	(0.21) -	5	(0.06) +	0	(0.00) -	22	(0.27) -	80	14	(0.17) -	1	(0.01) -	14	(0.18) -
0.5312	54	15	(0.28) -	9	(0.17) +	0	(0.00) -	24	(0.45) i	70	7	(0.10) -	0	(0.00) -	7	(0.10) -
1.0624	60	21	(0.35) -	2	(0.03) -	0	(0.00) -	23	(0.38) -	52	16	(0.31) -	0	(0.00) -	16	(0.31) -
2.1248	64	25	(0.39) -	10	(0.16) +	0	(0.00) -	35	(0.55) +	80	43	(0.54) +	13	(0.16) +	56	(0.70) +
4.2500	74	43	(0.58) +	24	(0.32) +	0	(0.00) -	67	(0.91) +	60	15	(0.25) -	4	(0.07) i	19	(0.32) -
8.5000	66	77	(1.17) +	58	(0.88) +	0	(0.00) -	135	(2.05) +	72	44	(0.61) +	11	(0.15) +	55	(0.76) +
17.000	78	158	(2.03) +	148	(1.90) +	1	(0.01) -	305	(3.94) +	72	94	(1.31) +	36	(0.50) +	122	(1.81) +
34.000	32	168	(5.25) +	117	(3.66) +	0	(0.00) -	285	(8.91) +	30	70	(2.33) +	52	(1.73) +	120	(4.06) +
68.000	26	129	(4.96) +	151	(5.81) +	0	(0.00) -	280	(10.7) +	56	148	(2.64) +	202	(3.61) +	350	(6.25) +
135.50	12	5	(0.42) -	0	(0.00) -	1	(0.08) -	5	(0.50) i	26	124	(4.77) +	86	(3.31) +	210	(8.12) +

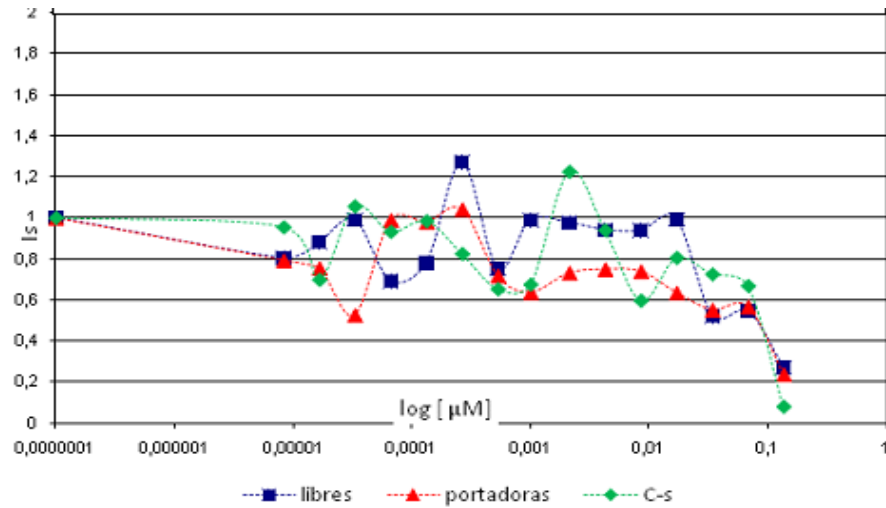


Fig. 11. Comparación del Índice de sobrevivencia de moscas tipo Silvestre y Estándar (libres y portadoras de inversiones) expuestas a MMC durante el desarrollo larvario.

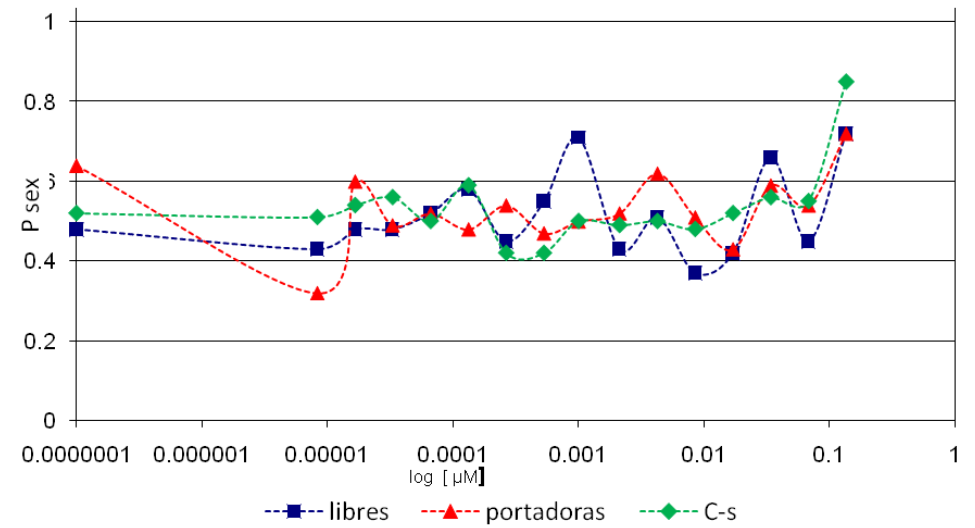


Fig. 12. Proporción sexual de moscas tipo Silvestre y Estándar (libres y portadoras de inversiones) expuestas a MMC durante el desarrollo larvario.

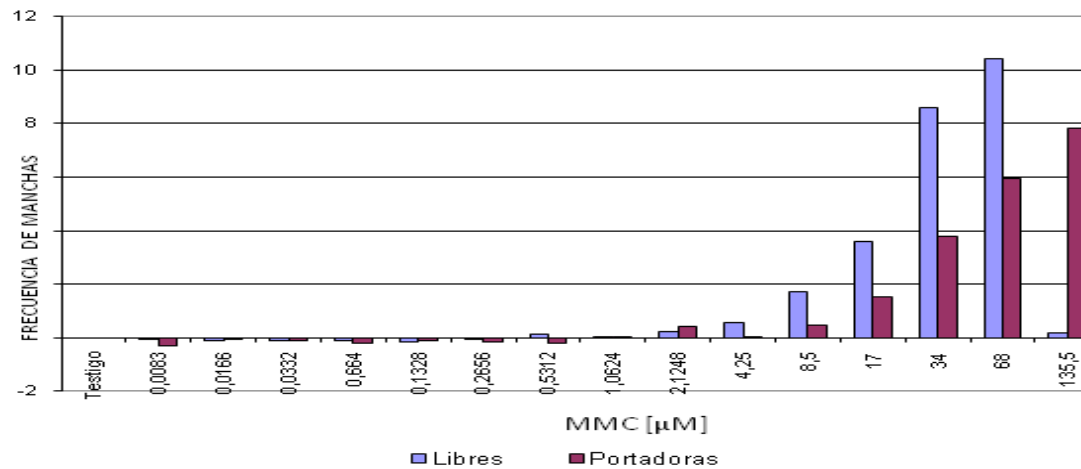


Fig.13. Frecuencia de manchas totales corregida en alas de progenie libre y portadora de inversiones de moscas tratadas con MMC durante el desarrollo.

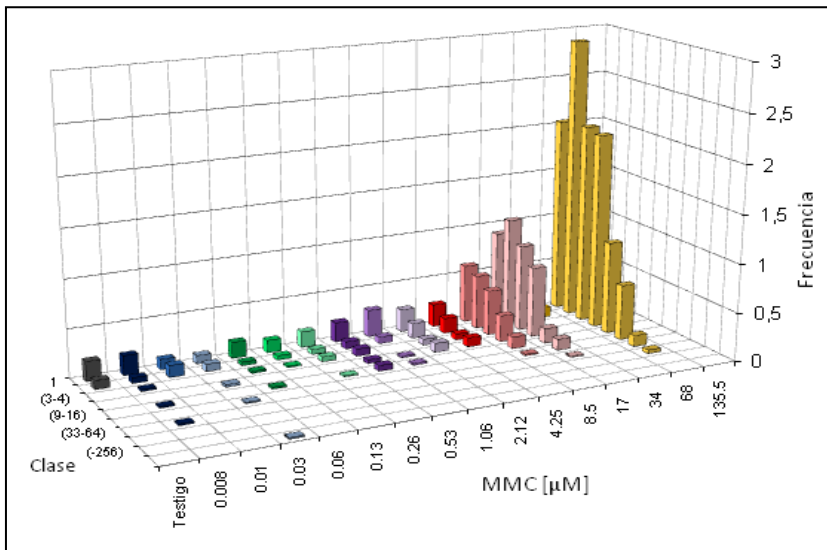


Fig. 14. Tamaño de mancha en alas de moscas libres de inversiones tratadas con MMC durante el desarrollo larvario.

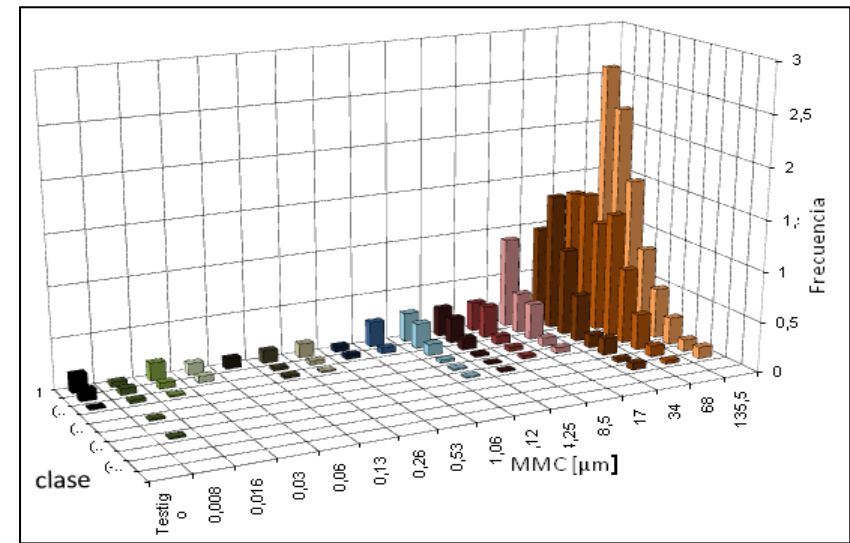


Fig. 15. Tamaño de mancha en alas de moscas portadoras de inversiones tratadas con MMC durante el desarrollo larvario.

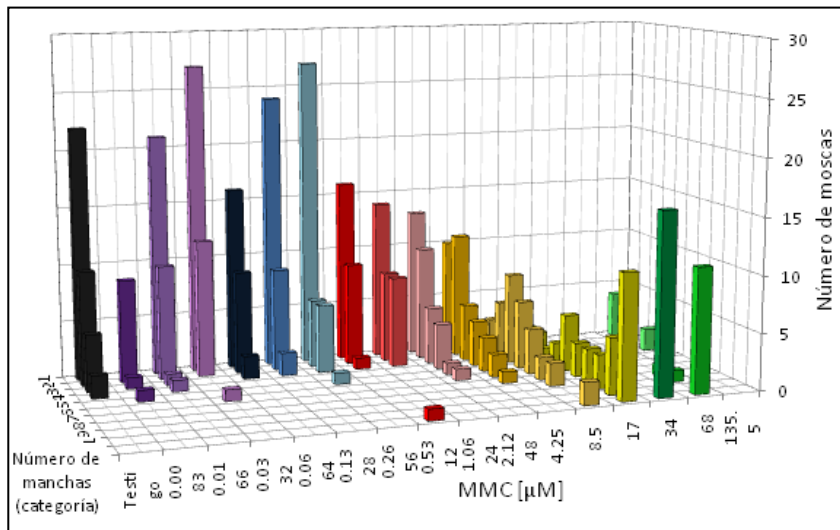


Fig.16. Número de manchas por mosca en alas de progenie libre de inversiones expuesta a MMC durante el desarrollo.

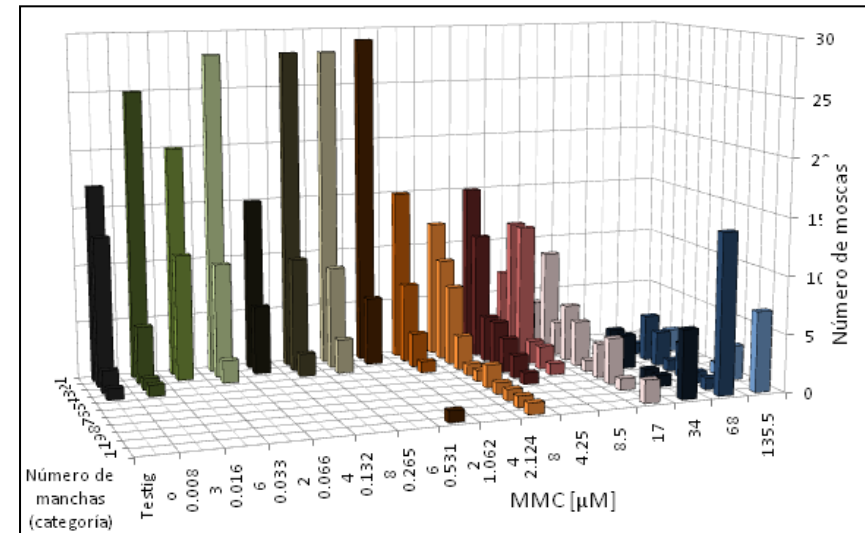


Fig.17. Número de manchas por mosca en alas de progenie portadora de inversiones expuesta a MMC durante el desarrollo.