



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

COMPARACIÓN DEL EFECTO DE COMPUESTOS
CITOSTÁTICOS EN LA REPARACIÓN,
RECOMBINACIÓN Y NO DISYUNCIÓN
MITÓTICAS EN *Drosophila*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTORADO EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA)

P R E S E N T A

M. en C. ADRIANA MUÑOZ HERNÁNDEZ

Directora: Dra. Patricia Ramos Morales

MÉXICO, D. F.

OCTUBRE 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/508/11

ASUNTO: Asignación de Jurado

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E

At'n: LIC. BALFRED SANTAELLA HINOJOSA

Comunico a usted que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas ha asignado al(a) **M. EN C. ADRIANA MUÑOZ HERNÁNDEZ**, el jurado para presentar Examen de Grado de DOCTOR(A) EN CIENCIAS (BIOLOGÍA).

CARGO	GRADO	NOMBRE COMPLETO
PRESIDENTE	DRA.	SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
VOCAL	DR.	JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
SECRETARIO	DR.	ADALBERTO EMILIO PIMENTEL PEÑALOZA
SUPLENTE	DR.	LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
SUPLENTE	DRA.	ERIKA RENDÓN HUERTA

El trabajo aprobado como tesis es:

"Comparación del efecto de compuestos citostáticos en la reparación, recombinación y no disyunción mitóticas en Drosophila"

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 12 de septiembre de 2011
COORDINADORA DEL PROGRAMA

M. del Coro Arizmendi

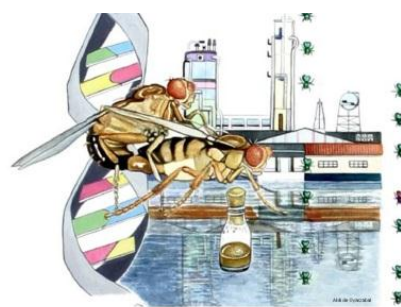
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA

MCAA/ASR/mnm*



Este proyecto se realizó en el laboratorio de:

Genética y Toxicología Ambiental



Laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental



Facultad de Ciencias

Este proyecto fue apoyado por:



Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT): 90391



Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) y el

Programa de Apoyo a Estudios de Posgrado (PAEP): 002338



Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y

Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME) (DO200898) y el

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación

Tecnológica (PAPIIT) (IN-207196)

AGRADEZCO



A la Universidad Nacional Autónoma de México. Por abrirme sus puertas para realizar un sueño de la infancia: ser Universitaria.

A mi tutora, **Dra. Patricia Ramos Morales**

Por el apoyo y dedicación en la realización de este trabajo. Gracias por creer en mí y brindarme confianza y apoyo en todo momento de mi trayectoria académica. Por la constante motivación para concluir esta etapa. Por ser más que una maestra, una amiga incondicional y un gran ejemplo a seguir. ¡Lo logramos!

A la **Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo** y a la **Dra. Regina Dorinda Montero Montoya,**

Por haber participado como miembros del Comité Tutoral. Gracias por contribuir con sus comentarios y sugerencias durante la realización de este proyecto. Por su apoyo y consejos académicos.

A los miembros del Jurado:

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre

Dr. Adalberto Emilio Pimentel Peñaloza

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Dra. Erika Rendón Huerta

Por brindarme de su tiempo y participar en la revisión y corrección de este trabajo. Agradezco su confianza y el entusiasmo mostrado por el cumplimiento de esta meta.

A mi madre. Por su ejemplo de fortaleza. Por su amor y apoyo incondicional.

A mi abuela Carmen. Siempre presente en mis recuerdos; por despertar en mí el interés por aprender.

A mi padre. Por los recuerdos que conservo de él.

A un gran amigo, Rogelio. Por su calidad humana; su presencia, cariño y apoyo han marcado momentos importantes en mi vida.

A la familia Muñoz-Mayoral. Por su presencia y cariño.

A mi sobrina, Rubí Estefanía. Por brindarme su alegría y cariño.

A mis tíos Lucero y Luis. Su amor y apoyo han sido un ingrediente esencial en mi vida; porque todo momento compartido ha sido especial.

A mi suegro, Luis. Por su apoyo incondicional.

A toda mi familia. Por su confianza y demostraciones de cariño.

A Paty, Mariana y Arturo. Uno de los grandes valores que la vida nos permite cultivar es la amistad. ¡Nos falta mucho por compartir!

A la familia Bortolini-Rodríguez. Por sus buenos deseos.

A todas y cada una de las personas que a lo largo de mi vida han estado presentes. Les comparto este éxito porque sin ustedes no lo habría logrado.

A la gran FAMILIA del laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental.

A todos mis compañeros con los que tuve la oportunidad de compartir mi momento de estudiante.

A mis colegas con los que ahora comparto el placer de colaborar como grupo de trabajo. Por las largas y divertidas jornadas de trabajo.

A cada uno de mis alumnos que con su presencia en el aula contribuyen a mi formación como persona y como docente. Gracias por permitirme contagiarlos un poco del gusto de trabajar con *Drosophila*.

En especial a:

A mi esposo, amigo y compañero: José Luis

Por su amor, apoyo y confianza; por compartir un proyecto de vida; por todos los momentos en los que hemos reído y llorado; por el álbum de recuerdos que hemos ido construyendo; por impulsarme a superar cada día; por el mejor regalo que nos ha brindado la vida: nuestra hija Jimena.

A mi hija, Jimena

Por iluminar todos mis días con su sonrisa; por compartir conmigo la magia de su mundo; por exigirme dar lo mejor de mí; por permitirme experimentar la maravillosa experiencia de ser madre.

Por ser mis dos grandes amores en la vida..... **¡LOS AMO POR SIEMPRE!**



Las cepas de *Drosophila* utilizadas para la realización de este proyecto fueron proporcionadas por el **Banco de Moscas** de la Facultad de Ciencias, U. N. A. M.

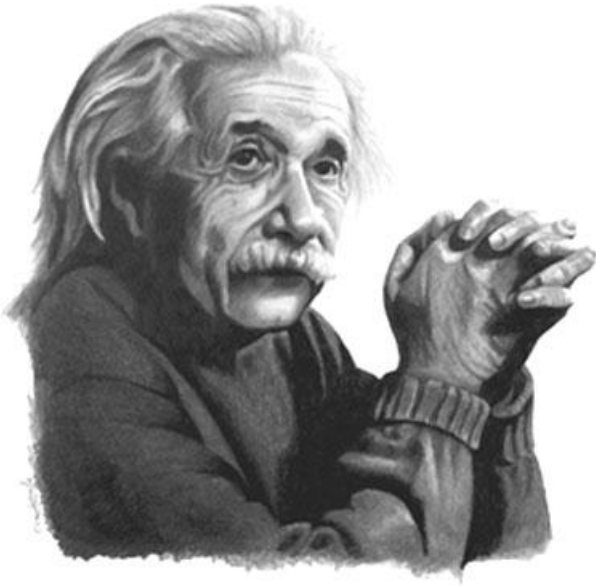
Agradezco al Biól. Hugo Rivas Martínez, por el diseño de las moscas empleadas en los esquemas de cruza de este trabajo.

A Drosophila melanogaster.



"amante del rocío de vientre negro"

La conocí sin imaginar el potencial que tenía. Aprender de ella es sumergirse al maravilloso mundo de la complejidad biológica. Trabajar se convierte en un juego privilegiado.



Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica.....

La voluntad.

**Albert Einstein
(1879 -1955)**

ÍNDICE

Resumen	i
Abstract	iv
Introducción	1
Ensayos de genotoxicidad	
<i>Drosophila</i> como sistema de prueba	
Objetivo General	10
Objetivos Particulares	11
Hipótesis	11
Justificación	11
Materiales y Método	21
Mutágenos de Referencia	21
Compuestos Citostáticos	22
Mutación Somática y Recombinación Mitótica en <i>Drosophila</i>	23
Cruza estándar (CE)	29
Cruza modificada (CM)	30
Tratamientos:	33
Prolongado (72 x 48 h)	
Interrumpido (72 6 h)	
Obtención de larvas	35
Fijación y elaboración de laminillas	37
Criterios para el registro de las manchas	37
Análisis Estadístico	38
Resultados y Discusión	41
Conclusiones	52
Referencias	71

Apéndice 1	95
Apéndice 2	97
Apéndice 3	98
Apéndice 4	100
Apéndice 5 (Artículo Científico)	102

RESUMEN

La capacidad de *Drosophila melanogaster* para detectar aneuploidógenos en células germinales ha sido probada desde hace años (Baker y Carpenter, 1972; Boyd *et al.*, 1976,1987; Würgler *et al.*, 1982; Würgler y Vogel, 1986) sin embargo, con excepción de los estudios citogenéticos, no se dispone de metodologías experimentales para detectar el efecto de éstos en células somáticas *in vivo*. Asimismo, es deseable que estas metodologías reúnan una serie de características que a su vez incrementen las expectativas de su uso y, por lo tanto, su valor específico como bioensayo. Entre éstas, la posibilidad de discriminar la presencia de artefactos que conduzcan a un diagnóstico equivocado (efecto positivo falso o negativo falso) y el empleo de biomarcadores colaterales que identifiquen efectos tempranos -aún por debajo del efecto estadístico-, que contribuyan a establecer el efecto de bajas concentraciones de genotóxicos potenciales, resultan esenciales en la determinación del daño genético.

Por lo anterior, para establecer el efecto de tres compuestos citostáticos (colchicina, hidrato de cloral y vinblastina), reconocidos como aneuploidógenos por el National Institute of Environmental Health Sciences y la Environmental Protection Agency de los Estados Unidos (Bishop *et al.*, 1996), en el presente trabajo se utilizó una metodología que, además de evaluar eventos genéticos como mutación puntual, recombinación somática y delección, podría detectar no disyunción. Se utilizan organismos heterocigotos para marcadores fenotípicos recesivos de los tricomas de las alas. La pérdida de heterocigosis durante el desarrollo larvario conduce a la expresión de tricomas con un fenotipo mutante en un contexto silvestre.

El número y tamaño de las manchas mutantes producidas es informativo de la actividad del compuesto, así como del tiempo en el que ocurrió la pérdida de heterocigosis. Por el sistema de cruce utilizado se recobran dos tipos de individuos en la progenie (libres y portadores de inversiones múltiples). La comparación del efecto de tratamiento en los dos tipos de progenie permite estimar la participación de la recombinación mitótica en la respuesta registrada. Se determinó la inducción de manchas en las alas por los citostáticos: colchicina, hidrato de cloral y vinblastina. Para explorar el efecto del tiempo de exposición en la inducción de mutación somática y recombinación mitótica se diseñó un protocolo con exposición interrumpida a una misma concentración de colchicina y vinblastina. Los organismos expuestos se retiraron del tratamiento por intervalos de 6 h, para obtener exposiciones finales de 6, 12, 18 hasta 48 h. Para determinar si la presencia de inversiones múltiples confiere ventaja ante la genotoxicidad de los compuestos probados, o bien, si esto se relaciona con la inducción de fenocopias, se diseñó un sistema de cruce alternativo incluyendo un marcador somático adicional (*ebony*) que permitiera identificar a los organismos portadores de inversiones múltiples.

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que además de su probada actividad aneuplodogénica, el hidrato de cloral mostró actividad recombinogénica dependiente de actividad clastogénica en *Drosophila*; la colchicina y vinblastina mostraron actividad mutagénica y recombinogénica en células somáticas, la actividad recombinogénica podría estar relacionada con actividad clastogénica. En *Drosophila melanogaster*, la presencia de inversiones múltiples interfiere con la genotoxicidad de los compuestos probados.

Por otra parte, se estableció que un efecto asociado con la exposición de aneuploidógenos en *Drosophila* puede ser la formación de una muesca en las alas, por lo que se modificó el sistema de cruce utilizado para evaluar la inducción de mutación somática y recombinación mitótica mediante el uso del marcador

recesivo para color de cuerpo, para discriminar entre la progenie libre y portadora de inversiones múltiples, así como la aparición de fenocopias entre los organismos expuestos. Otro aspecto registrado es la capacidad de los compuestos utilizados para producir malformaciones que comprometen la región cefálica, torácica y abdominal.

ABSTRACT

The ability of *Drosophila melanogaster* to detect aneuploidogens in germ cell has been reported several years ago (Baker and Carpenter, 1972; Boyd *et al.*, 1976, 1987; Würgler *et al.*, 1982; Würgler and Vogel, 1986), however, with exception of the cytogenetic studies no experimental methodologies to detect the effect of aneuploidogens in somatic cells *in vivo* are available. It is also desirable that these methodologies to achieve a number of features which increase the expectations of its use. Among these, the ability to discriminate false responses or artifacts that would lead to wrong diagnosis (false negative or false positive effect); the use of collateral biomarkers to identify early effects - even below the statistical, and the effect of changes in the genomic organization of organisms as chromosomal rearrangements in the genotoxic response.

The effect of three cytostatic compounds: colchicine, chloral hydrate and vinblastine in organisms with and without chromosomal rearrangements were explored in this work. The induction of somatic mutation and mitotic recombination in the adult *Drosophila* wings is scored after exposure of third instar larvae during development. Standard larvae are transheterozygous for autosomal, recessive morphological markers for the trichoma phenotype. The loss of heterozygosis during larval development leads to the expression of trichomes with a mutant phenotype in a wild context. The number and size of the spots mutants produced is informative of the activity of the compound and time occurring since the loss of heterocigosis. In the progeny, two types of individuals derived from the standard cross: free and multiple inversion carrier flies. The comparison of the effect of treatment in the two types of progeny allows estimating the participation of the mitotic recombination in the recovered response. To explore the effect of the exposure's time on the induction of

somatic mutation and mitotic recombination by colchicine and vinblastine, the interrupted exposure was assayed. Third instar larvae were exposed by intervals of 6 h, for a final exhibition schedule of 6, 12, 18 to 48 h.

To determine if the presence of multiple inversions constitutes an advantage for carrier flies to the genotoxicity of compounds an alternative crossing system including an additional somatic marker (ebony) was used. The marker color allows to distinguish among $flr + e/+ mwh e+$ (wild phenotype) and inversion carrier flies (TM3, Ser $e/ mwh e$) with nicks in the wing's border and ebony body color.

From the results it can be concluded that, in addition to its proven activity as aneuplodogens, chloral hydrate showed recombinogenic activity depended from clastogenic effect; colchicine and vinblastine showed mutagenic and recombinogenic activity in somatic cells, and the recombinogenic activity could be related to clastogenic activity, too. In *Drosophila melanogaster*, the presence of multiple inversions interferes with the genotoxicity of compounds assayed. Other effect observed is the ability of these compounds to produce malformations involving the cephalic, thoracic and abdominal region. One of this could be the nick on the border wings observed in wild type body color flies from the modified cross used.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad multifactorial que puede originarse por la acumulación de alteraciones en el material genético.

En condiciones regulares las células crecen y se dividen en forma controlada produciendo más células necesarias para el mantenimiento de la homeostasis. Cuando las células envejecen o son dañadas, mueren y se reemplazan por células nuevas, sin embargo, en ocasiones este proceso no ocurre adecuadamente. La presencia de mutaciones puede modificar los procesos de crecimiento y división celular y en consecuencia, algunas de las células no mueren. La generación de células nuevas que no son necesarias, pueden formar una masa celular llamada tumor (National Cancer Institute at the National Institutes of Health: www.cancer.gov).

La búsqueda de alternativas para tratar los diferentes tipos de cánceres, ha llevado al estudio de una amplia gama de sustancias que hoy en día se utilizan de manera rutinaria en los tratamientos para combatirlo, la quimioterapia. El objetivo de ésta es interferir en la manera en que las células se dividen para evitar la diseminación del cáncer. Los regímenes de quimioterapia involucran la administración sistémica de compuestos genotóxicos que pueden inducir muerte celular a través de redes de señalización en respuesta al daño inducido al DNA (Gilbert y Hemann, 2011).

Sin embargo, es importante mencionar que se desconoce el efecto que estas sustancias tienen en las células sanas, por lo que es necesario valorar este tipo de respuesta *in vivo*.

A lo largo del ciclo celular se activan diferentes mecanismos de control denominados sitios de restricción, retenes o “checkpoints” a través de los cuales se monitorea la calidad del material genético así como la cantidad de cromosomas que se segregan hacia las células resultantes (Lambert *et al.*, 1999). Con la finalidad de poder estudiar los cambios que definen la dinámica de las células, Kopnin (1999) propuso cuatro momentos importantes en los que estos retenes son activados: 1) en la fase G1, 2) en la fase S, 3) en la fase G2 y 4) en M, el llamado “retén del huso”.

*Retén en **G1***: El mantenimiento de la integridad del DNA es un requerimiento indispensable para que la célula entre a la fase S. La replicación del DNA dañado podría llevar a la amplificación del daño y eventualmente a la transmisión de anomalías genéticas a la descendencia. En las células expuestas a tratamientos con mutágenos que inducen rompimientos (radiación UV y gamma), el retén del ensamblaje del huso detiene a la célula en G1 y ésta no entra a la fase S. El arresto en G1 no sólo es observado después de tratamientos que dañan al DNA, sino también bajo condiciones que se ven acompañadas por cambios en el número de cromosomas en el ciclo celular anterior debidos a la segregación incorrecta de los cromosomas durante la mitosis, lo que puede conducir a la formación de micronúcleos y también por el incorrecto ensamble de los microtúbulos, lo que podría llevar a subsecuentes desórdenes en la mitosis. El arresto en la etapa de G1 puede ser irreversible (como en el caso de la radiación gamma) o reversible, cuando se inhibe el efecto del factor inductor de la pausa, como puede ser la restauración de los nucleótidos alterados o del sistema de microtúbulos (Kopnin, 1999).

Retén en S: En este punto de restricción se monitorea la correcta replicación del DNA. En particular, el arresto en un cierto periodo de la fase S se observa en células con un déficit de nucleótidos y que por alguna razón no fueron detenidas en la etapa de G1 (Kopnin, 1999).

Retén en G2: El DNA dañado y otros desórdenes inducen el arresto no sólo en G1 y S, sino también en G2. Es posible que algunas de las alteraciones inducidas hayan pasado desapercibidas en los retenes anteriores o bien, que hayan sido adquiridas recientemente en células que replicaron de manera completa el DNA o en aquellas que no hayan realizado una replicación total. Los mecanismos de reparación inducidos en esta etapa – principalmente post-replicativos- favorecen el mantenimiento de la integridad de la célula aún a costa de la calidad del material genético (Kopnin, 1999).

Retén en M: De manera particular éste es activado por cambios en las interacciones entre las proteínas asociadas a los cinetocoros, como BUB1, BUBR1, MAD1 y MAD2. (Hyams y Brinkley, 1989; Kopnin, 1999).

Modificaciones en la fidelidad del ensamblaje y en la funcionalidad del aparato de división pueden llevar a generar aberraciones en la segregación de los cromosomas lo cual, tiene implicaciones en cuanto al contenido cromosómico como puede ser la presencia de complementos múltiples (poliploidia) o desviaciones individuales en el número (aneuploidias) (Parry, 2008).

La aneuploidia, entendida como la pérdida o ganancia de uno o más cromosomas es un problema serio en la salud humana ya que es un factor que contribuye de manera importante en la generación de alteraciones

reproductoras (abortos, infertilidad), en la inducción de malformaciones congénitas y en el desarrollo de tumores (Honma *et al.*, 2001).

Existen evidencias de que la aneuploidia mitótica contribuye a la formación de tumores debido a que puede haber pérdida de un cromosoma donde se localizan genes supresores de tumores o bien, favoreciendo la polisomía de cromosomas en los que se encuentran albergados oncogenes (Pihan y Doxsey, 1999; Duesberg *et al.*, 1999). En células germinales, la aneuploidía contribuye a manifestaciones como retraso mental, malformaciones congénitas y abortos.

El hecho de que algunos individuos con aneuploidias particulares como el síndrome de Down sobrevivan y que la poliploidía se reconozca como una condición regular en órganos como el hígado, -en humanos- hace suponer que bajo ciertas situaciones estas condiciones genéticas son compatibles con la sobrevivencia celular. Por otro lado, se ha reportado que tanto la aneuploidia como la poliploidia podrían disparar la respuesta apoptótica como un mecanismo de depuración de células que presenten lesiones que vayan en detrimento del mantenimiento de la estabilidad del contenido cromosómico de las células (Roos *et al.*, 2004).

El mecanismo principal que conlleva a la aneuploidia es la incorrecta segregación o no-disyunción de los cromosomas durante la división celular. Su origen puede ser espontáneo o como resultado de la exposición a compuestos químicos ambientales. Estas sustancias pueden interactuar con el aparato del huso o interferir con sus funciones, recobrándose como consecuencia células aneuploides, poliploides y/o micronucleadas (Hyams y Brinkley, 1989). Por lo anterior, estos compuestos han sido denominados aneuploidógenos (agentes inductores de aneuploidias) o bien,

aneugénicos. Su detección, la determinación de los mecanismos de acción y el riesgo a la salud representan campos de interés en la investigación, por lo que surgió el programa de Protección de la Población Europea para agentes químicos aneugénicos (The Protection of the European Population from Aneugenic Chemicals (PEPFAC) (Parry, 2008).

Entre los agentes químicos que inducen poliploidias y aneuploidias se encuentran los llamados venenos del huso, tales como la colchicina, los alcaloides de *Vinca*, los taxanes y el nocodazol. Muchos de estos compuestos son utilizados como agentes citostáticos quimioterapéuticos, o fármacos con aplicación como fungicidas y antihelmínticos. Estas drogas alteran la dinámica de polimeración de los microtúbulos (MTs), lo que provoca arresto mitótico. Como compuestos quimioterapéuticos, los inhibidores de los MTs son usados a concentraciones altas para bloquear la división celular y matar a las células malignas. Debido a su especificidad sobre las células en división, no es extraño que una consecuencia de su efecto sea la inducción de aberraciones cromosómicas. Se considera que debido a su capacidad para disolver un tumor primario, también exista el riesgo de generar tumores secundarios. Los agentes citostáticos quimioterapéuticos son también usados en inmunoterapia, donde se administran a concentraciones bajas (Roos *et al.*, 2004).

Ensayos de genotoxicidad

Para el Programa de Salud Ambiental de la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization's Health Programme), el monitoreo y la valoración de los efectos sobre la salud humana, derivados de la exposición a agentes ambientales de todo tipo, se consideran aspectos relevantes. El conocimiento de la presencia e identidad de agentes peligrosos en el

ambiente y el alcance de la exposición a éstos es de importancia fundamental en la interpretación y utilidad de los resultados obtenidos a través de las poblaciones humanas expuestas y en la valoración de los posibles efectos sobre la salud (IPCS, 1985).

Para poder estudiar el impacto de diversos tipos de compuestos en los organismos se requiere del empleo de métodos experimentales capaces de proporcionar información de diversos eventos genéticos en un tiempo reducido y con bajo costo (Brusick, 1987; Ramos *et al.*, 1993; Ramos, 1994).

Las diferentes metodologías que se han desarrollado emplean modelos biológicos o sistemas de prueba, que incluyen sistemas *in vivo* e *in vitro*, así como organismos de diferente complejidad en la escala evolutiva, como: bacterias, levaduras, insectos, plantas y mamíferos (Brusick, 1985), cuya respuesta en conjunto estima el posible impacto en los seres humanos (Cassarett, 1975; Sorsa, 1985; Brusick, 1987) y a través de los cuales se han obtenido durante los últimos 20 años, datos importantes en lo referente al riesgo ocasionado por los agentes genotóxicos a la salud del hombre, lo cual de otra manera sólo hubiera sido posible después de la exposición accidental a estas sustancias (Cassarett, 1975; Brusick 1987). Estos modelos son evaluados con base en su capacidad de respuesta, de tal forma que sólo aquellos que resultan sensibles y capaces de discriminar entre los diferentes tipos de daño, son aceptados para usarse de manera rutinaria. En la tabla I se presentan algunas de las características señaladas para un sistema de prueba ideal.

En la tabla II se presenta el resumen de las características de los grupos de pruebas identificados como rutinarias por el Programa Gene-Tox de la Environmental Protection Agency (EPA) (Brusick, 1987). Algunas baterías se

construyen para predicción de carcinogénesis; otras se enfocan a riesgo genético con énfasis en la mutagénesis de células germinales de ratón. Es poco probable alcanzar ambos objetivos con una sola batería, ya que la más adecuada para cada evento tóxico se deriva de un tipo independiente de datos (Brusick, 1987).

Tabla I. Características señaladas para un sistema de prueba ideal.

1. Costo moderado
 2. Corta duración del ensayo
 3. Detección de un rango amplio de eventos genéticos
 4. Discriminar el efecto inducido y respuestas falsas (positivas y negativas)
 5. Distinguir el efecto de concentraciones, formas y rutas de exposición diferentes
 6. Mostrar efectos claros que puedan ser medidos
 7. Reproducibilidad del efecto detectado
 8. Potencial de biotransformación mediada por el metabolismo
 9. Producción de progenie numerosa que proporcione muestras representativas
 10. Producir respuestas con significado biológico, detectables y medibles
 11. Ser sensible a niveles mínimos de exposición
- (De Serres, 1979; Kilbey *et al.*, 1981 y Valencia *et al.*, 1984).
-

Asimismo, es deseable que estas metodologías reúnan una serie de características que a su vez incrementen las expectativas de su uso y, por lo tanto, su valor específico como sistema de bioensayo. Entre éstas, la posibilidad de discriminar la presencia de artefactos que conduzcan a un diagnóstico equivocado (efecto positivo falso o negativo falso) y el uso de biomarcadores colaterales que identifiquen efectos tempranos -aún por debajo del efecto estadístico-, que contribuyan a establecer el efecto de

Tabla II. Principales características de los grupos de pruebas identificadas como rutinarias por el Programa Gene-Tox de la Environmental Protection Agency (EPA).

Nombre de la Prueba	Estatus filogenético	Tipo de prueba		Tipo de lesión detectada			
		<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	Mutación génica	Aberración cromosómica	Daño directo al DNA	Aplicable para riesgo germinal
Mutación reversa, <i>S. typhimurium</i> /microsomas	Bacteria	X		X			No
Mutación reversa, <i>E. coli</i>	Bacteria	X		X			No
Reparación del DNA, <i>E. coli</i>	Bacteria	X				X	No
Letales recesivos ligados al sexo (SLRL), <i>Drosophila melanogaster</i>	Insecto		X	X			Si
Análisis cromosómico	Células de mamífero	X			X		No
Intercambio de cromátidas hermanas (ICH)	Células de mamífero	X				X	No
Prueba HGPRT - (hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferasa-locus) en células de criceto chino V79	Células de mamífero	X		X			No
Análisis de cromosomas de médula ósea	roedores		X	X	X		No
Micronúcleos	roedores		X		X		No
Letales dominantes	roedores		X		X		Si

(Modificado de Brusick, 1987)

bajas concentraciones de agentes genotóxicos potenciales, resultaría esencial en la determinación del daño genético.

En relación con cualquier tipo de evento terminal: toxicidad, mutagénesis, carcinogénesis o teratogénesis, se considera en general, que existe una relación dosis-respuesta, si un cambio en la dosis de un compuesto químico se traduce en una modificación cuantificable en el efecto observado (Pfizer y Vouk, 1986).

Por lo anterior, se han identificado gran variedad de marcadores biológicos o biomarcadores - cambios medibles, ya sean bioquímicos, fisiológicos o morfológicos-, que son utilizados para evaluar la exposición a diversos agentes genotóxicos, ya que el efecto de estos sobre la salud de los organismos depende de diversos factores como el sexo, edad, condición nutricional, estado de salud entre otros.

Tradicionalmente, la estimación del riesgo genético –probabilidad de manifestar alguna enfermedad o alteración-, se ha derivado del estudio de mutaciones en gametos femeninos y masculinos, ya que estas células constituyen el sustrato para las generaciones futuras. Sin embargo, desde hace algunas décadas, se ha incrementado la atención en las células somáticas debido a los avances en la tecnología y a la aceptación de que el daño en éstas se adiciona de manera significativa a la carga de enfermedades; específicamente como factor causante de procesos malignos, alteraciones teratogénicas y enfermedades cardíacas. A nivel general, se ha observado que la falta de inducción de mutación en las células somáticas *in vivo* debe indicar una falta correspondiente de riesgo germinal, sin embargo, la no inducción de efecto en las células germinales

no implica necesariamente ausencia de efecto en las células somáticas (Ramos, 1994).

Un aspecto interesante es el hecho de que el efecto de los compuestos genotóxicos en las células sexuales se expresa en generaciones posteriores a la de los organismos expuestos (mutagénico). Las lesiones que comprometen la diferenciación de tejidos y órganos durante el desarrollo conducen a la aparición de malformaciones (teratogénico) o letalidad (toxicidad). Pero también, el efecto puede ser específico en células de ciertos tejidos (carcinogénico), originando manchas mutantes (mosaicos) en un organismo con un contexto genético silvestre.

Con base en lo anterior, parece justificable usar datos obtenidos en ensayos con animales para predecir el riesgo para la salud en el hombre. Sin embargo, las dificultades de extrapolación de datos básicamente cualitativos obtenidos de una especie a otra son considerables (Swawicki, 1980; Pfitzer y Vouk, 1986; Brusick, 1987; Travis, 1988).

***Drosophila* como sistema de prueba**

Dentro del reino animal, los insectos son considerados los organismos más diversos y dispersos. Díptera es el tercer orden más grande de los insectos y se caracterizan por presentar un desarrollo holometábolo, es decir, llevan a cabo metamorfosis completa; incluye entre las familias cosmopolitas a la familia Drosophilidae, de la cual el 56% de sus especies pertenecen al género *Drosophila*. Algunas de estas especies han sido estudiadas en diversos aspectos (herencia, especiación, sistemática, biología del desarrollo, toxicología, entre otros) (Wheeler, 1981). Por otro lado, tomando en cuenta que la mayoría de las larvas de los Díptera suelen desarrollarse

en medios acuosos, es posible utilizarlos como bioindicadores centinelas (Bautista, 2005).

El uso de *Drosophila* como modelo para evaluar genotoxicidad ha impulsado el desarrollo de diversas metodologías a través de las cuales es posible detectar la inducción de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo, mutaciones letales dominantes, pérdida parcial y/o total de cromosomas sexuales y autosómicos, translocaciones, deleciones, duplicaciones y no disyunción en células germinales y mutación y recombinación en células somáticas (Graf *et al.*, 1984; Lee *et al.*, 1983; Würgler y Vogel, 1986; Valencia *et al.*, 1984). En la tabla III se sintetizan las ventajas que hacen de la mosca del vinagre un organismo adecuado para estimar el riesgo a la salud por la exposición a agentes genotóxicos.

Como resultado de los estudios realizados por Clark (1982) y Hällstron *et al.*, (1982 y 1984) se sabe que este organismo detecta el efecto inducido por compuestos de diversas especies químicas (Vogel, 1985; Würgler y Vogel, 1986). Para el caso particular de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, se ha recurrido al uso de mutantes para funciones metabólicas especiales con los que se ha mejorado la sensibilidad de las metodologías experimentales utilizadas (Zijlstra y Vogel, 1988a y b; Graf, y van Schaik, 1992). Otro tipo de mutantes utilizados son los que confieren deficiencia en reparación a los organismos portadores (Würgler *et al.*, 1982; Würgler y Vogel, 1986; Boyd *et al.*, 1987), como *mei-9^a* que provoca deficiencia en reparación por escisión (Baker y Carpenter, 1972; Boyd *et al.*, 1976). El uso de este mutante le proporcionó mayor sensibilidad a la prueba de pérdida de cromosomas (Zimmering, 1983).

Con relación a los aneuploidógenos, existen reportes de la evaluación de éstos en células germinales (Baker y Carpenter, 1972; Boyd *et al.*, 1976; Würgler *et al.*, 1982; Würgler y Vogel, 1986; Boyd *et al.*, 1987), sin embargo, no se dispone de metodologías experimentales para detectar el efecto de éstos en células somáticas *in vivo*, que complementen la información obtenida a partir de los reportes de estudios citogenéticos.

Justificación

Existen escasos reportes del efecto *in vivo* de aneuploidógenos en células somáticas (Clementes *et al.*, 19910; Zordan *et al.*, 1989, 1994). Al evaluar el efecto inducido por el citostático vinblastina en *Drosophila melanogaster* Zordan *et al.* (1989), reportaron 50% de mortalidad en larvas tratadas, ausencia de efecto significativo en los individuos libres de inversiones, así como respuesta significativa en organismos portadores de inversiones múltiples al compararlos con el testigo respectivo. Con base en lo anterior sugieren que la respuesta obtenida “fuera estrictamente dependiente de la presencia del cromosoma *TM3*, Ser en los organismos tratados”.

Considerando que la constitución genotípica de los organismos es un factor que determina la respuesta genotóxica, es importante establecer la participación de rearrreglos o grandes inversiones en ésta.

Hipótesis

¿Las moscas que presentan arreglos complejos en sus cromosomas (portadoras de múltiples inversiones) pueden tener mayor susceptibilidad para detectar al aneuploidógeno vinblastina, que las moscas que no los presentan (libres de inversiones)?

Para responder a esta pregunta en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general

Comparar el efecto de compuestos citostáticos en la reparación, recombinación y no disyunción mitóticas en *Drosophila*.

Objetivos particulares

1. Evaluar la inducción de mutación somática y recombinación mitótica de colchicina, hidrato de cloral y vinblastina en moscas libres y portadoras de inversiones múltiples.
2. Comparar el efecto del tiempo de exposición en la inducción de mutación somática y recombinación mitótica en larvas de *D. melanogaster*.
3. Comparar la respuesta genotóxica de colchicina, hidrato de cloral y vinblastina en moscas libres y portadoras de inversiones utilizando un sistema de cruce alternativo para discriminar la inducción de fenocopias.
4. Comparar la actividad de los compuestos seleccionados en la inducción de recombinación mitótica, no disyunción y la reparación del daño genético inducido.

Tabla III. Ventajas que han hecho a *Drosophila* un organismo exitoso en el área de la Toxicología.

1. Es el eucarioto mejor conocido desde el punto de vista genético. Presenta cuatro pares de cromosomas (Figura 1) y su genoma ha sido secuenciado totalmente (contiene aproximadamente 180 Mb de tamaño). El contenido de su genoma mantiene un 60% de similitud con el del humano (Adams *et al.*, 2000).
 2. Su ciclo de vida es corto (entre 9.5 y 10 días a 25° C y 60% de humedad), lo que favorece la obtención de resultados en un tiempo reducido (Figura 2).
 3. Con base en la extensión de su ciclo de vida es posible comparar el efecto de la exposición aguda (< 6 h), semicrónica, crónica (todo el ciclo de vida), habiendo la posibilidad de combinar protocolos, lo que permite gran versatilidad en cuanto a alternativas combinadas (Vogel, 1988; Ramos, 1994; Ramos *et al.*, 2003).
 4. Los organismos que se obtienen por generación son en cantidad considerable, lo que permite obtener en poco tiempo, poblaciones numerosas.
 5. Su mantenimiento es relativamente económico.
 6. Existe un dimorfismo sexual claramente identificable.
 7. Las larvas tienen glándulas salivales con cromosomas politénicos, lo cual facilita enormemente el análisis cromosómico y el estudio de polimorfismos que son tan característicos del género *Drosophila*.
 8. Es sensible a la exposición a sustancias tóxicas administradas por diferentes, la vía alimentación-contacto es la más común, aunque también pueden emplearse las rutas de inhalación e inyección.
 7. Presenta una gran cantidad de marcadores fenotípicos que facilitan el análisis genético (Lindsley y Zimm, 1992).
 8. Su gametogénesis ha sido ampliamente estudiada, por lo que se pueden
-

valorar alteraciones al ADN ocasionadas por compuestos químicos en los diferentes estadios de las células germinales mediante el sistema de camadas (Zimmering, 1976; Kilbey *et al.*, 1981; Salceda, 1984).

9. Es considerada un organismo adecuado para estimar riesgos heredables ya que puede detectar la inducción de mutaciones en las células germinales.
 10. Resulta eficiente en la detección de metabolitos de vida corta, debido a que no requiere la adición de un sistema metabólico exógeno (Zijlstra y Vogel, 1988 a, b). Se han identificado 90 secuencias de genes de la superfamilia P450 (CYP4 y CYP6) presentes en su genoma (Tijet *et al.*, 2001) (Figura 3). El tipo de metabolismo microsómico y de desintoxicación encontrados, tanto en ratones como en moscas, es muy similar, por lo que a *Drosophila* se le otorgó el estatus de "Mamífero Honorario" (Clark, 1982; Hällstrom *et al.*, 1982, 1984).
 11. Mediante sistemas de cruza específicas se puede detectar la inducción de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo, mutaciones letales dominantes, pérdida parcial y/o total de cromosomas sexuales y autosómicos, translocaciones, deleciones, duplicaciones y no disyunción en células germinales y mutación y recombinación en células somáticas (Lee *et al.*, 1983; Graf *et al.*, 1984; Valencia *et al.*, 1984; Würgler y Vogel, 1986) (Figura 4).
 12. El género *Drosophila* está extendido por todo el mundo y comprende enorme cantidad de especies locales y cosmopolitas (Figura 5).
-

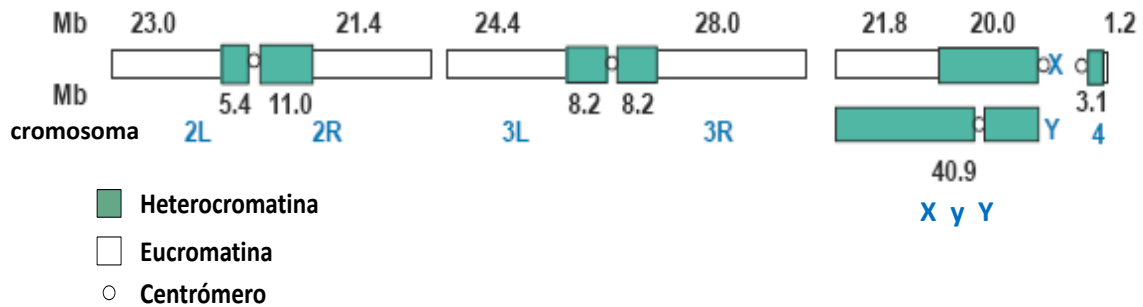


Figura 1. Cromosomas mitóticos de *Drosophila melanogaster*. Se muestran regiones eucromáticas, heterocromáticas y centrómeros. Los brazos de los cromosomas están señalados como 2L, 2R, 3L, 3R y 4. El cromosoma Y es completamente heterocromático (Modificado de Adams *et al.*, 2000).

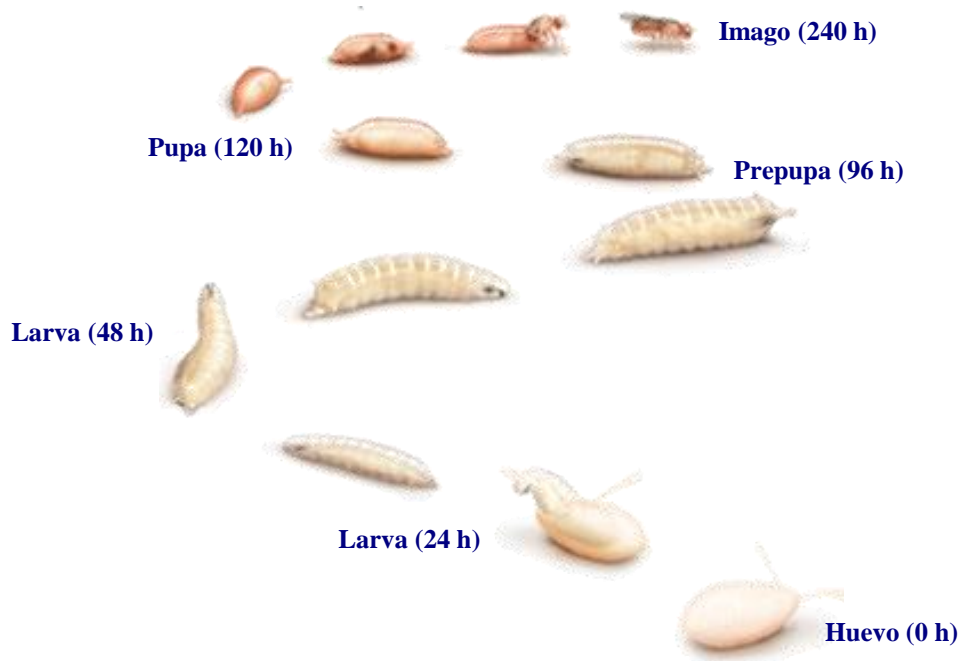


Figura 2. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (Modificado de Science, Vol. 297, 2002).

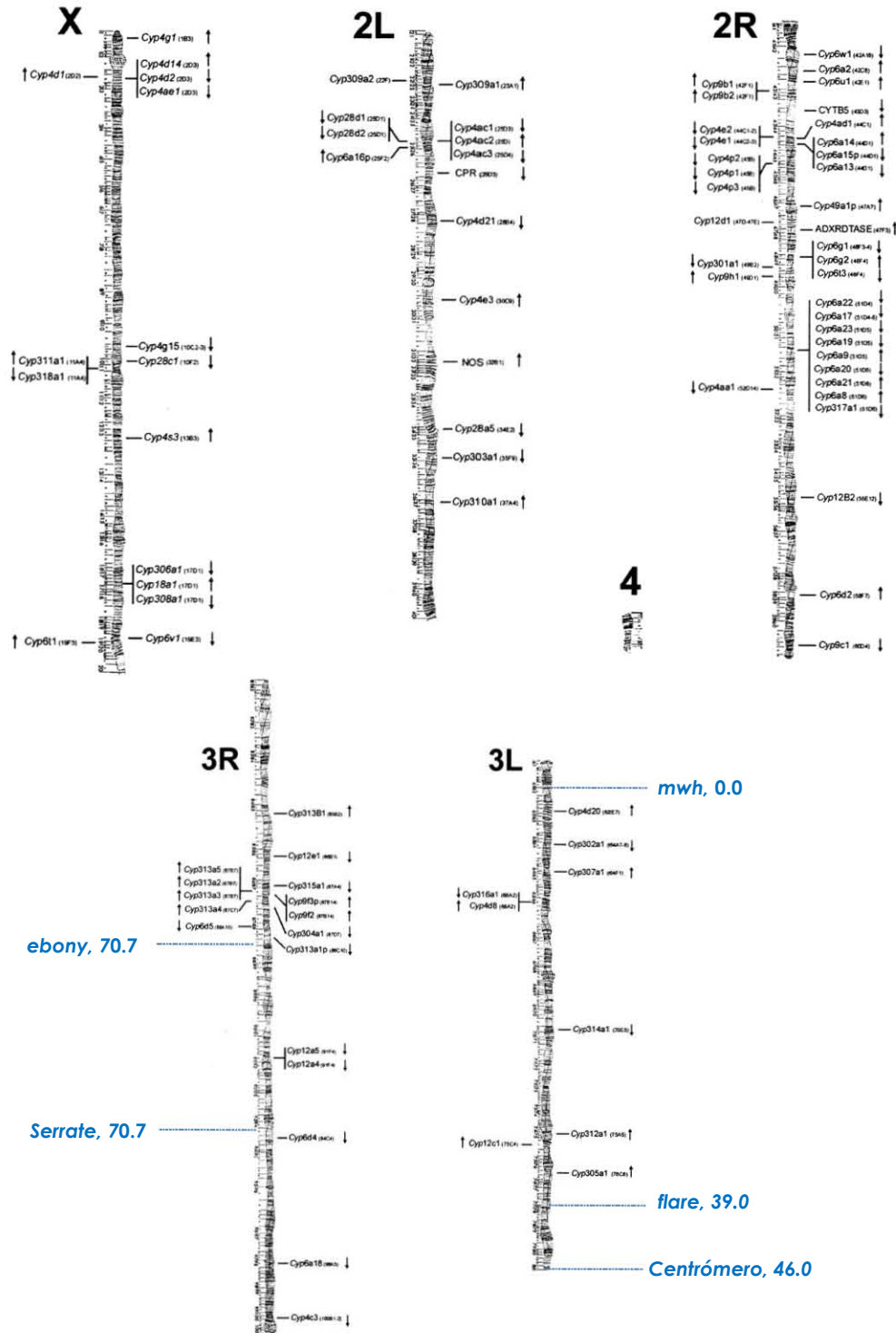


Figura 3. Mapa genético de los genes P450 presentes en *Drosophila melanogaster* (Modificado de Tijet et al., 2001). En el cromosoma 3 se presenta la ubicación física de los genes utilizados como marcadores para la evaluación de Mutación Somática y Recombinación Mitótica en *Drosophila melanogaster*.

Línea Somática

Línea Germinal

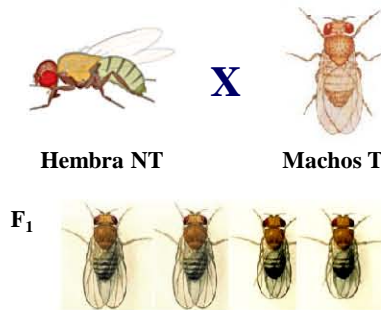
Prueba de Teratogénesis in vivo (DTT)



Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART)



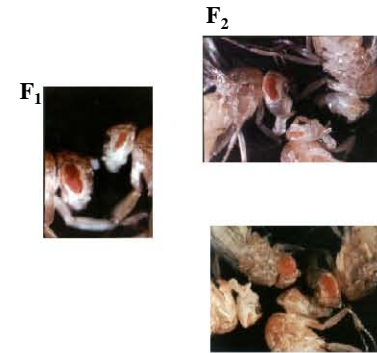
Evaluación del Efecto Transgeneracional



Indicadores de Toxicidad

- ✓ Índice de Supervivencia (IS)
- ✓ Índice Sexual (Isx)
- ✓ Índice de Fertilidad (IF)
- ✓ Índice de Fecundidad (IFc)

Prueba de Letales Recesivos Ligados al Sexo (SLRLT)



Prueba de Pérdida Parcial y/o total de Cromosomas Sexuales (SCLT)

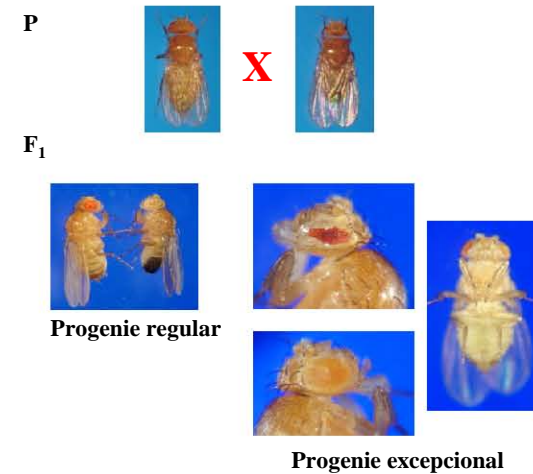


Figura 4. Metodologías utilizadas para la evaluación de genotóxicos en *Drosophila melanogaster* (Modificado de Ramos Y Muñoz, 2003).

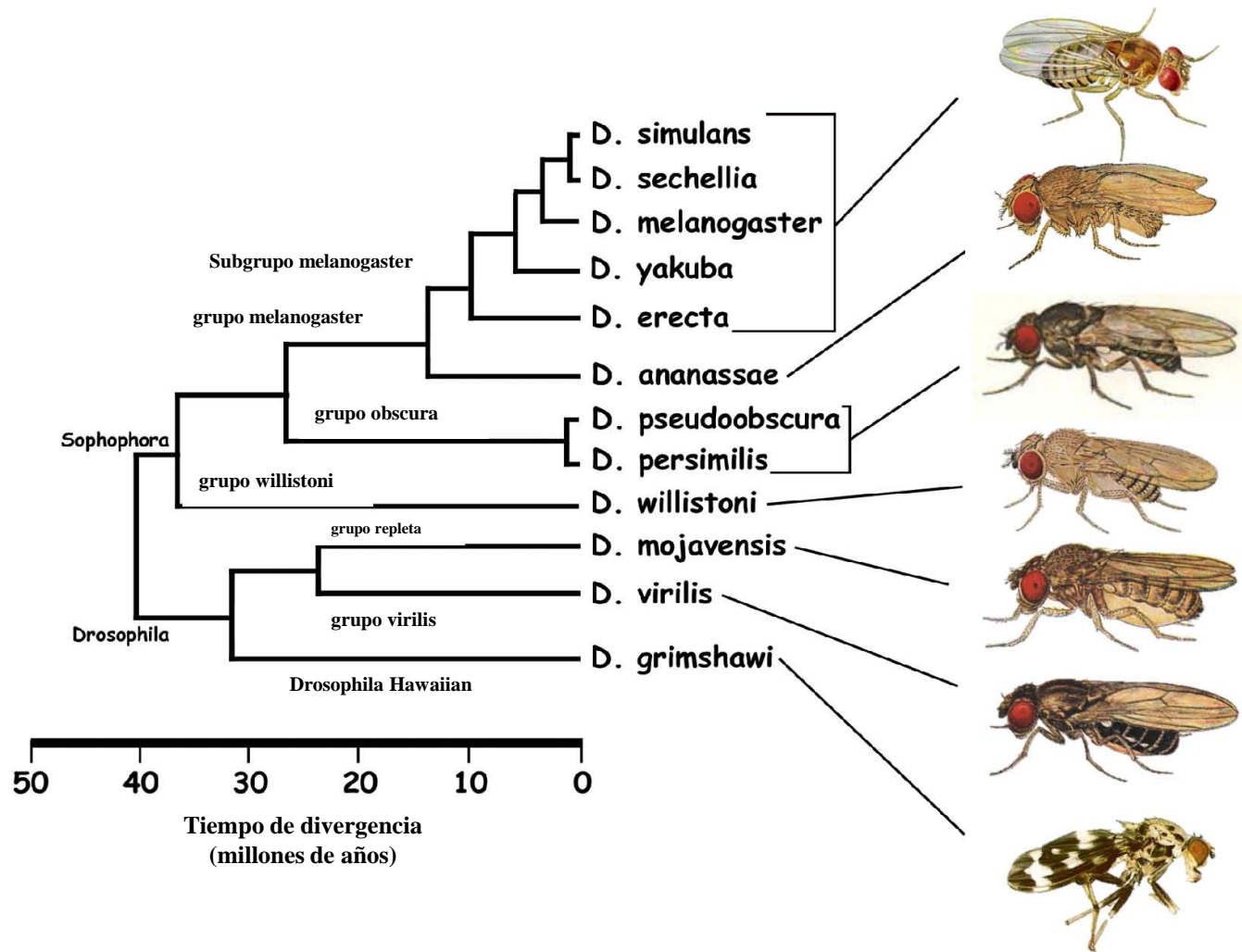


Figura 5. Filogenia del género *Drosophila*
 (Modificado de <http://insects.eugenes.org/DroSpeGe/about/Drosophila-phylogeny.gif>)

MATERIALES Y MÉTODOS

Sustancias Químicas

Mutágenos de referencia:

1) Azida de Sodio, NaN_3 . [CAS 26628-22-8]

Es un agente altamente tóxico, inhibidor de la citocromo oxidasa que interfiere con la respiración celular. Puede causar hipotensión, taquicardia, taquipnea, hipotermia, convulsiones y severo dolor de cabeza. Se usa en medicina como vasodilatador para controlar la presión sanguínea, en síntesis orgánica del ácido hidrazoico y de sodio puro, como conservador de reactivos de laboratorio, nematocida y herbicida y en las bolsas de seguridad de los automóviles. La actividad mutagénica de la azida de sodio se debe a la producción de un metabolito orgánico que es un análogo del aminoácido llamado L-azidoalanina producido por la actividad de la enzima O-acetilserina sulfidrilasa. En células somáticas de *Drosophila melanogaster*, induce recombinación mitótica dependiente de homología (Nilan *et al.*, 1973; Owais *et al.*, 1978; González y Ramos, 1997).

2) N-Nitrosodimetilamina, NDMA. [CAS 62-75-9]

Compuesto clasificado como promutágeno probado del grupo 2A (IARC, 1998) con efectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos (ATSDR, 1989; Gichner *et al.*, 1980; CICAD, 2002; PHG, 2006).

La activación metabólica de la NDMA se lleva a cabo en el hígado mediante el complejo enzimático P450-CYP2E1, dependiente de la función mixta del sistema oxidasa. Se han descrito dos etapas: 1) por hidroxilación y 2) por nitrosación. A lo largo del paso de hidroxilación, la hidroxilmetilnitrosamina formada se descompone a formaldehído y monometilnitrosamina. Ésta a su vez, es inestable y sufre rearrreglos hacia el

ion metildiazonium, que es capaz de alquilar tanto al ADN como al ARN y a las proteínas (ATSDR, 1989). Por la vía de nitrosación puede formarse metilamina y formaldehído (Kroeger-Koepke y Michejda, 1979; ATSDR, 1989; CICAD, 2002).

Se ha reportado que en *Drosophila melanogaster*, la NDMA provoca rompimiento del DNA, recombinación en células germinales (Zimmering, 1984; Woodruff *et al.*, 1985), mutación somática y recombinación mitótica en células de las alas (Graf *et al.*, 1984) y de los ojos de la mosca (Vogel, 1988; IARC, 1998); también induce mutaciones letales recesivas ligadas al sexo cuando se administra por alimentación (Zimmering, 1984), pero no por inyección (Muñoz, 1995; Zimmering, 1984), lo que confirma su actividad como promutágeno. Sus amplios efectos en la mosca así como en muchos otros organismos apoyan el uso de la NDMA como un promutágeno probado (IARC, 1998). La exposición por alimentación a concentraciones bajas de NDMA en larvas de *Drosophila*, produce la muerte de los individuos durante la metamorfosis. La observación de estas pupas condujo a la identificación de organismos en los que la cabeza se encuentra ausente, pero presentan tórax y abdomen (Ramos *et al.*, 2007; Jiménez, 2011).

Compuestos citostáticos

Se utilizaron 3 compuestos clasificados como aneuploidógenos tipo por el programa sobre aneuploidógenos del National Institute of Environmental Health Sciences y la Environmental Protection Agency, de los Estados Unidos (Bishop *et al.*, 1996) (Ver tabla VI y Apéndice I al IV).

Colchicina (CO) y Vinblastina (VB) fueron obtenidos a partir de Sigma, St. Louis MO e Hidrato de Cloral (CH) se obtuvo a partir de Productos Químicos Monterrey, NL.

Disolventes

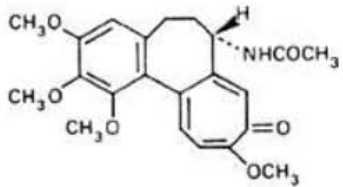
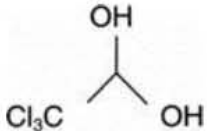
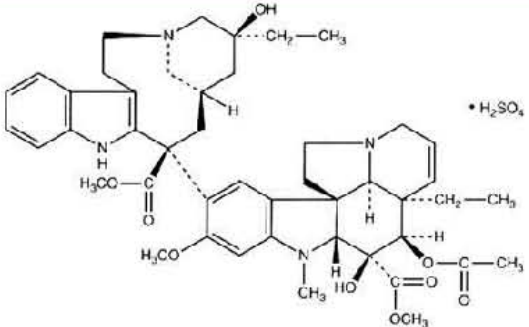
Para CO e HC, se utilizó agua destilada y para VB se utilizó alcohol etílico al 5%. Los disolventes fueron utilizados como testigos negativos.

Mutación Somática y Recombinación Mitótica en células de las alas de Drosophila.

Con esta metodología se han analizado más de 250 compuestos (Vogel, 1985, 1988; Vogel *et al.*, 1988; Vogel, 1992; Vogel y Nivard, 2000). Se emplean células de los discos imagales de las larvas. Estas células están determinadas genéticamente y permanecen en número reducido, hasta que se aproxima la metamorfosis, durante la cual se dividen mitóticamente para dar origen a diversas estructuras del adulto: ojos, antenas, alas, patas (Demerec, 1965) (Figura 6). Si a lo largo del proceso de diferenciación ocurre alguna alteración que cambie la información genética de las células en división (mutación, pérdida o ganancia de cromosomas y recombinación mitótica), esta modificación será transmitida a las células hijas descendientes de la célula alterada original, lo que genera un clon celular que se observará como una mancha distinguible, cuando se emplean los marcadores fenotípicos apropiados (García-Bellido y Merriam, 1971b; García-Bellido y Dapena, 1974; Graf *et al.*, 1984).

Se han desarrollado dos variantes de esta prueba. La primera utiliza dos marcadores autósomícos que regulan la expresión de las células que darán

Tabla V. Compuestos citostáticos empleados en la evaluación de la inducción de Mutación Somática y Recombinación Mitótica en *Drosophila melanogaster*.

Compuesto	Estructura química	Generales
Colchicina, CO	 <p>Fórmula química: $C_{22}H_{25}NO_6$</p>	<p>Nombre químico: (S)-N-(5,6,7,9-Tetrahydro-1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxobenzo[a]heptalen-7-yl)acetamide</p> <p>PM= 399.4</p> <p>CAS: 64-86-8</p> <p>Categoría: Droga citotóxica</p>
Hidrato de Cloral, CH	 <p>Fórmula química: $C_2H_3Cl_3O_2$</p>	<p>Nombre químico: 2,2,2-Trichloroethane-1,1-diol</p> <p>PM= 165.4</p> <p>CAS: 302-17-0</p> <p>Categoría: Premedicación</p>
Vinblastina, VB	 <p>Fórmula química: $C_{46}H_{58}N_4O_9 \cdot H_2SO_4$</p>	<p>Nombre químico: Vincaléukoblastine sulfato (1:1) (salt)</p> <p>PM= 909.1</p> <p>CAS: 143-67-9</p> <p>Categoría: Droga antigota</p>

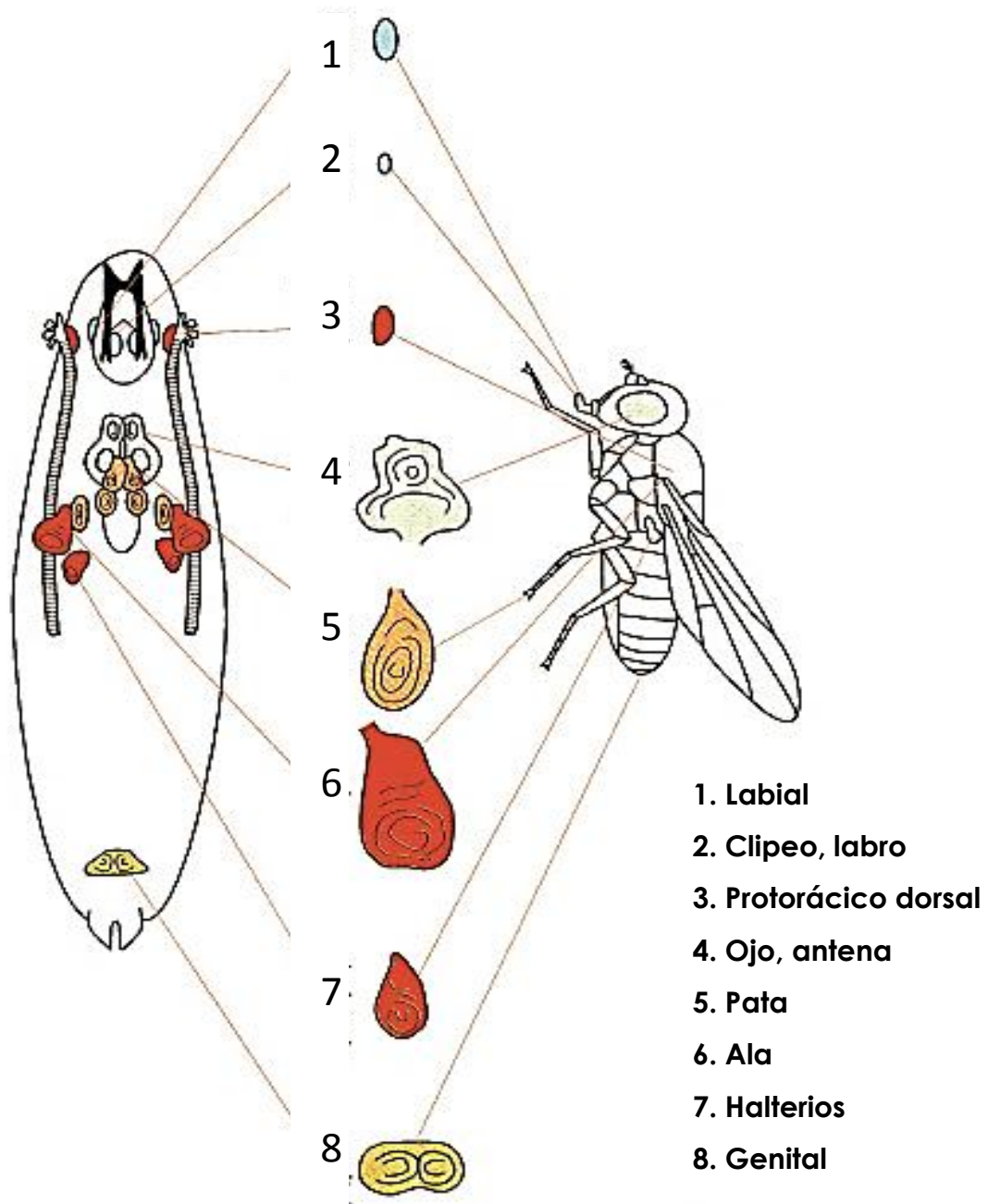


Figura 6. Estructuras en el adulto originadas a partir de los discos imagales (Modificado de Alberts *et al.*, 2002).

origen a los tricomas de las alas de la mosca (Graf *et al.*, 1984). La segunda variante emplea células que darán origen a los ojos de la mosca (Vogel y Ramel, 1988). Se ha considerado que esta prueba es similar a la de locus específico de ratón y, de forma análoga, analiza la respuesta de un solo locus (*white*) ante compuestos genotóxicos.

El ala está constituida por dos monocapas celulares (dorsal y ventral) con desarrollo independiente y una dinámica de divisiones mitóticas básicamente exponencial (García-Bellido y Merriam, 1971a), los tricomas son procesos cuticulares unicelulares y el tamaño mínimo de expresión es de una célula. Esta prueba se basa en el uso de marcadores recesivos para los tricomas que se forman a partir de cada célula de las alas y que en el adulto se pueden observar mediante la aparición de manchas con fenotipos mutantes en un contexto de pelos de tipo silvestre. Las manchas mutantes pueden ser sencillas, originadas por: pérdida, no-disyunción, mutación puntual y recombinación mitótica entre los marcadores empleados; o gemelas, si se derivan de recombinación entre el marcador proximal y el centrómero, el cual funciona como un tercer marcador (Graf *et al.*, 1984).

El uso de cromosomas portadores de múltiples inversiones permite balancear arreglos genéticos y evita recobrar eventos viables de recombinación. A partir de la cruce experimental se obtienen dos tipos de progenie en igual proporción: larvas libres de inversión y larvas portadoras de inversiones; los dos tipos de progenie no son distinguibles en estado de larva, por lo que ambas son tratadas.

Entre las ventajas que este sistema proporciona, se encuentran:

1. El efecto inducido se valora en una generación (10 días) y muestrea un número elevado de células por organismo.
2. Es posible distinguir entre compuestos directos e indirectos, ya que el tamaño de la mancha recobrada es un indicador del tiempo en que ocurrió la alteración. En ausencia de arresto y de muerte celular. Debido a que los compuestos indirectos requieren ser activados metabólicamente por el organismo para ser biotransformados a derivados reactivos, podrían producir manchas de tamaño menor (Zijlstra y Vogel, 1988a).
3. Es posible analizar la respuesta inducida entre hembras y machos, ya que aunque en los machos de *Drosophila* no se presenta de manera natural recombinación en sus células germinales, se ha encontrado que a nivel de células somáticas, los valores adjudicables a recombinación son similares en ambos sexos (Becker, 1976).
4. Es posible determinar la actividad recombinogénica de los compuestos evaluados al comparar la frecuencia de manchas inducidas entre la progenie con constitución trans-heteróciga, libre del cromosoma balanceador y la portadora del cromosoma balanceador (Graf *et al.*, 1984).
5. El material biológico se puede conservar fijado en etanol al 70%, para posteriormente ser procesado.
6. Es posible la verificación de los resultados, ya que las preparaciones que se elaboran con las alas de las moscas tratadas son permanentes.
7. Una de las aplicaciones exploradas en los últimos años, ha sido la detección de niveles ambientales de contaminación (Ramos *et al.*, 2001).

8. El análisis de los resultados ha sido complementado incluyendo la comparación entre el tamaño de mancha y el número de manchas por mosca entre las series experimentales y la testigo para descartar falsos positivos y negativos en muestras ambientales (Ramos *et al.*, 2001).

Con la finalidad de complementar la información obtenida mediante el análisis clásico de la prueba SMART, se ha incluido el análisis cualitativo de la distribución del:

- 1) tamaño de mancha; estima el número de divisiones celulares que se requieren para producir una mancha del tamaño recobrado y, en consecuencia, establece el tiempo en que se originó la mancha durante el desarrollo de la mosca (Graf, 1995; Ramos *et al.*, 1996). Este análisis permite descartar las respuestas falsas negativas, ya que la ausencia de efecto no debe interferir con el patrón de distribución del tamaño de mancha que se presenta en la serie testigo.

- 2) número de manchas por mosca; es una estimación de la diferente susceptibilidad que caracteriza a los individuos de una población. En el caso de *Drosophila*, mientras que algunas moscas no manifiestan manchas en sus alas, aún en presencia del agente genotóxico, otras muestran una, o incluso un número elevado de éstas. Es posible suponer que aquellos organismos con manchas múltiples representan algún sector particular de la población, el cual, por su sensibilidad puede ser sumamente útil en la detección de efectos tempranos en la toxicología genética (Islas Guzmán, 1996).

En resumen, el tipo y tamaño de las manchas inducidas por determinado compuesto químico puede ser indicador de la participación del

metabolismo en la reactividad del compuesto. De esta manera la comparación del tipo y tamaño de las manchas inducidas por compuestos directos e indirectos mostrará el tiempo requerido para que la biotransformación se lleve al cabo mediante el tamaño promedio de clase clonal.

Para evaluar la inducción de mutación somática y recombinación mitótica, se realizaron las siguientes cruza utilizando cepas estándar heterocigóticas para marcadores fenotípicos de los tricomas de las alas:

Cruza estándar (CE). Se emplearon dos líneas de *Drosophila melanogaster*: *flr³/In(3LR)TM3*, *y⁺ ri p^o sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^s* y *mwh/mwh*, de las cuales se obtuvieron hembras vírgenes (72 h de edad) y machos (48 h de edad), respectivamente. El marcador autosómico recesivo *mwh* (3.00) modifica la forma del pelo o tricoma produciendo tricomas múltiples (más de 2) por célula, a diferencia del fenotipo silvestre en el que se produce un tricoma por célula. El marcador autosómico recesivo *flr³* (3.39) es letal en condición homocigótica, sin embargo es viable en mosaicos somáticos produciendo tricomas amorfos con expresividad variable que van desde una mancha quitinosa sobre la superficie del ala hasta un tricoma en forma de flama, de donde recibe su nombre. Para balancear al marcador *flr³* se utiliza el cromosoma balanceador (*TM3, Bd^s*) el cual porta numerosas inversiones que impiden recobrar eventos de recombinación en las moscas portadoras y un marcador letal dominante, *Serrata (Ser)*. Los marcadores que porta son (Lindsley y Zimm, 1992; Greenspan, 2004):

y⁺: alelo silvestre de *yellow (y)*

ri: *knirⁱ⁻¹* = *knirps* (el alelo es sinónimo de *radius incompletus*), afecta la venación

p^p : pink peach, ojos café

$sep\ I(3)89Aa = vv|^{sep}$ esto habla del siguiente arreglo que forma parte del balanceador: $In(3LR)sep$

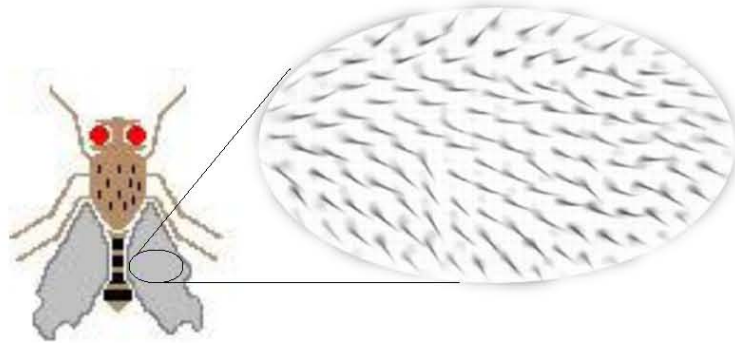
$bx^{bx^{34e}}$: bithorax, participa en la transformación de halterios a alas
e: ebony, cuerpo color ébano.

Bd^s : Beaded Serrata, alas con muescas en el borde posterior.

De esta cruce se obtienen dos tipos de progenie en igual proporción: larvas libres de inversión (+ flr^3/mwh +) y larvas portadoras de inversiones por la presencia del cromosoma balanceador TM3: (+ $TM3, Bd^s/mwh, +$), los dos tipos de progenie no son distinguibles en etapa de larva, por lo que ambas son expuestas al tratamiento. Las moscas adultas se distinguen fenotípicamente por la forma de las alas: silvestre (libres de inversión) y *Serrata* (portadoras de inversiones) (Figura 7).

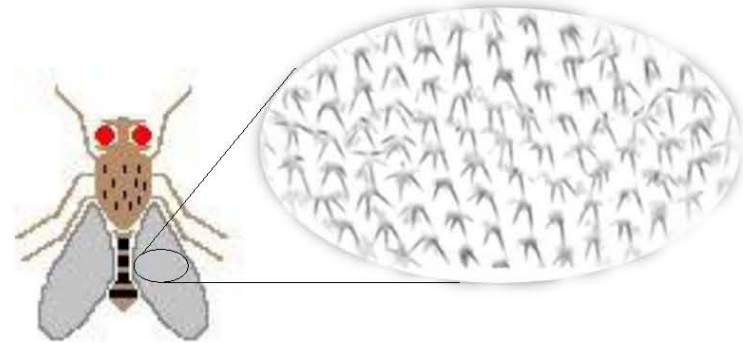
Cruza modificada (CM). Se diseñó con la finalidad de descartar la inducción de fenocopias: hembras $flr^3/In(3LR)TM3, ri\ p^p\ sep\ I(3)89Aa\ bx^{34e}$ e Bd^s y machos $mwh\ e / mwh\ e$. Se obtiene el mismo tipo de progenie que en la cruce 1, pero el uso del marcador para color de cuerpo ébano (e) mejora la clasificación fenotípica de la progenie portadora de inversiones, ya que éstas resultan homocigóticas para el marcador de color de cuerpo (Figura 8).

P ♀♀ *flr³ / TM3, ri p^p sep bx^{34e} e^s Bd^S*



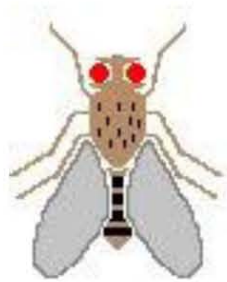
alas con tricomas silvestres y con muescas en el borde

♂♂ *mwh / mwh*

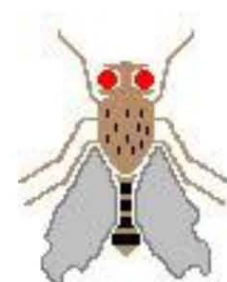


alas con tricomas múltiples y sin muescas en el borde

F₁



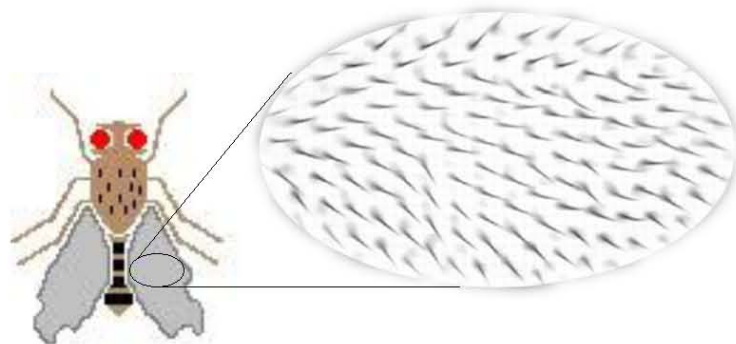
+, *flr³ / mwh*, +
moscas libres de inversiones
(alas sin muescas en el borde)



***TM3, ri p^p sep bx^{34e} e^s Bd^S / mwh*, +**
moscas portadoras de inversiones
(alas con muescas en el borde)

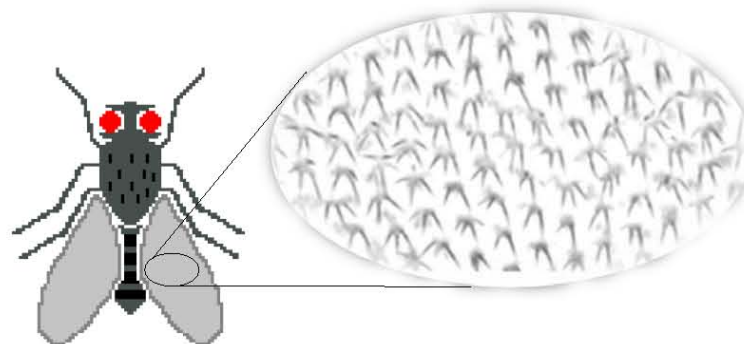
Figura 7. Cruza estándar (CE) utilizada en la evaluación de la inducción de Mutación Somática y Recombinación Mitótica (SMART) en *Drosophila melanogaster*.

P ♀♀ *flr³ / TM3, ri p^p sep bx^{34e} e^s Bd^S*



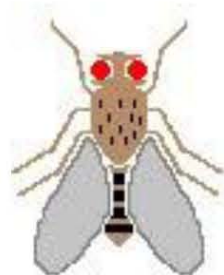
alas con tricomas silvestres y con muescas en el borde

♂♂ *mwh, e / mwh, e*



alas con tricomas múltiples, sin muescas en el borde; cuerpo ébano

F₁



+, flr³ / mwh e, +

moscas libres de inversiones

(alas sin muescas en el borde, cuerpo silvestre)



TM3, ri p^p sep bx^{34e} e^s Bd^S / mwh e, +

moscas portadoras de inversiones

(alas con muescas en el borde, cuerpo ébano)

Figura 8. Cruza modificada (CM) utilizada para la identificación de fenocopias en la evaluación de la inducción de Mutación Somática y Recombinación Mitótica (SMART) en *Drosophila melanogaster*.

En los adultos, las alteraciones producidas durante el desarrollo larvario se observan como manchas mutantes en un contexto de tricomas silvestres. Se ha determinado que el número de manchas mutantes recobradas es un estimador del total de eventos inducidos (Graf *et al.*, 1984). En ambos casos, se comparó la frecuencia de manchas por ala y la dispersión en las distribuciones del número de células por mancha y de manchas por mosca, en moscas libres y portadoras de múltiples inversiones.

Tratamientos

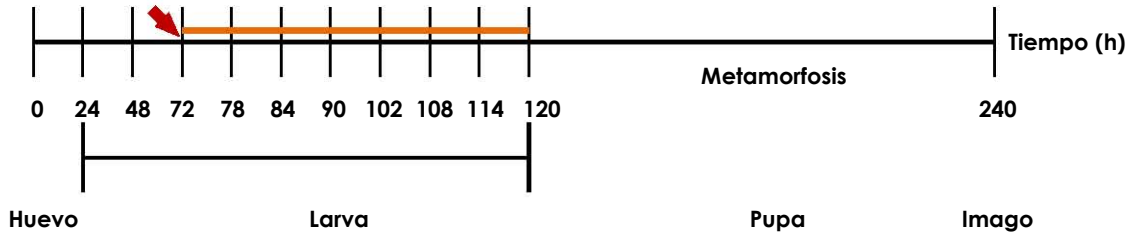
De manera rutinaria, los protocolos contemplan una edad de los organismos en la que la exposición al compuesto no represente un factor que interfiera en la respuesta evaluada, la cual se denomina semicrónica o prolongada:

Una variante a este protocolo lo representa la exposición interrumpida, con la cual es posible detectar periodos fenocríticos en los que los organismos manifiestan daño que está relacionado con la intensidad de la exposición y la edad de su desarrollo. Otro aspecto interesante es el que ayuda a esclarecer respuestas de compuestos falsos negativos y falsos positivos.

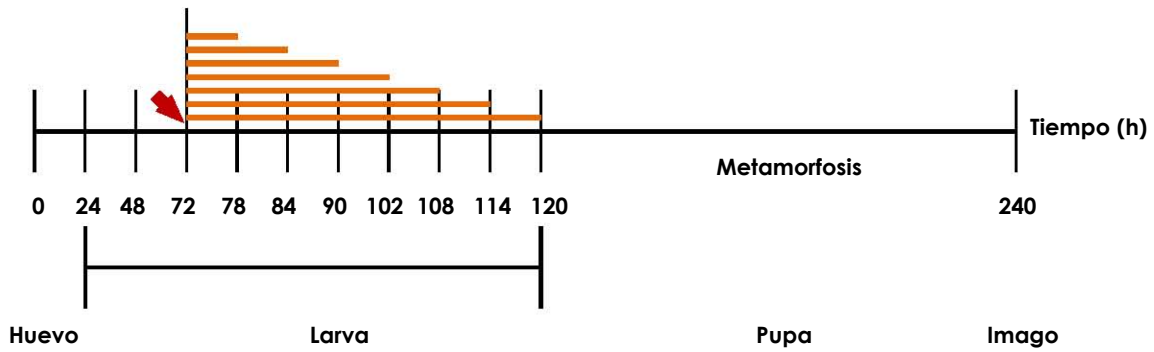
A continuación se describe los dos tipos de exposición utilizados:

1) Prolongada. Larvas de 72 ± 4 h fueron alimentadas durante 48 h con 1 g de medio de cultivo instantáneo Carolina (Fórmula 4-24, Carolina) adicionado con 4.5 mL de las diferentes concentraciones a probar de los compuestos. Las larvas permanecieron en este medio hasta que entraron a metamorfosis y emergieron como moscas adultas (Figura 9a). Esta exposición se utilizó para CO e HC. La VB fue administrada en medio líquido. Las concentraciones probadas fueron: [2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.0315 mM]

a) Exposición Prolongada



b) Exposición Interrumpida



- Inicio del tratamiento semicrónico a [0.125] mM de CO o VB.
- Duración de la exposición en viales con medio de cultivo.

Figura 9. Tipos de exposición utilizados en la curva tiempo de exposición-efecto (CE y CM) a [0.125 mM] de CO y VB. a) Prolongada; b) Interrumpida.

2) Interrumpida. Larvas de 72 ± 4 h en grupos de 100 -150 se colocaron en 18 tubos homeopáticos que contenían medio de cultivo fresco (elaborado con agar, harina de maíz, azúcar, levadura activa y desamargada, nipagin al 10% disuelto en alcohol etílico absoluto y ácido propiónico) enriquecido antes de la solidificación, a 60° C con 0.25 mL de agua destilada (testigo) o con colchicina [0.125 mM]. Cada 6 h se retiró un tubo con larvas testigo y uno con larvas tratadas, de manera que al final se tuvieron exposiciones de 6, 12, 18, 24 ... 48 h (curva tiempo de exposición-efecto) (Muñoz, 1997). Las larvas retiradas en cada intervalo de tratamiento se enjuagaron con agua corriente y se transfirieron a frascos con medio de cultivo fresco en los que concluyeron su desarrollo (Figura 9b).

Obtención de larvas

Para descartar que la heterogeneidad en la edad de los organismos expuestos a los diferentes tratamientos interfiera en la respuesta obtenida, cada una de las cruas maduras (organismos progenitores) realizadas para los diferentes protocolos, se transfirieron de manera independiente a frascos con medio fresco para recolectar huevos durante un período de 8 horas (Graf *et al.*, 1992). Al tercer día, se procedió según Nöthinger (1970) a separar las larvas del medio de cultivo por flotación mediante una solución concentrada de sacarosa al 20%. La solución azucarada se vertió en un embudo de separación de 4 mm de diámetro y las larvas se recuperaron sobre una gasa fina de nylon. Con la ayuda de una espátula se colocaron grupos de 100 a 150 larvas en tubos homeopáticos que contenían medio de cultivo instantáneo Carolina (Fórmula 4-24 Plain, Carolina Biological Supply Company) adicionado con las diferentes concentraciones de los compuestos a evaluar (Figura 11).

Fijación y elaboración de laminillas

Para el análisis de la inducción de mutación somática y recombinación mitótica, los adultos obtenidos por separado de la exposición a larvas provenientes de la craza estándar (CE) y de la craza modificada (CM), se sacrificaron por exceso de anestesia y se fijaron en alcohol al 70%.

Las alas de 10 hembras y de 10 machos recobrados a partir de los diferentes protocolos de exposición, fueron montadas por pares en un portaobjetos con solución Faurè (Graf *et al.*, 1984). Las laminillas se elaboraron por concentración para cada tipo de progenie: libres de inversión (fenotipo silvestre) y portadoras de inversiones (alas con muescas en los bordes para la craza estándar, CE; o cuerpo color ébano y muescas en los bordes de las alas para la craza modificada, CM).

Posteriormente se analizaron al microscopio óptico a un aumento de 400X. El registro de manchas se realizó según su localización en el sector del ala. Las manchas se clasificaron según su tamaño en chicas (de 1 a 2 células) y grandes (> 2 células), y por su fenotipo en manchas simples *mwh*, manchas simples *flr³* y manchas gemelas, formadas por células adyacentes con los dos fenotipos indicados (Graf *et al.*, 1984) (Figura 10).

Criterios para el registro de las manchas

En algunas ocasiones surgen células con dos tricomas, esto puede deberse a alteraciones en la diferenciación celular que no corresponden a expresiones típicas de *mwh* por lo que, para evitar errores en la clasificación, las manchas de dos pelos se cuantifican como expresiones *mwh* sólo cuando forman parte de una mancha en la que al menos se encuentra una célula *mwh* con tres o más tricomas (Graf *et al.*, 1984). Las

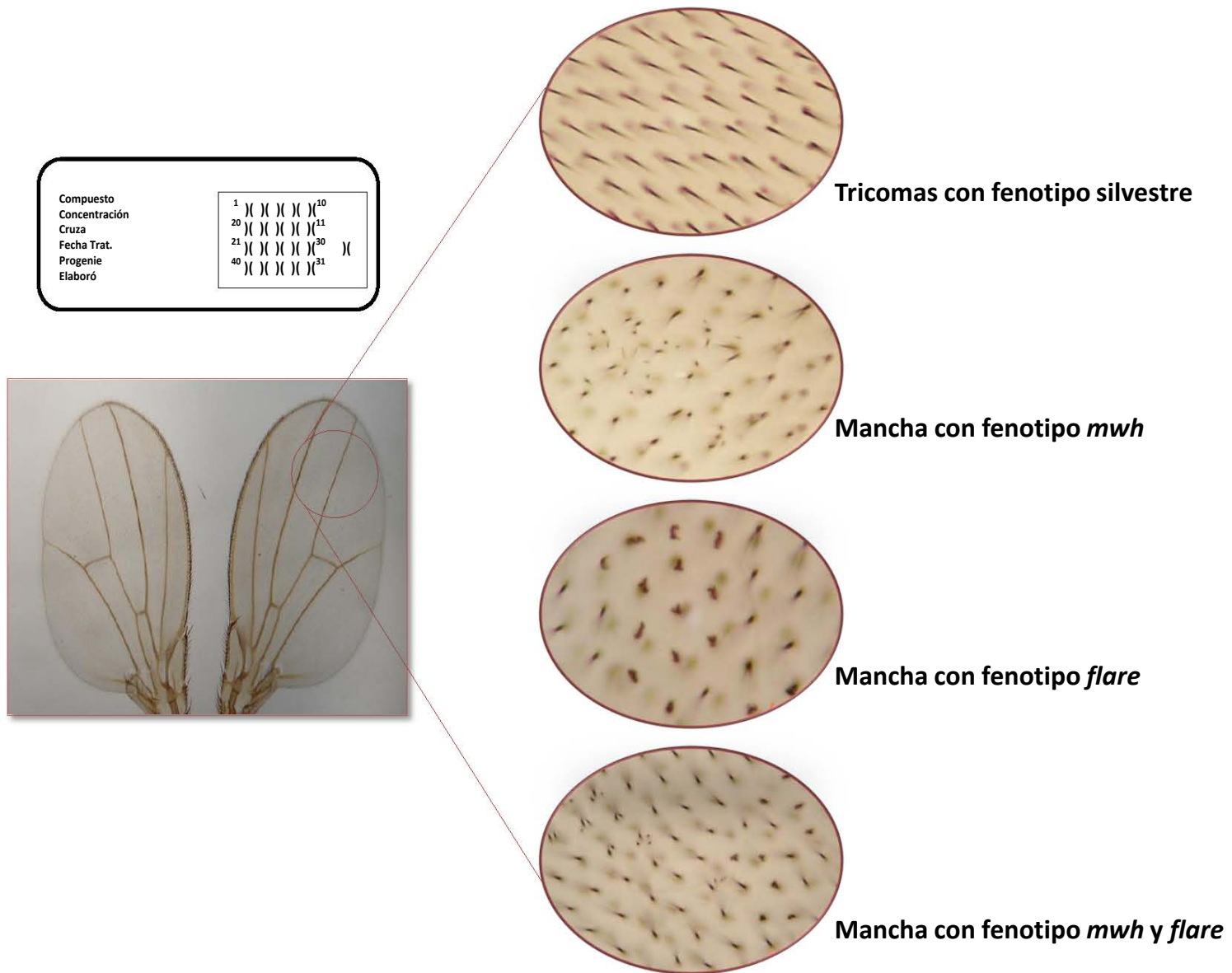


Figura 10. Fenotipo de las manchas registradas para la evaluación de la inducción de Mutación Somática y Recombinación Mitótica en *Drosophila melanogaster*.

manchas grandes tienen una forma elongada en la dirección del eje longitudinal del ala y pueden presentar forma de Z. Aunque la mayoría de las manchas son continuas, en ocasiones se pueden presentar hileras de tricomas silvestres entre una mancha, probablemente debido a la separación parcial de las células del clon durante el desarrollo por presiones tisulares o movimientos celulares independientes (García Bellido y Merriam, 1971). Para la valoración de este tipo de manchas y con base en los criterios utilizados por Graf *et al.*, (1984) se contaron como manchas independientes aquellas que se encontraban separadas por tres o más hileras de tricomas regulares.

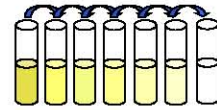
Análisis Estadístico

Los datos registrados para la inducción de mutación somática y recombinación mitótica se procesaron con la ayuda del programa de cómputo SMART (Würgler 1988 no publicado), y el procedimiento de decisión múltiple de Frei y Würgler (1988), con un nivel de significancia del 95%. La decisión se basa en el contraste de dos hipótesis.

La hipótesis nula (H_0), señala que no hay diferencias en la frecuencia de mutación entre las series testigo y las tratadas. Si en estas últimas, la frecuencia se incrementa de manera significativa, la H_0 se rechaza. Por otro lado, la hipótesis alternativa (H_a), postula que en las series tratadas hay un incremento estadístico igual a " m " veces la frecuencia basal. Dado que la frecuencia de manchas sencillas de menos de tres células y de manchas totales, es mucho mayor que la frecuencia de manchas simples, de más de tres células y la de manchas gemelas, se utiliza $m=2$ para las primeras y $m=5$ para las últimas.

1. Preparación de diluciones sucesivas.

Agua destilada y alcohol al 5% = disolventes y testigos negativos.



[C₁.....C_n] mM

2. De manera independiente para cada una de las cruas, se colectaron huevos por un periodo de 8 h.

3. A las 72 h posteriores, se recuperaron a las larvas mediante el método de Nöttingher (1970).



4. Grupos de aprox. 100 larvas se colocaron en viales con medio instantáneo Carolina enriquecido con las diferentes concentraciones de los compuestos a evaluar.



E= prolongada (48 h) o interrumpida (intervalos de 6 h)

5. Los organismos adultos recobrados de los diferentes protocolos fueron clasificados con base en el fenotipo y se registraron los biomarcadores correspondientes.

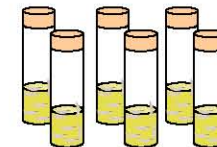


Figura 11. Diseño experimental utilizado en la evaluación del efecto inducido por tres compuestos citostáticos en *Drosophila melanogaster*.

La aplicación de éste análisis estadístico puede llevar a cuatro tipos de resultados (Tabla IV): si no se rechaza la H_0 y se rechaza la H_a el resultado es negativo (-); si se rechaza la H_0 y no se rechaza la H_a , el resultado es positivo (+), si las dos hipótesis se rechazan, el resultado se considera débil positivo (w) y si ambas hipótesis no se rechazan, el resultado es indeterminado.

Tabla IV. Diagnóstico estadístico del procedimiento de decisión múltiple de Frei y Würzler (1988).

Hipótesis	No se rechaza H_a	No se rechaza H_a
No se rechaza H_0	Indeterminado (i)	Negativo (-)
Se rechaza H_0	Positivo (+)	Débil positivo (w)

Prueba de U de Mann-Whitney

Para analizar la dispersión en la distribución del número de manchas por mosca y el número de células por mancha se utilizó esta prueba no paramétrica que se basa en la comparación de los rangos en los que se presentan las observaciones y requiere solo la información de la prueba de la mediana. La distribución se modificó cuando se encontraron diferencias significativas a una $p < 0.05$.

Se sustenta en las siguientes suposiciones:

- 1) Los dos tratamientos, de tamaños **n** y **m** respectivamente, que se utilizan para el análisis son extraídos independientemente de sus poblaciones.
- 2) La escala de medición es por lo menos ordinal.

- 3) Las poblaciones son diferentes sólo en lo que respecta a sus medianas.

La prueba se basa en el contraste de las siguientes hipótesis, lo que depende de la información que se tenga con respecto al efecto del tratamiento bajo análisis:

- a) Hipótesis nula (H_0): las Z poblacionales tienen medianas iguales. H_0 : **A** y **B** tienen la misma distribución.
- b) H_a : Las poblaciones no tienen medianas iguales, n_1 es diferente de **n_2** .
- c) H_a : La mediana de la población $P >$ que la mediana de la población **Z** .
- d) H_a : La mediana de la población $P <$ que la mediana de la población **Z** .

ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La capacidad de *Drosophila melanogaster* para detectar aneuploidógenos en células germinales ha sido evaluada desde hace años (Baker y Carpenter, 1972; Boyd *et al.*, 1976; Würgler *et al.*, 1982; Würgler y Vogel, 1986; Boyd *et al.*, 1987), sin embargo, con excepción de los estudios citogenéticos, no se dispone de metodologías experimentales para detectar el efecto de aneuploidógenos en células somáticas *in vivo*. Asimismo, es deseable que estas metodologías reúnan una serie de características que a su vez incrementan las expectativas de su uso y, por lo tanto, su valor específico como sistema de bioensayo. Entre éstas, la posibilidad de discriminar la presencia de artefactos que conduzcan a un diagnóstico equivocado (efecto positivo falso o negativo falso) y el uso de biomarcadores colaterales que identifiquen efectos tempranos -aún por debajo del efecto estadístico-, que contribuyan a establecer el efecto de bajas concentraciones de genotóxicos potenciales, resultan esenciales en la determinación del daño genético.

Por otro lado, en la inducción de efectos tóxicos, mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos, se asume por lo general una relación dosis-respuesta, es decir, el aumento en la dosis administrada de un compuesto con actividad genotóxica se asocia con un incremento en los efectos provocados, mismos que pueden ser cuantificables (Pfitzer y Vouk, 1986). En el caso particular de *Drosophila*, se ha visto que la sensibilidad que muestra el sistema para responder al daño inducido por diferentes compuestos incluyendo los aneuploidógenos, se ve favorecida al emplear bajas concentraciones.

Para comparar la actividad de tres compuestos citostáticos se analizó la frecuencia de inducción de manchas (chicas, grandes, gemelas y totales). Para estimar la participación de la recombinación mitótica se comparó, además, la

frecuencia de manchas inducidas por la CO entre moscas libres y portadoras de múltiples inversiones, lo que impide recobrar eventos viables de recombinación.

La tabla VI presenta los resultados obtenidos para la frecuencia corregida de manchas totales obtenida para los diferentes compuestos.

En la figura 12 (a, b) se compara la frecuencia corregida de manchas totales obtenida para los compuestos de referencia utilizados: NaN_3 y NDMA. Para la NDMA la respuesta fue significativa en todas las concentraciones, y mayor en las moscas libres de inversiones que en las moscas portadoras de inversiones. La respuesta obtenida muestra una relación directa con la concentración y en el aumento en la frecuencia de manchas la recombinación también está involucrada.

En el caso de NaN_3 , se puede observar que el aumento en la frecuencia de manchas es significativo en todas las concentraciones, pero sólo en moscas libres de inversiones, confirmando que la NaN_3 induce recombinación por rompimiento.

La figura 13 muestra la frecuencia corregida para los tres compuestos citostáticos. En todos los casos las moscas libres de inversión y las portadoras de inversiones respondieron de diferente manera al tratamiento aunque sin guardar relación con la concentración.

El tratamiento con CO, elevó la frecuencia total de manchas en las moscas libres de inversión expuestas a 0.063, 0.125 y 2.0 mM. No se recuperaron moscas libres de inversión a 0.032 mM. En las portadoras de inversiones, la frecuencia de manchas totales mostró cambios significativos de 0.032 a 0.5 mM, con

excepción de las series expuestas a 0.125 y 1 mM. No se recobraron moscas a 2 mM. La CO parece tener una débil actividad mutagénica la cual además podría implicar la participación de recombinación mitótica.

En el tratamiento con HC, la respuesta fue significativa para la frecuencia de manchas totales a la concentración de 1.0 mM en moscas libres de inversiones y a 2.0 mM en moscas portadoras. Este compuesto mostró actividad recombinogénica inducida por el efecto clastogénico.

Después del tratamiento con VB, las moscas libres de inversión, mostraron una respuesta positiva a 0.125 y 0.25 mM para manchas totales. En las moscas portadoras de inversiones, se incrementó la frecuencia de manchas totales, siendo significativa a 0.032, 0.125 hasta 0.5 mM. Con este compuesto, prácticamente en todas las concentraciones (excepto a 0.125 mM), la frecuencia corregida de manchas de las moscas portadoras de inversiones fue mayor que la de las moscas libres de inversión (Figura 13). No se recobraron organismos en las concentraciones de 1.0 y 2.0 mM. La VB mostró actividad mutagénica que no parece depender exclusivamente de la recombinación mitótica.

Tamaño de mancha

En moscas no expuestas a genotóxicos, la aparición de manchas representa un evento más bien raro. Cuando aparecen, la mayoría de las manchas son de 1 a 2 células, aunque ocasionalmente se presentan algunas formadas por un número mayor de células, lo cual ocurre con una frecuencia muy baja. Entre los efectos tempranos de la exposición a compuestos genotóxicos está el tamaño de las manchas recobradas, el cual tiende a ser mayor, aún antes de que la frecuencia de manchas sea modificada.

Al comparar la distribución del número de células por mancha de los dos tipos de progenie se observó que las moscas libres de inversión tratadas con CO mostraron manchas de mayor tamaño que las portadoras de inversiones (Fig. 14). El HC indujo manchas de mayor tamaño básicamente en las moscas libres de inversión (Fig. 16). La figura 18, muestra la distribución de las manchas recobradas con respecto a su tamaño después del tratamiento con VB en las moscas portadoras de inversión el efecto del tratamiento se observó a partir de 0.125 mM donde se recobraron manchas de tamaño claramente mayor que las testigo, este efecto no se observó en las moscas libres de inversión, que produjeron manchas de menor tamaño y en una frecuencia menor a las de la serie testigo.

Manchas por mosca

En el caso de la CO, se confirmaron diferencias en la distribución del número de manchas por mosca entre las series 0.063 vs 0.5 mM ($P < 0.05$), 0.125 mM vs. 0.5 mM ($P < 0.001$) y vs. 1.0 mM ($P < 0.05$), para moscas libres de inversión y entre testigo y 0.25 mM ($P < 0.05$), en las portadoras de inversiones (Fig. 15). La distribución del número de manchas por mosca en las series expuestas a HC fue similar a la del testigo en ambos tipos de progenie (Fig. 17). La fig. 19, muestra que en moscas libres de inversiones, las manchas recobradas en el tratamiento con VB se distribuyeron de manera similar en las moscas testigo y las expuestas a 0.063 y 0.5 mM, en el resto de las concentraciones se recobraron moscas con 4 o más manchas. En las portadoras del balanceador, la fracción de moscas sin manchas fue menor y se recobraron individuos hasta con 12 manchas cada uno (Fig. 19b).

Un aspecto que llama la atención es la mayor proporción de moscas portadoras de inversión que se recobraron en todos los tratamientos. Este comportamiento no es habitual ya que se espera que los dos tipos de progenie se obtengan en

igual proporción, aunque por lo común la proporción de moscas libres de inversión es ligeramente mayor. Ahora bien, es poco probable que un organismo en el que la homología entre sus cromosomas se ha alterado por la presencia de inversiones múltiples tengan mayor capacidad de respuesta ante la genotoxicidad de los compuestos probados, por lo que existe la posibilidad de que la disminución en el número recobrado de organismos silvestres, observada en los tratamientos previos y en los reportados por Zordan (1989) pudieran ser aparentes o bien, un artefacto producto del efecto de este grupo de compuestos en el desarrollo de las moscas.

Por otro lado, debido a que en las moscas portadoras de inversiones no puede asumirse a la recombinación como un posible origen de las manchas, éstas deberían explicarse, al menos en parte, por cierta actividad mutagénica, aunque también se ha supuesto que algunas podrían ser producto de errores en la disyunción –en algunos casos, la pérdida de la heterocigosis derivaría en la expresión del marcador recesivo-.

Efecto del tiempo en la exposición

Con la finalidad de analizar con más detalle el efecto de la CO (débil actividad mutagénica con posible participación de recombinación mitótica) y de la VB (actividad mutagénica no dependiente exclusivamente de la recombinación mitótica), se procedió a obtener una curva del tiempo de exposición-efecto, con lo que se esperaba obtener elementos adicionales que permitieran explicar la mayor proporción recobrada de moscas portadoras de inversiones.

Se seleccionó la concentración de 0.125 mM que en los tratamientos subcrónicos mostró incrementar la frecuencia de manchas en ambos tipos de moscas, proficientes (libres de inversión) y deficientes (portadoras del cromosoma TM3, Ser) en recombinación.

La tabla VII muestra los resultados obtenidos en los diferentes tiempos de exposición con ambos compuestos. Nuevamente en estos experimentos se recobró una mayor respuesta de las moscas portadoras de inversiones que en las libres de inversión. En el tratamiento con CO [0.125 mM], sólo se recobraron moscas libres de inversión a las 6, 12 y 18 h de exposición; de éstas, sólo en las moscas expuestas por 12 h se incrementó la frecuencia de manchas totales ($p < 0.05$). En las moscas portadoras de inversiones, no se recobraron moscas a las 6 h de exposición, pero sí en los tiempos restantes.

A las 6 horas de iniciado el tratamiento con VB, no se recuperaron moscas adultas de ningún tipo. En todos los periodos de exposición siguientes, la frecuencia de manchas recobradas fue mayor que la del testigo, siendo el incremento significativo a las 30 y 36 h de exposición para la suma de todas las manchas y a las 36 h para las manchas chicas, en este período se observó la mayor inducción de manchas. En las moscas portadoras de inversiones se incrementó la frecuencia de manchas totales en todos los tiempos de exposición ($p < 0.05$).

Las figuras 20 y 22 muestran que con ambos compuestos se recobran manchas de mayor tamaño que sus testigos correspondientes. El tamaño de la mancha es menor conforme el tiempo de exposición se prolonga. Con VB, ambos tipos de progenie muestran distribuciones parecidas, pero con CO, a partir de las 24 h de exposición, sólo en las moscas portadoras de inversiones se recobran manchas.

Conforme la exposición al compuesto se prolongó, se recobraron más manchas por mosca en ambos tipos de moscas (Fig. 21 y 23), pero sólo se confirmaron diferencias entre las distribuciones provenientes de las moscas testigo portadoras de inversiones y las expuestas durante 36 h a la VB ($p < 0.015$). Con

la CO, sólo se recobraron moscas libres de inversiones hasta las 18 h de exposición mientras que la distribución del número de manchas por mosca para las moscas portadoras de inversiones mostró resultados en todos los tiempos estudiados.

Los resultados obtenidos en la curva con VB apoyan los reportados por Zordan *et al.* (1989) para este compuesto en células somáticas de las alas de *Drosophila*, quien planteó la posibilidad de una respuesta diferencial a la genotoxicidad de este compuesto dependiente del genotipo de las moscas. Además, la respuesta obtenida en la curva con CO indica que el efecto observado no es producido únicamente por la VB.

Cabe aclarar que aunque las moscas portadoras de inversiones no presentan genes que interfieran con el proceso de recombinación mitótica, las múltiples inversiones mediante las que se construyen los cromosomas balanceadores evitan recobrar eventos de recombinación que pudieran producirse, tanto de manera espontánea como inducidos por el tratamiento, por lo que el efecto neto en el proceso es la ausencia de recombinación. Otro aspecto interesante es que se ha determinado que en aquellos organismos en los que se interfiere con la recombinación meiótica se recobran niveles incrementados de no-disyunción, y que, al menos en células germinales de *Drosophila*, el reconocimiento de secuencias homólogas prelude una adecuada segregación de los cromosomas durante la formación de las células sexuales (Hawley *et al.*, 1993). En células somáticas no se ha identificado la formación de una estructura que se relacione particularmente con el reconocimiento de homólogos, como es el complejo sinaptonémico en células sexuales, sin embargo, parece ser que la constitución genética de las moscas portadoras con múltiples inversiones interfiere de manera similar con el reconocimiento de homólogos y, en consecuencia con la adecuada segregación de éstos, lo que se manifiesta en

general, por manchas formadas predominantemente por un número bajo de células, lo que apoyaría su baja capacidad proliferante si es que ésta es el resultado de la segregación anormal de los cromosomas homólogos durante la mitosis.

Además, es poco probable que un organismo en el que se ha alterado la capacidad de reconocimiento de homología no muestre efecto en las funciones asociadas con los genes involucrados como puede ser: metabolismo, reparación, longevidad, y funciones como la segregación de los cromosomas, entre otros. Existe la posibilidad de que la disminución en el número recobrado de organismos silvestres, observada en los tratamientos previos y en los reportados por Zordan (1989) pudiera ser aparente.

Los resultados obtenidos en la curva tiempo de exposición-efecto mostraron un comportamiento similar con respecto a una mayor proporción de moscas con fenotipo *Serrata* (portadoras de inversiones) que de silvestres (libres de inversiones), llegando incluso a no recobrase progenie silvestre a partir de las 24 h de exposición (larvas de 96 h).

Efecto de la clasificación de los organismos

Con base en los resultados obtenidos hasta este momento y con la finalidad de explicar la mayor sobrevivencia de organismos portadores de inversiones, se decidió obtener nuevamente la curva de tiempo de exposición-efecto utilizando un sistema de cruce alternativo (CM): hembras *flr³/In(3LR)TM3, rip^{psepl(3)89Aabx³⁴eBd^s}* y machos *mwh e / mwh e*. De esta cruce se obtiene el mismo tipo de progenie que en la cruce estándar (CE), pero el uso del marcador para color de cuerpo *ebony (e)* en los machos mejora la clasificación fenotípica de la progenie portadora de inversiones, ya que en éstas se encontrará en condición homocigota, mientras que las moscas libres de inversión serán

heterocigóticas y por lo tanto tendrán el color del cuerpo silvestre (pardo). De esta manera la progenie portadora del balanceador tendrá ahora la muesca característica en las alas y el color de cuerpo ébano.

Mediante el uso de este segundo marcador fue posible discriminar confiablemente el genotipo de la progenie (Tabla VIII). En las moscas libres de inversión se incrementó de manera significativa la frecuencia de manchas chicas a las 12, 30 y 42 h de exposición; la de grandes a las 24 y la de manchas totales a las 12 y de las 24 a las 42 h de exposición al compuesto. En las moscas portadoras de inversiones se incrementó la frecuencia de manchas grandes a las 18 y 24 h de exposición, pero la de manchas totales sólo a las 30 h de exposición; sólo a las 36 h se obtuvo una frecuencia por debajo de la frecuencia testigo. La figura 24 muestra la frecuencia de manchas totales recobrada en ambos tipos de progenie. Una vez descartadas las fenocopias, el incremento en la frecuencia de manchas resultó mayor en las moscas libres de inversiones. La comparación de la distribución de las manchas por tamaño (figura 25) mostró que la CO tiene capacidad para inducir manchas al poco tiempo de iniciado el tratamiento en ambos tipos de progenie. La comparación del número de manchas por mosca mostró que las moscas libres de inversión presentaron un número mayor de manchas que las portadoras del balanceador (figura 26).

De manera colateral se observó que los tratamientos interrumpidos con VB y CO produjeron, además de la respuesta genotóxica diferencial, gran cantidad de malformaciones en cabeza, ojos, proboscis, tórax y abdomen en un número significativo (los datos no se incluyeron porque se requiere un planteamiento metodológico particular para estimar adecuadamente la aparición de estos eventos y en este caso la metodología aplicada es válida sólo para cuantificar mutación y recombinación somáticas). El número de organismos afectados

alcanzó un máximo alrededor de las 24-36 h de tratamiento y disminuyó en los tratamientos de 48 h, lo que sugiere que en los experimentos anteriores no se habían recobrado estos organismos porque morían en la etapa de pupa, es decir, no completan su desarrollo.

En 1991, Lynch *et al.*, proponen utilizar a *Drosophila* como modelo para evaluar teratógenos. Mediante la observación de organismos tratados con agentes inductores de malformaciones, cuantificaron las alteraciones morfológicas inducidas, las cuales consisten en modificación en la forma del ojo, de redondo a lobulado y de tamaño reducido; la presencia de cerdas dobladas o tipo *bent*, alteración en la cual las cerdas humerales normalmente rectas y en número de 2, se doblan en un ángulo de 45 grados y puede aparecer 1 o 3 de éstas; abdomen con segmentos mal fusionados, alas tipo *Notch*, que provocan la formación de una muesca en el borde de las alas de manera similar a las producidas por el gen *Serrata*, alteraciones en el número de segmentos del cuerpo, ausencia de 1 o las 2 alas o los halterios y otras más. Con base en los resultados registrados reportaron que la frecuencia de las alteraciones se encuentra asociada con la concentración del teratógeno utilizada.

La aparición de malformaciones se han descrito en asociación con el efecto de aneuploidógenos durante el desarrollo embrionario de mamíferos (Parry y Sors, 1993) y en *Drosophila* (Muñoz, 1997; Muñoz *et al.*, 2002), por lo que los resultados del presente trabajo muestran que en *Drosophila* es probable que estos compuestos también alteren la diferenciación celular que ocurre durante la metamorfosis de este insecto.

En el presente trabajo se mostró que mediante el empleo del marcador para color del cuerpo ébano, se puede discriminar la proporción de fenocopias inducidas, lo cual concuerda con los resultados reportados para compuestos

con actividad aneuploidogénica (Muñoz *et al.*, 2008). De esta manera se explica parcialmente la mayor sensibilidad encontrada. Sin embargo, no excluye la relación entre recombinación y no-disyunción. Otro aspecto importante, es el hecho de que este gene se localiza en el grupo de complementación 3R con posición cercana a genes de la superfamilia P450, relacionados con el metabolismo de xenobióticos. Por otro lado, al ser *ebony*, un gen pleiotropico, se ha reportado que influye en diversas características como metabolismo, patrones de pigmentación y en la respuesta a estímulos luminosos, entre otras (Wittkopp *et al.*, 2002). Con base en lo anterior, se considera indispensable recurrir al uso de este marcador para realizar una clasificación confiable de los organismos con la finalidad de reducir la posibilidad de un diagnóstico equivocado.

Lo anterior abre la posibilidad de utilizar a *Drosophila* formalmente en el análisis del efecto *in vivo* de estos compuestos y otros que afectan la diferenciación celular.

Conclusiones

1. *Drosophila* fue sensible al efecto inducido por compuestos citostáticos.
2. En *Drosophila* los compuestos mostraron el siguiente comportamiento: CO, débil actividad mutagénica con posible participación de recombinación; HC, actividad recombinogénica inducida por el efecto clastogénico; VB, actividad mutagénica que no parece depender exclusivamente de la recombinación mitótica.
3. En *Drosophila*, un efecto asociado con la exposición a aneuploidógenos es la formación de una muesca en las alas, lo que podría considerarse una herramienta adicional para identificar compuestos con este tipo de actividad.
4. La disminución en la progenie + *flr³/mwh* + a tiempos de exposición prolongados podría explicarse por la inducción de efectos teratogénicos.
5. El uso del marcador *ebony* permite discriminar entre la progenie portadora de inversiones múltiples y las fenocopias inducidas.
6. Los resultados obtenidos indican que en *Drosophila melanogaster* la presencia de inversiones múltiples no confiere ventaja ante la genotoxicidad de los compuestos probados.

Tabla VI. Frecuencia corregida de manchas totales obtenida a partir de larvas de *Drosophila* expuestas a diferentes compuestos.

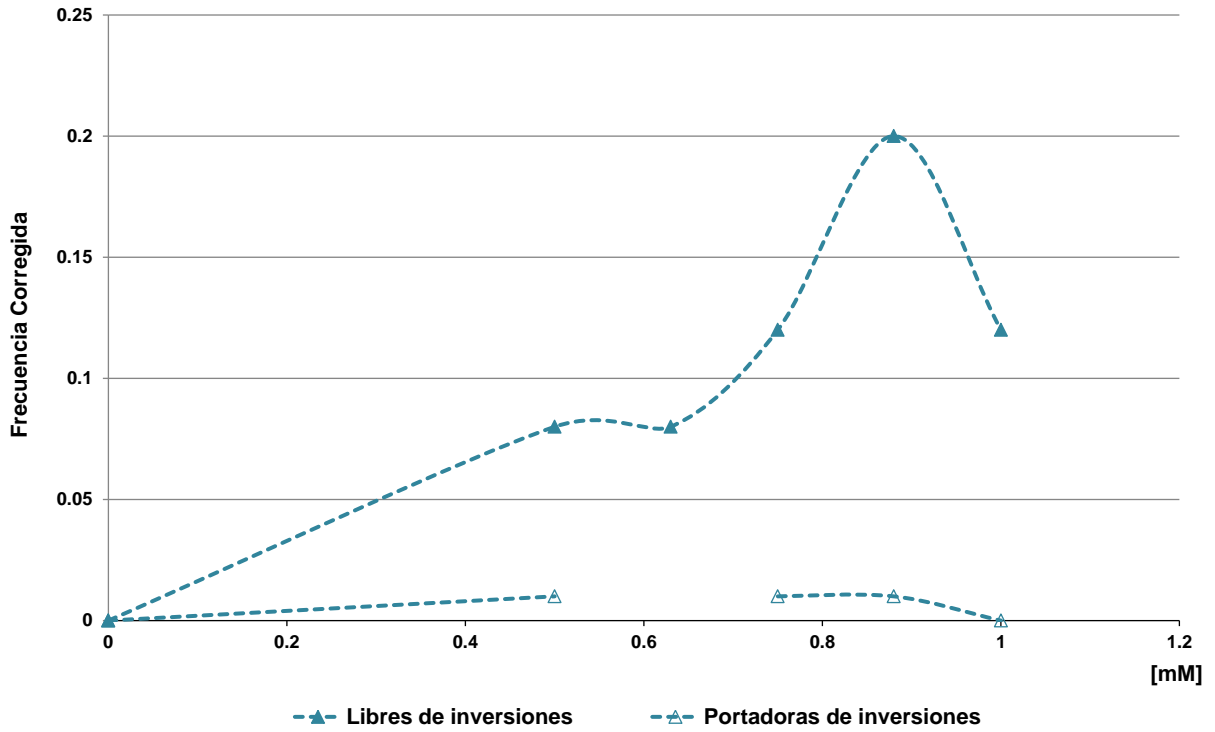
	[mM]	Libres de inversiones			Portadoras de inversiones		
		N	FT	FC	N	FT	FC
DMN	0	80	0.22	0	80	0.24	0
	0.019	80	1.55+	1.33	78	0.29	0.05
	0.153	66	5.89+	4.34	58	1.29+	1
NaN3*	0	118	0.20	0	122	0.11	0
	0.5	120	0.40+	0.08	120	0.12	0.01
	0.63	120	0.47+	0.08			-0.11
	0.75	120	0.71+	0.12	120	0.12	0.01
	0.88	120	0.84+	0.2	120	0.12	0.01
	1	116	0.89+	0.12	80	0.11	0
CO	0	120	0.34	0	120	0.17	0
	0.032	0			40	0.35+	0.18
	0.063	40	0.55+	0.21	40	0.45+	0.28
	0.125	40	0.55+	0.21	40	0.22	0.05
	0.25	40	0.22	-0.12	40	0.57+	0.4
	0.5	80	0.17	-0.17	80	0.37+	0.2
	1	80	0.22	-0.12	40	0.12	-0.05
	2	14	0.71+	0.37	0		
HC	0	120	0.34	0	120	0.17	0
	0.032	40	0.37	0.03	40	0.2	0.03
	0.063	40	0.40	0.06	40	0.28	0.11
	0.125	40	0.28	-0.06	40	0.22	0.05
	0.25	40	0.47	0.13	40	0.1	-0.07
	0.5	40	0.47	0.13	40	0.12	-0.13
	1	40	0.75+	0.41	40	0.1	-0.05
	2	40	0.43	0.09	40	0.35+	0.18
VB**	0	80	0.26	0	80	0.2	0
	0.032	80	0.28	0.02	80	0.35+	0.15
	0.063	80	0.19	-0.07	66	0.3	0.1
	0.125	52	0.50+	0.24	80	0.38+	0.18
	0.25	42	0.48+	0.22	40	0.45+	0.25
	0.5	42	0.23	-0.03	48	0.67+	0.47
	1	0			0		
	2	0			0		

N, Número de alas analizado; FT = Frecuencia Total; FC = Frecuencia Total Corregida. Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988). $\alpha = \beta = 0.05$. +, positivo; prueba de dos colas.

*Datos tomados de González-César y Ramos-Morales, 1997.

** Se utilizó alcohol etílico al 5% como disolvente y testigo negativo.

a) Azida de Sodio



b) N-nitrosodimetilamina

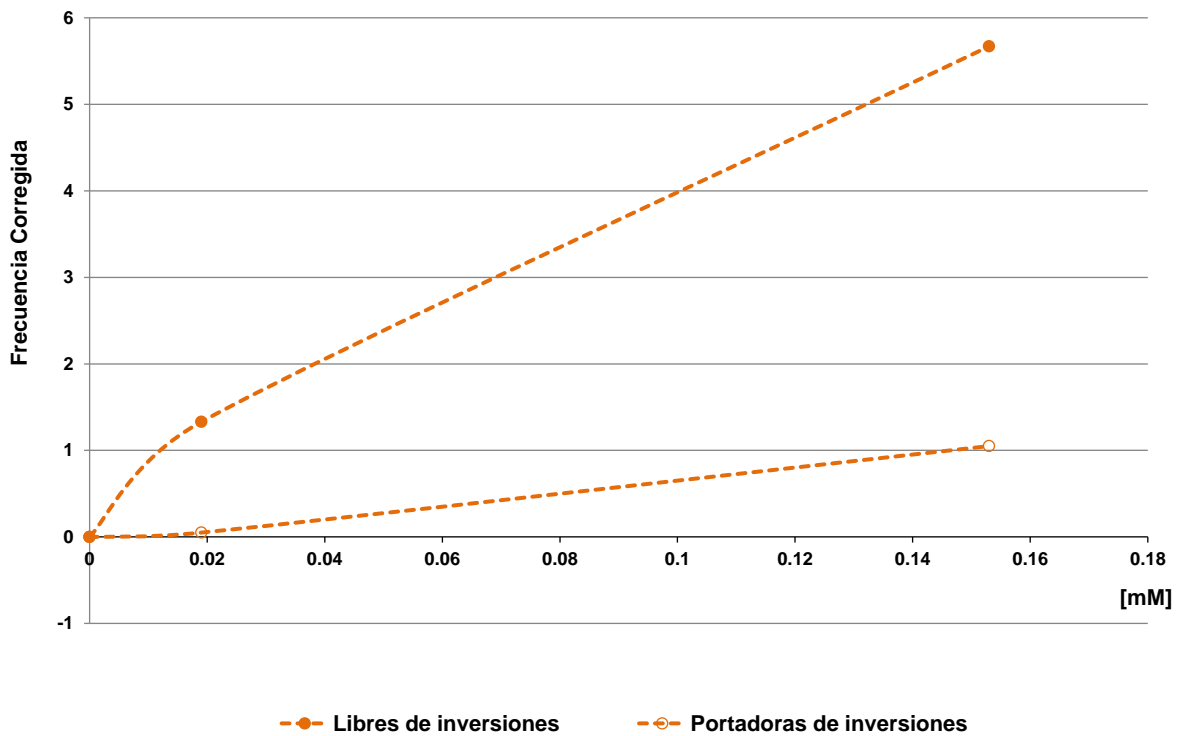


Figura 12. Frecuencia corregida de manchas totales obtenida a partir de larvas libres y portadoras de inversiones expuestas a dos mutágenos de referencia. a) azida de sodio; b) N-nitrosodimetilamina.

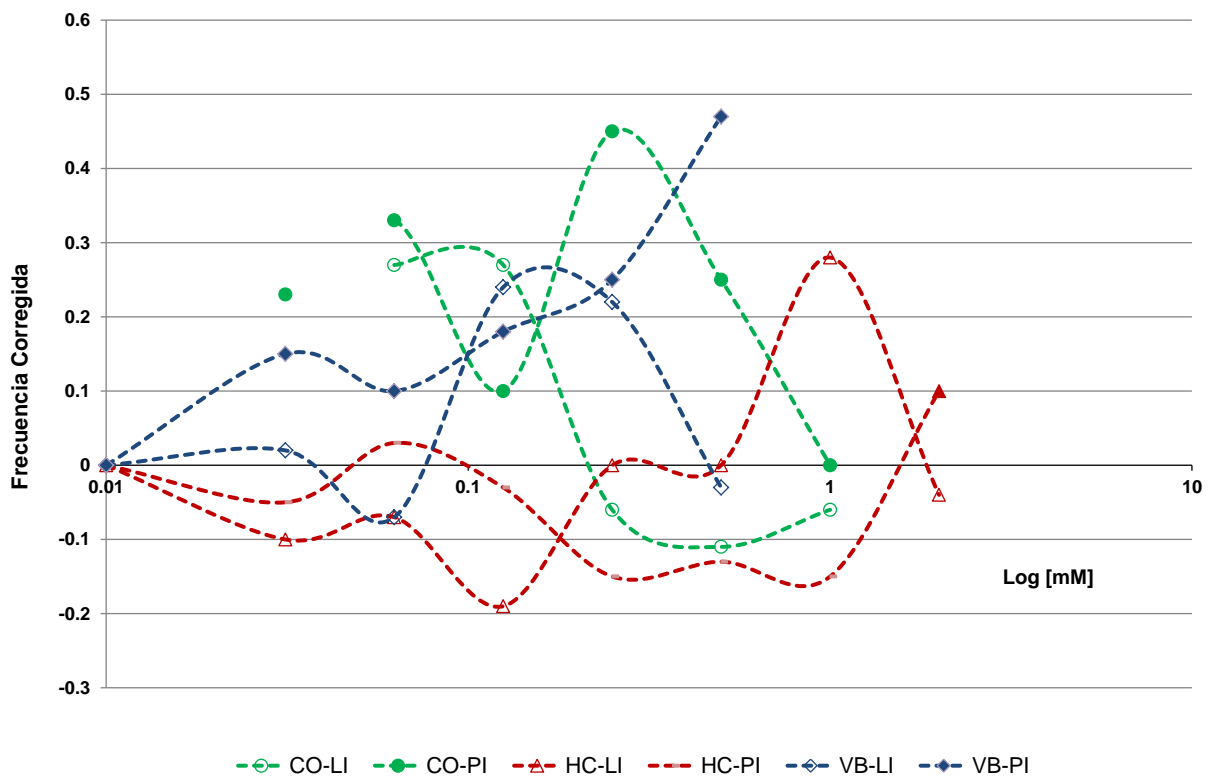
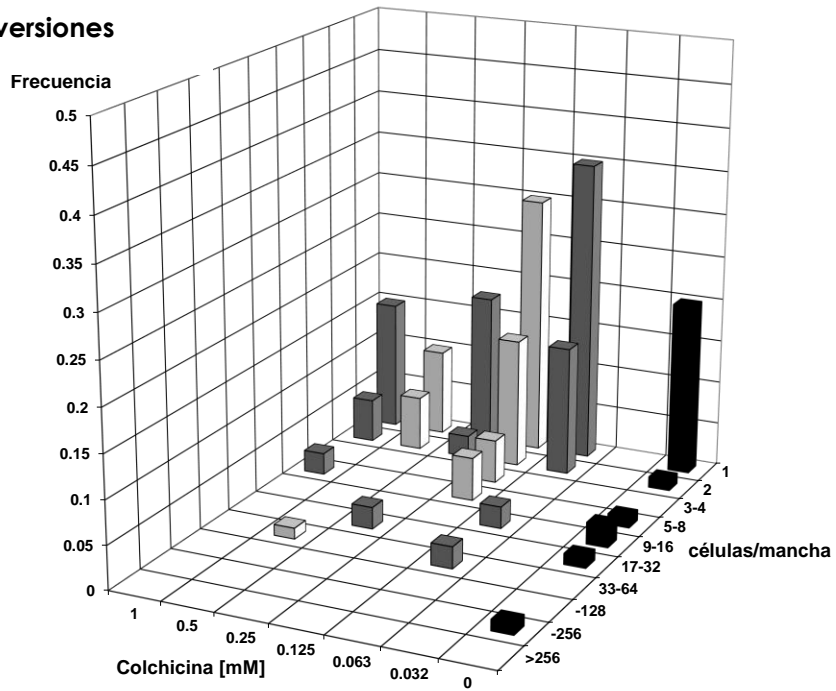


Figura 13. Frecuencia corregida de manchas totales obtenida a partir de larvas libres y portadoras de inversiones expuestas a tres diferentes compuestos citostáticos.

a) Libres de inversiones



b) Portadoras de inversiones

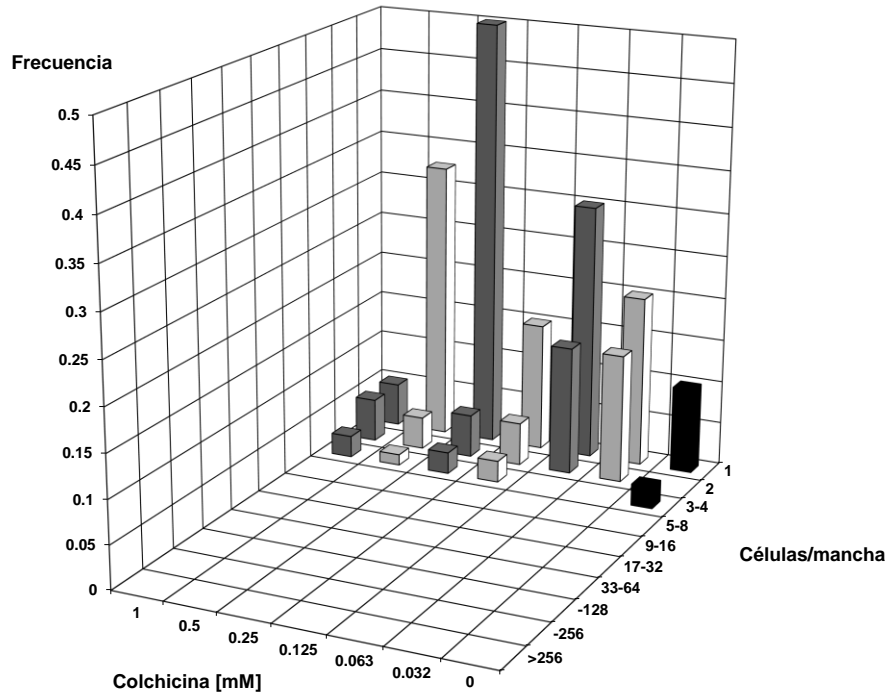
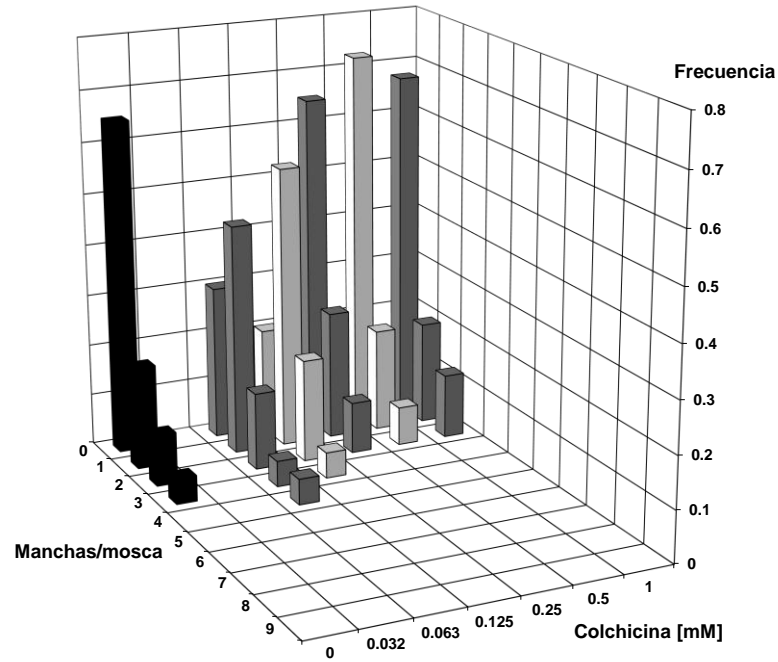


Figura 14. Distribución del número de células/mancha obtenida a partir de larvas (CE) expuestas a CO.

a) Libres de inversiones



b) Portadoras de inversiones

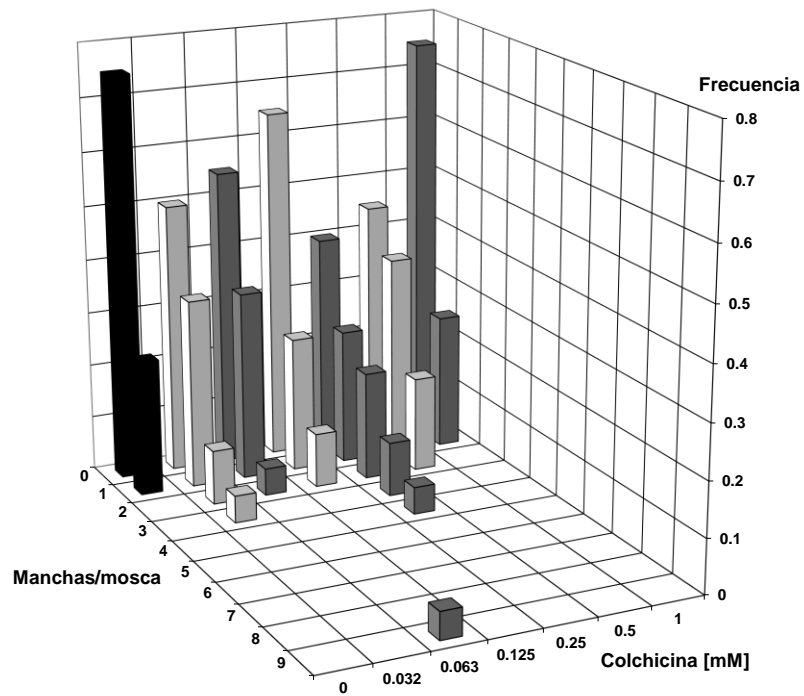
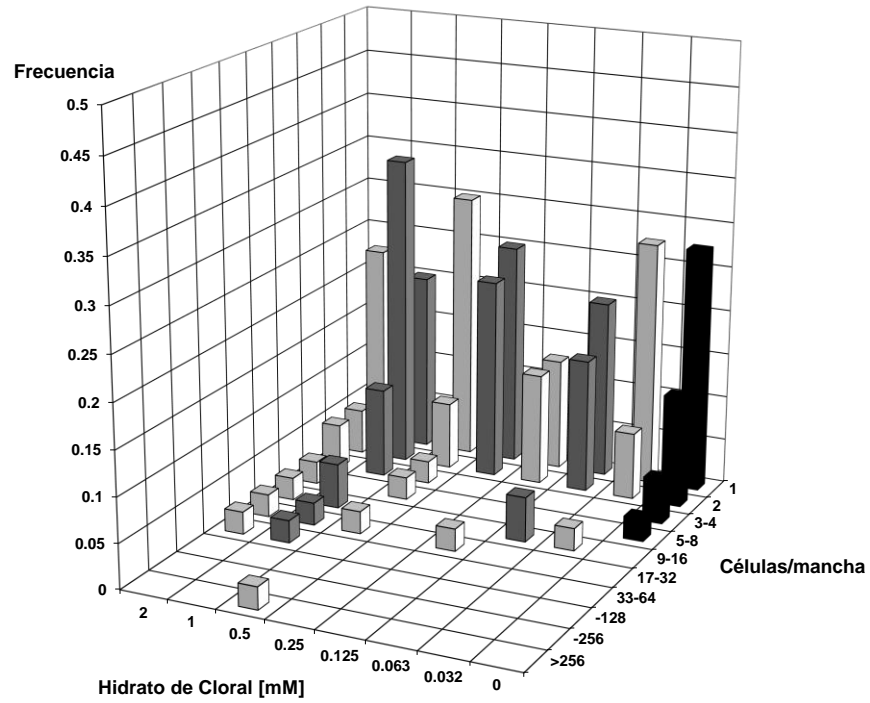


Figura 15. Distribución del número de manchas/mosca obtenida a partir de larvas (CE) expuestas a CO.

a) Libres de inversiones



b) Portadoras de inversiones

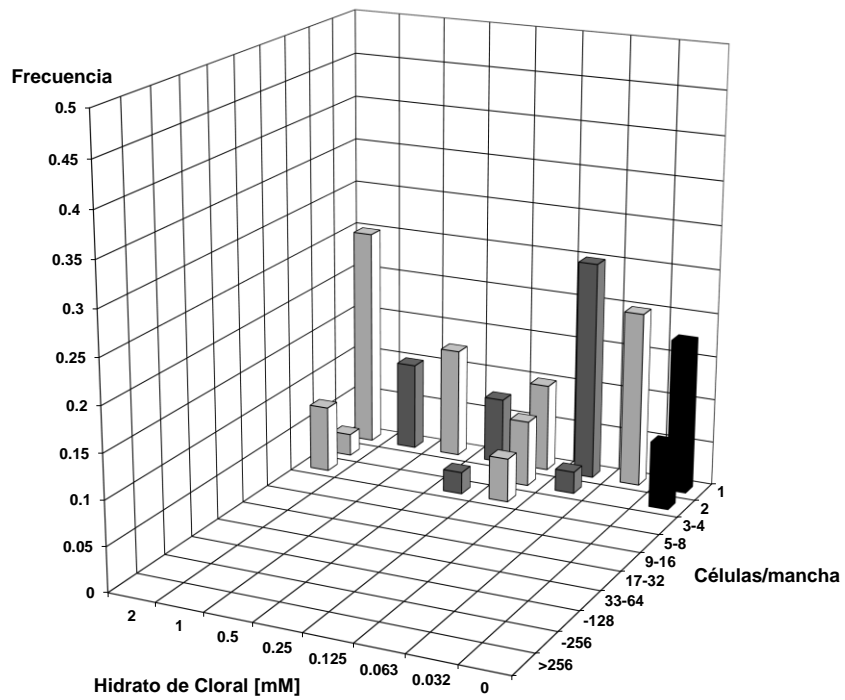
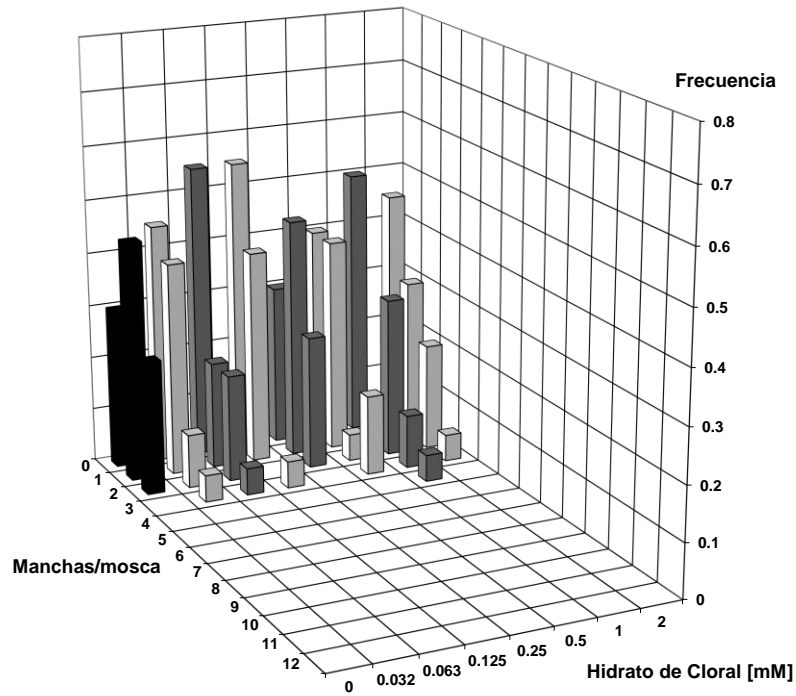


Figura16. Distribución del número de células/mancha obtenida a partir de larvas (CE) expuestas a HC.

a) Libres de inversiones



b) Portadoras de inversiones

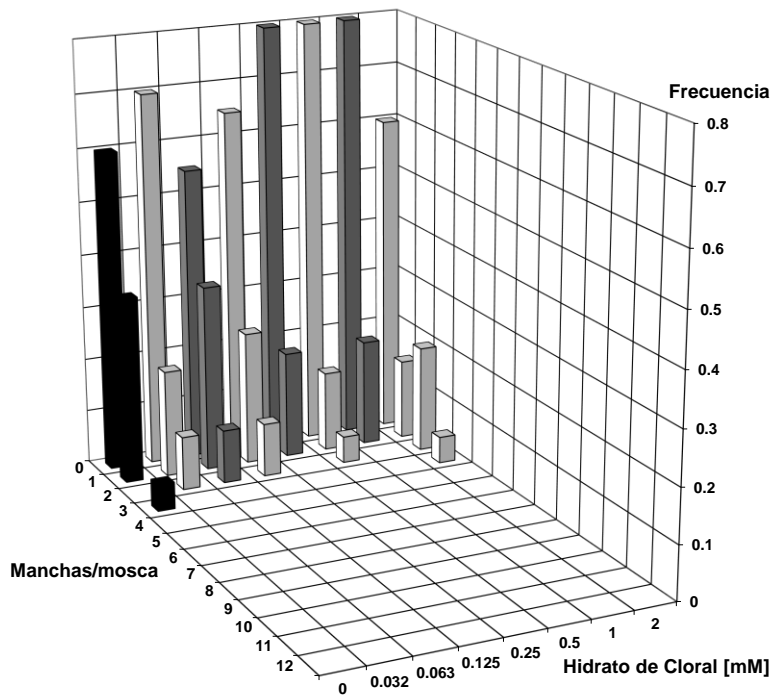
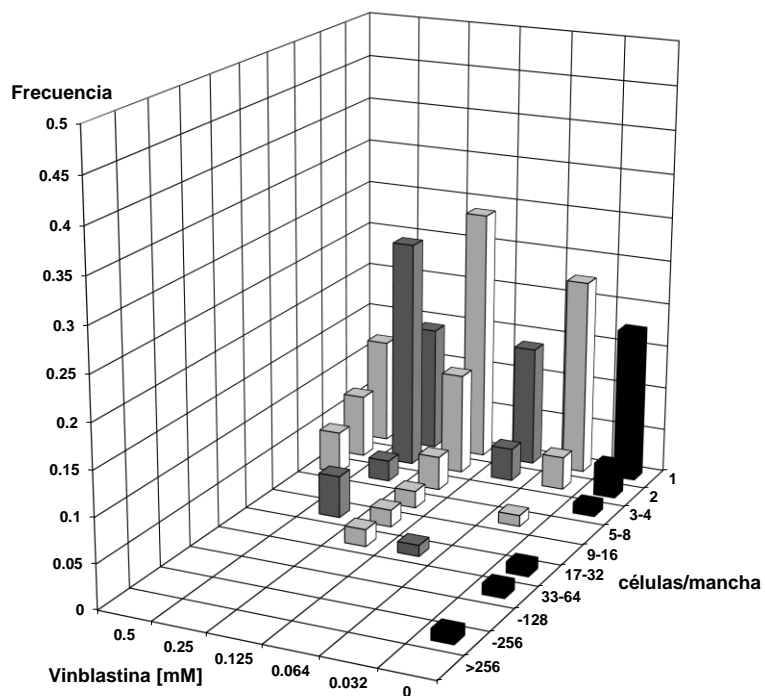


Figura 17. Distribución del número de manchas/mosca obtenida a partir de larvas (CE) expuestas a HC.

a) Libres de inversiones



b) Portadoras de inversiones

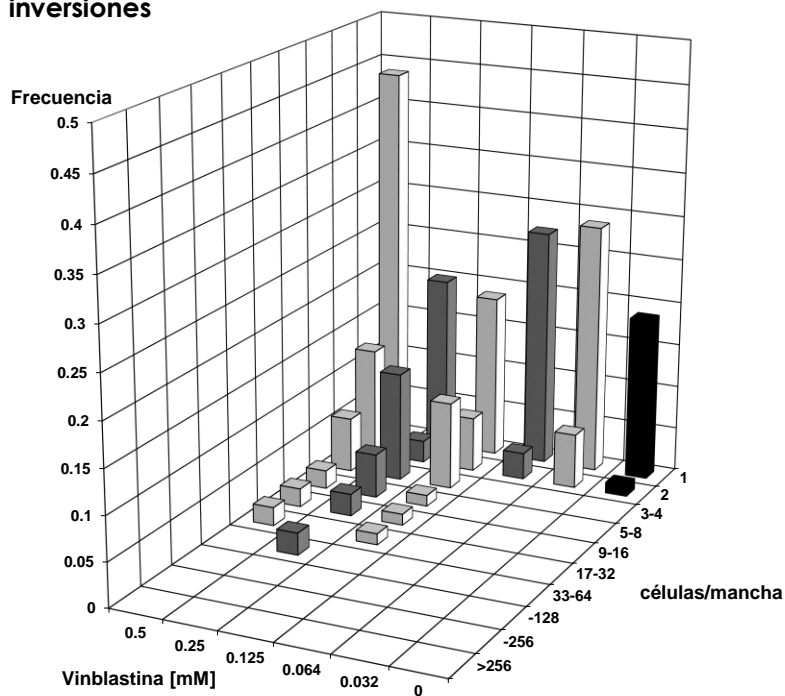


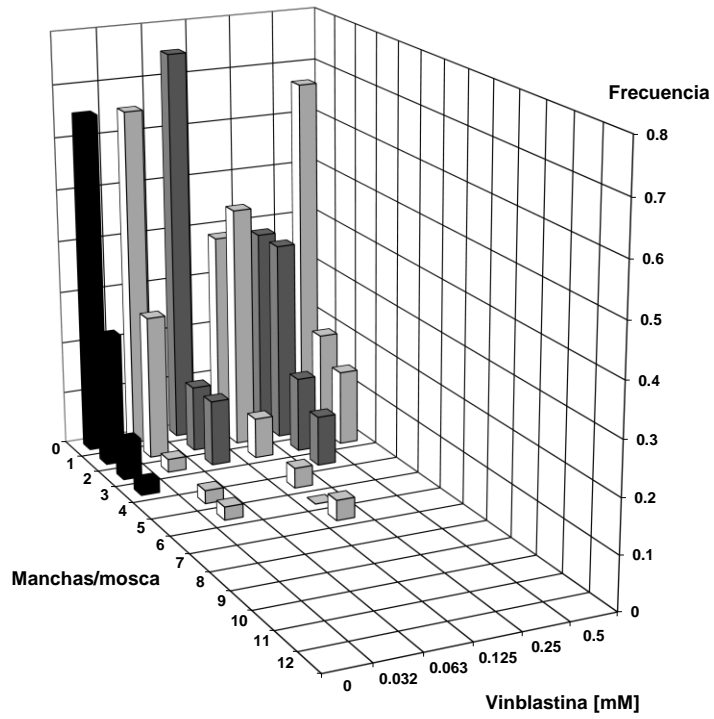
Figura 18. Distribución del número de células/mancha obtenida a partir de larvas (CE) expuestas a VB.

Tabla VII. Frecuencia de manchas/ala recobrada en los tratamientos con la cruz estándar a [0.125 mM] de CO o VB con diferentes horas de exposición. Exposición interrumpida (72 x 6 h).

Exposición		libres de inversiones				portadoras de inversiones				
(h)	N	Sencillas		Totales	Fc	N	Sencillas			Fc
		chicas	grandes				chicas	grandes	Totales	
Colchicina										
0	40	0.43 (17)	0.08 (3)	0.50 (20)	0	40	0.37 (15)	0.10 (4)	0.47 (19)	0
6	40	0.40 (16)	0.03 (1)	0.45 (18)	-0.05					
12	38	0.71 (27)	0.16 (6)	0.87 (33)+	0.37	38	0.47 (18)	0.08 (3)	0.55 (21)	0.08
18	22	0.41 (9)	0.18 (4)	0.64 (14)	0.14	40	0.28 (11)	0.28 (11)	0.55 (22)	0.08
24						40	0.37 (15)	0.25 (10)	0.62 (25)	0.15
30						22	0.36 (8)	0.23 (5)	0.59 (13)	0.12
36						32	0.22 (7)	0.12 (4)	0.34 (11)	-0.13
42						40	0.37 (15)	0.03 (1)	0.40 (16)	-0.07
48						24	0.71 (17)	0.08 (2)	0.79 (19)	0.32
Vinblastina										
0	40	0.25 (10)	0.10 (4)	0.35 (14)	0	40	0.12 (5)	0.00 (0)	0.12 (5)	0
6										
12	40	0.43 (17)	0.15 (6)	0.62 (25)	0.27	40	0.40 (16)+	0.15 (6)+	0.55 (22)+	0.43
18	26	0.31 (8)	0.08 (2)	0.42 (11)	0.07	20	0.25 (5)	0.45 (9)+	0.70 (14)+	0.58
24	40	0.22 (9)	0.17 (7)	0.40 (16)	0.05	40	0.32 (13)+	0.35 (14)+	0.68 (27)+	0.56
30	14	0.57 (8)	0.21 (3)	0.79 (11)+	0.44	20	0.30 (6)	0.10 (2)	0.40 (8)+	0.28
36	32	0.62 (20)+	0.28 (9)	0.94 (30)+	0.59	40	0.35 (14)+	0.47 (19)+	0.82 (33)+	0.7
42	18	0.39 (7)	0.17 (3)	0.61 (11)	0.26	22	0.32 (7)	0.23 (5)	0.55 (12)+	0.43
48	6	0.33 (2)	0.17 (1)	0.50 (3)	0.15	6	0.83 (5)+	0.00 (0)	0.83 (5)+	0.71

N, Número de alas analizadas; Fc = Frecuencia corregida de manchas totales. Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988). $\alpha = \beta = 0.005$. +, positivo. Prueba de dos colas. No se recobraron moscas libres de inversión a partir de las 24 a las 48 horas de exposición a CO y tampoco a las 6 horas de exposición a VB.

a) Libres de inversiones



b) Portadoras de inversiones

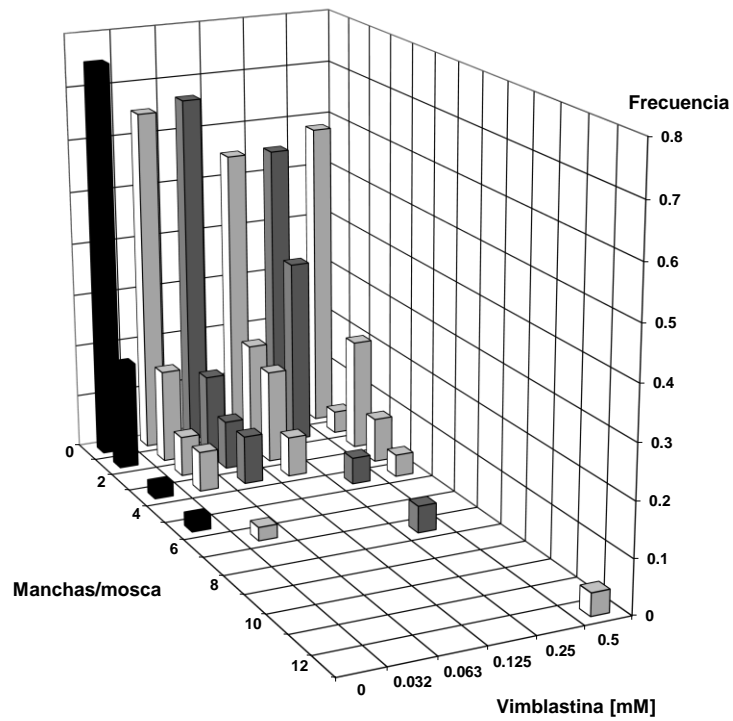
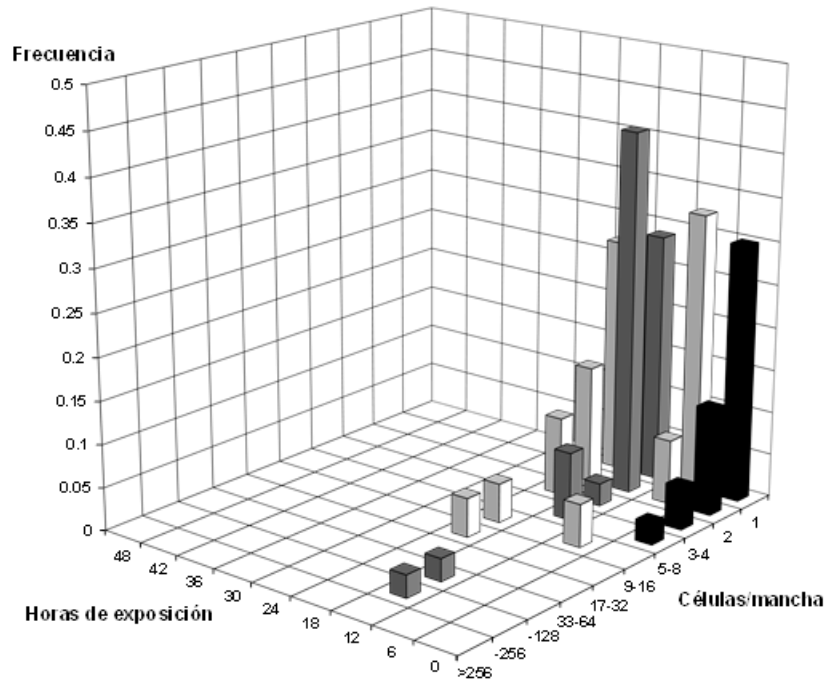


Figura 19. Distribución del número de manchas/mosca obtenida a partir de larvas (CE) expuestas a VB.

a) Libres de inversiones



b) Portadoras de inversiones

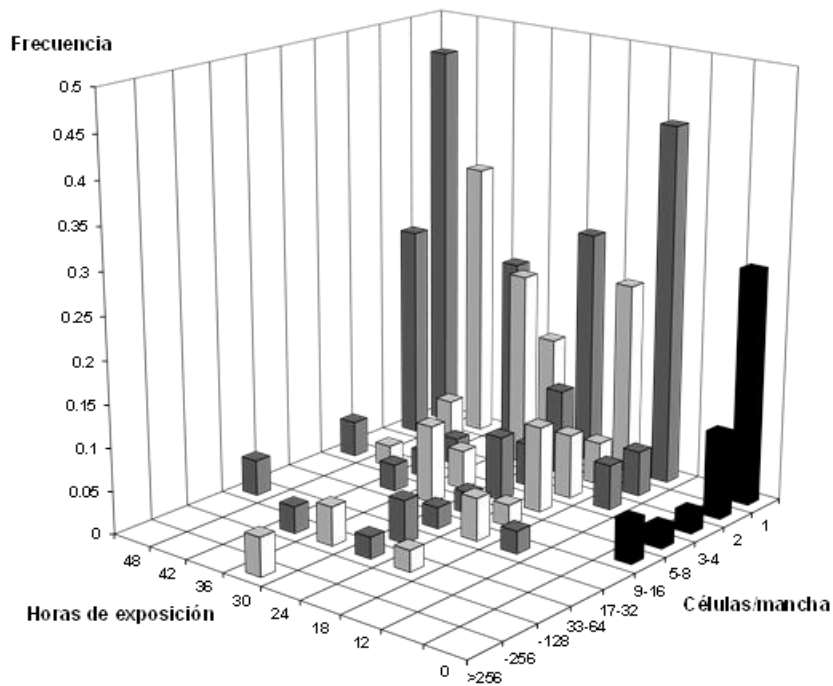
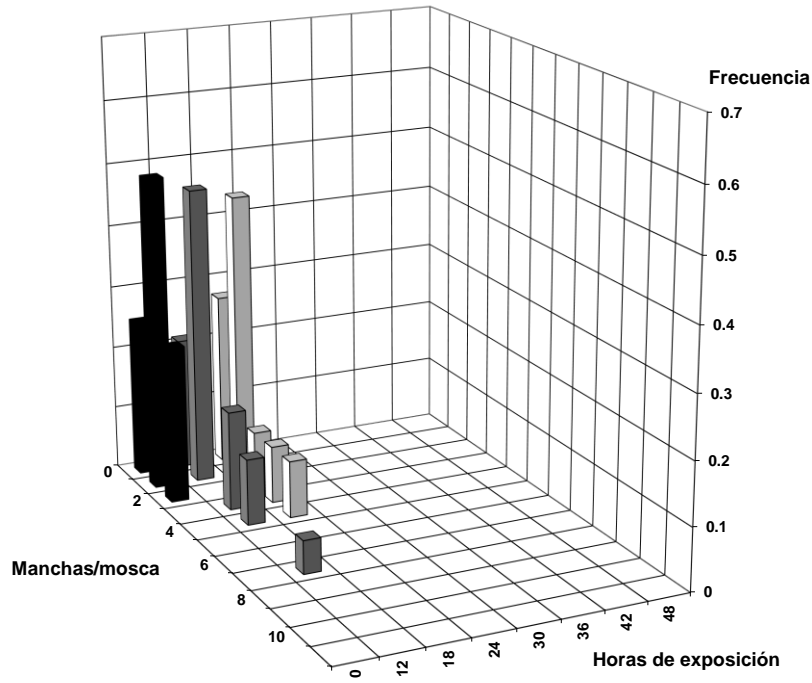


Figura 20. Distribución del número de células/mancha obtenida a partir de larvas (CE) expuestas a [0.125 mM] de CO con diferentes horas de exposición.

a) Libres de inversiones



b) Portadoras de inversiones

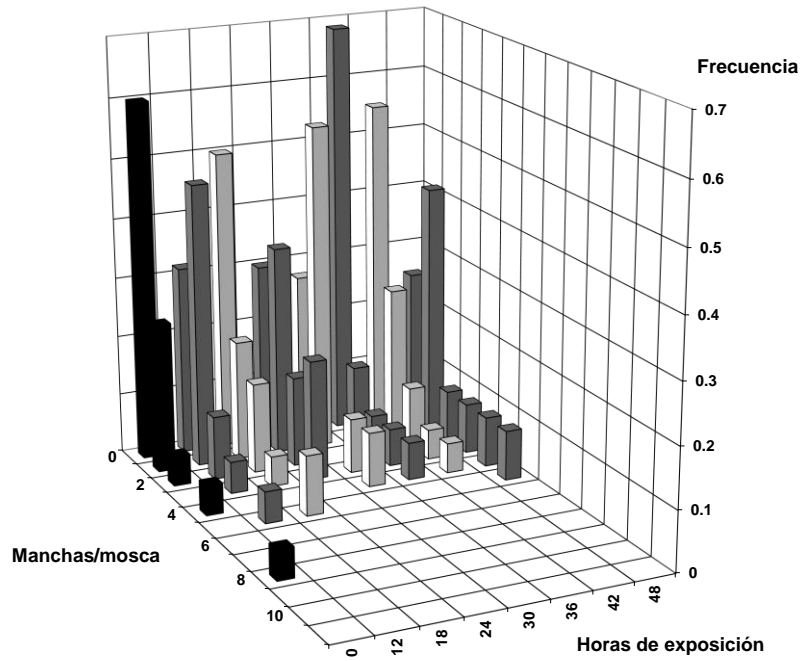
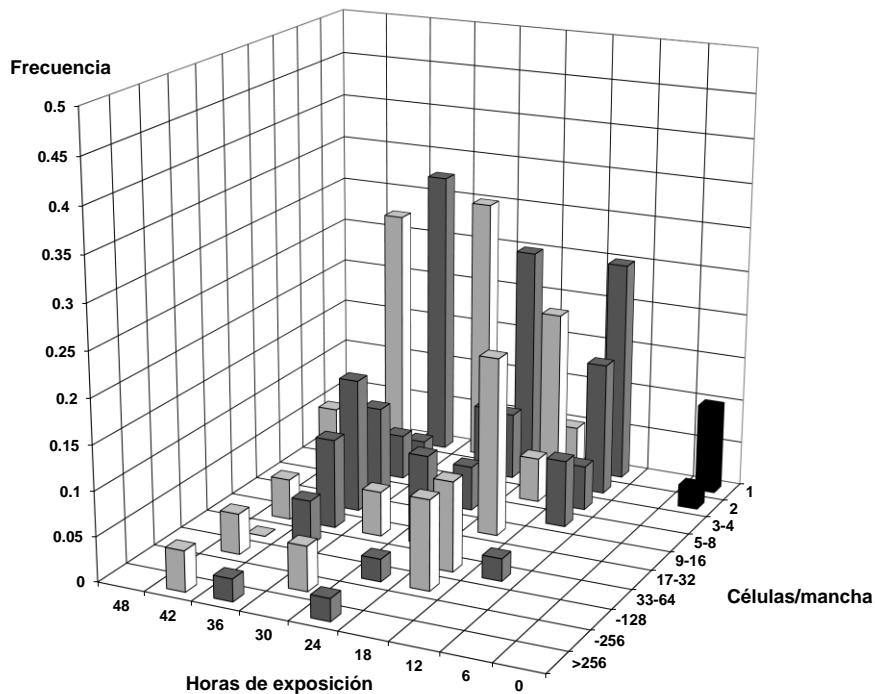


Figura 21. Distribución del número de manchas/mosca obtenida a partir de larvas (CE) expuestas a [0.125 mM] de CO con diferentes horas de exposición.

a) Libres de inversiones



b) Portadoras de inversiones

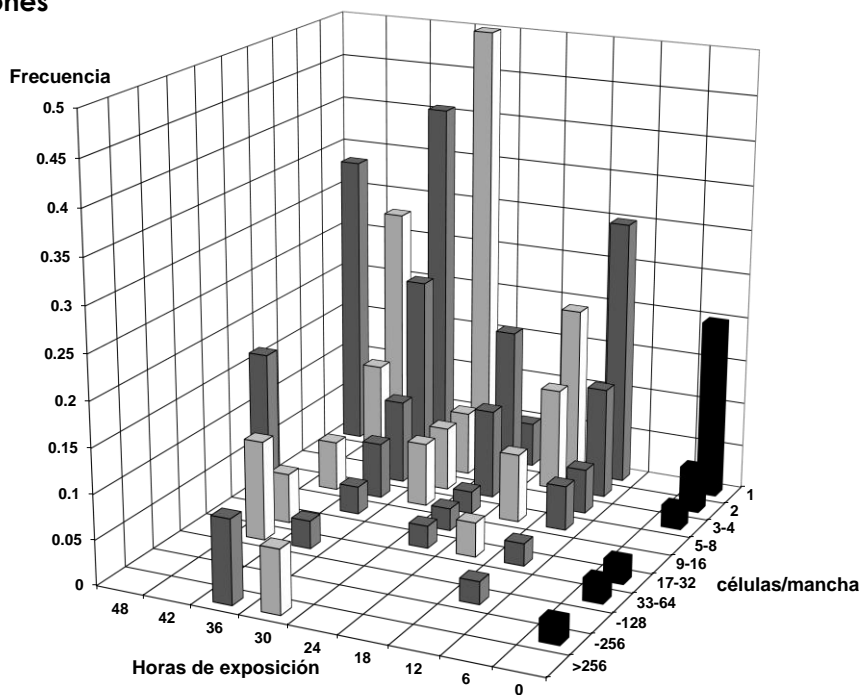
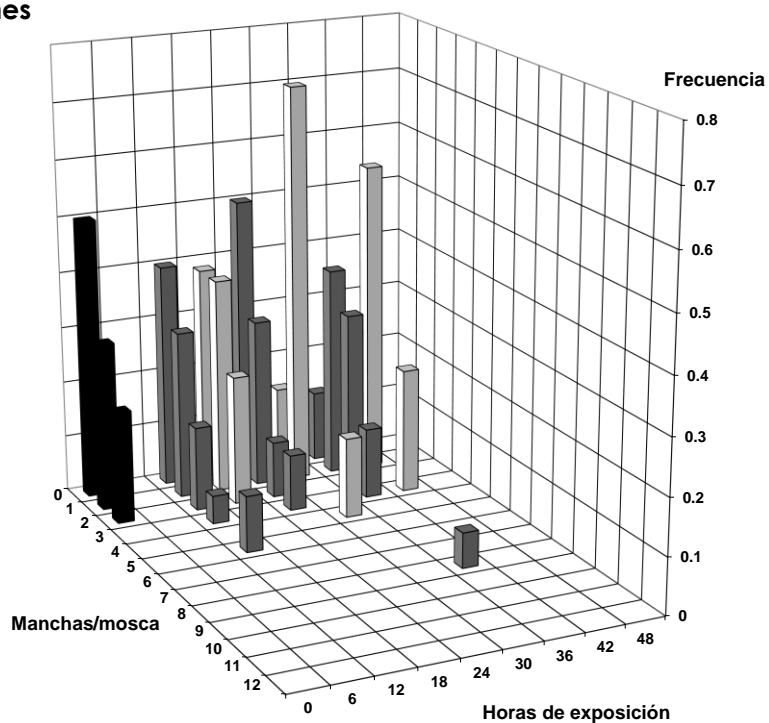


Figura 22. Distribución del número de células/manchas obtenida a partir de larvas (CE) expuestas a [0.125 mM] de VB con diferentes horas de exposición.

a) Libres de inversiones



b) Portadoras de inversiones

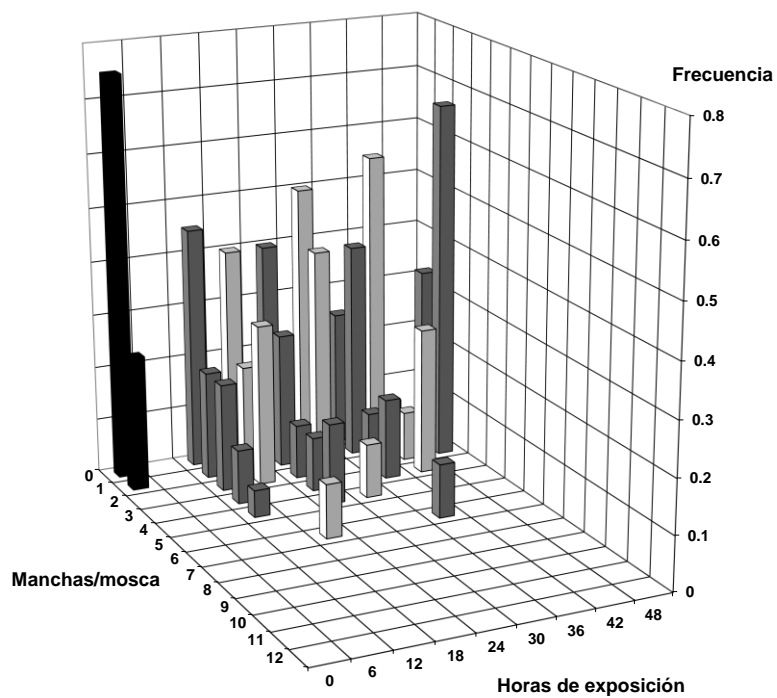


Figura 23. Distribución del número demanchas/moscaobtenida a partir de larvas (CE) expuestas a [0.125 mM] de VB con diferentes horas de exposición.

Tabla VIII. Frecuencia de manchas/ala recobrada a partir de moscas libres y portadoras de inversiones (CM) con diferentes horas de exposición a [0.125 mM] de CO. Exposición interrumpida (72 x 6 h).

Exposición		libres de inversiones				portadoras de inversiones				
(h)	N	Sencillas			Fc	N	Sencillas			
		chicas	grandes	Totales			chicas	grandes	Totales	Fc
Colchicina										
0	80	0.44 (35)	0.09 (7)	0.52 (42)	0	80	0.32 (26)	0.06 (5)	0.39 (31)	0
6	80	0.54 (43)	0.10 (8)	0.66 (53)	0.14	40	0.37 (15)	0.05 (2)	0.43 (17)	0.04
12	78	0.72 (56)+	0.15 (12)	0.91 (71)+	0.39	78	0.49 (38)	0.08 (6)	0.56 (44)	0.17
18	62	0.45 (28)	0.08 (5)	0.56 (35)	0.04	40	0.28 (11)	0.25 (10)+	0.52 (21)	0.13
24	80	0.60 (48)	0.25 (20)+	0.86 (69)+	0.34	40	0.37 (15)	0.25 (10)+	0.62 (25)	0.23
30	78	0.90 (70)+	0.10 (8)	1.00 (78)+	0.48	62	0.50 (31)	0.10 (6)	0.60 (37)+	0.21
36	40	0.65 (26)	0.17 (7)	0.85 (34)+	0.33	112	0.27 (30)	0.05 (6)	0.32 (36)	-0.07
42	80	0.96 (77)+	0.09 (7)	1.08 (86)+	0.56	80	0.35 (28)	0.06 (5)	0.41 (33)	0.02
48	40	0.62 (25)	0.12 (5)	0.75 (30)	0.23	64	0.50 (32)	0.08 (5)	0.58 (37)	0.19

N, Número de alas analizado; FC = Frecuencia corregida de manchas totales. Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würgler (1988). $\alpha = \beta = 0.005$. +, positivo. Prueba de dos colas. Se utilizó agua destilada como disolvente y testigo negativo.

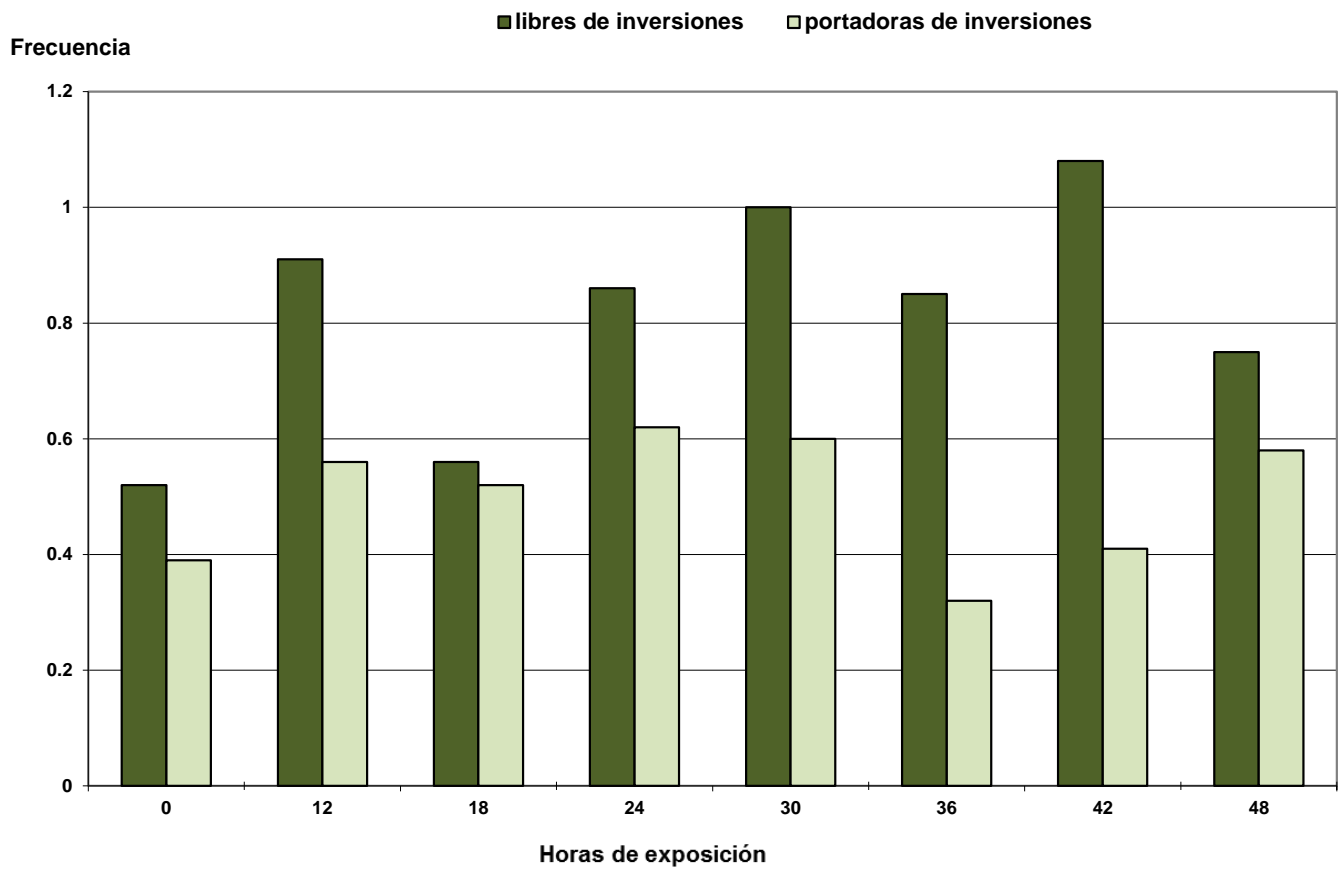
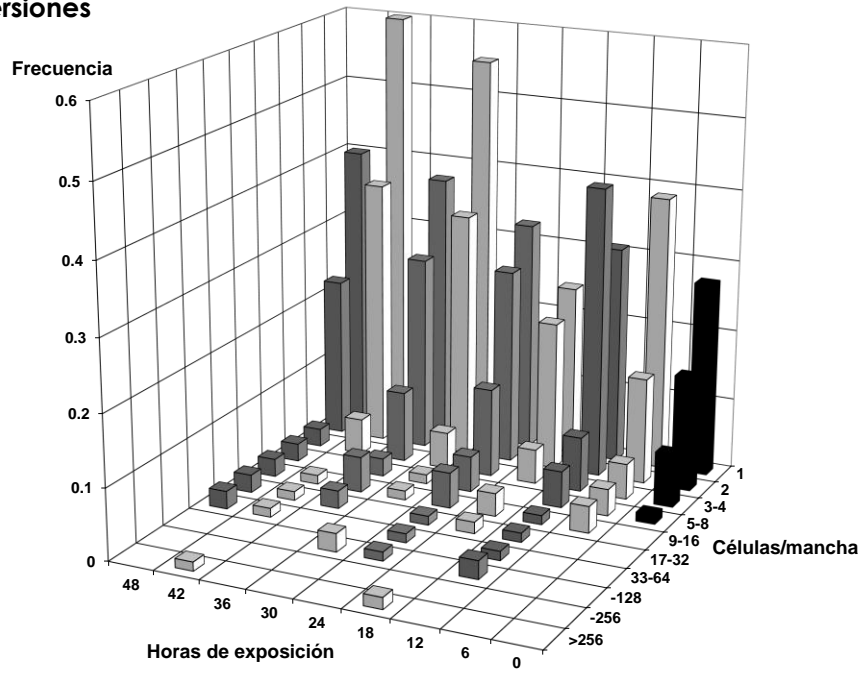


Figura 24. Frecuencia de manchas totales recobrada a partir de moscas libres y portadoras de inversiones (CM) con diferentes horas de exposición a [0.125 mM] de CO.

a) Libres de inversiones



b) Portadoras de inversiones

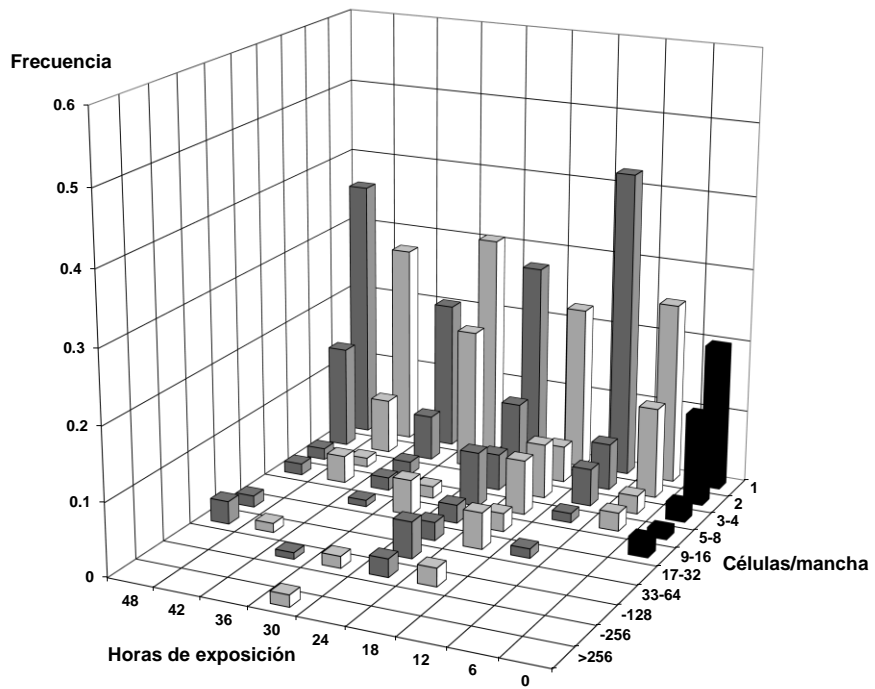
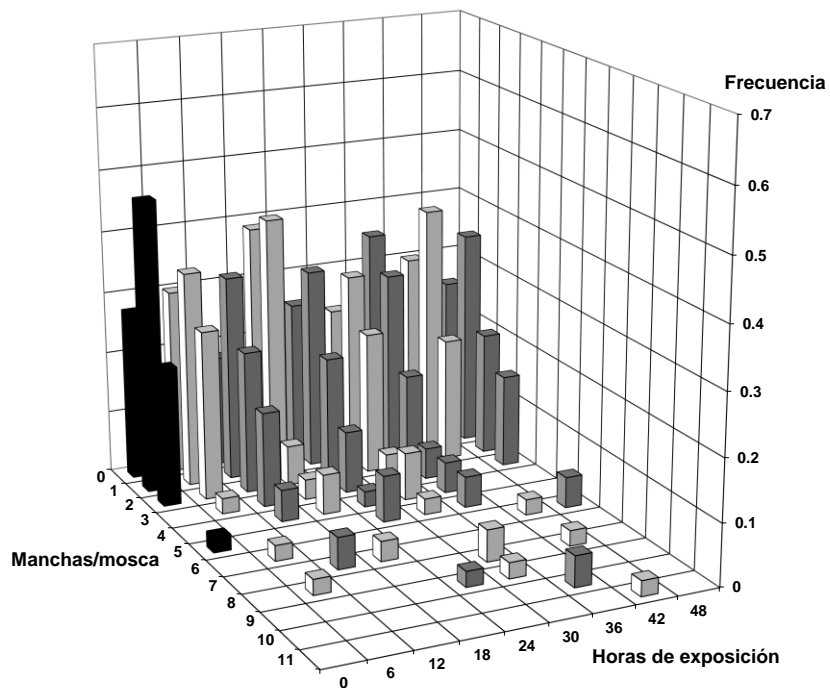


Figura 25. Distribución del número de células/mancha obtenida a partir de larvas (CM) expuestas a [0.125 mM] de CO con diferentes horas de exposición.

a) Libres de inversiones



b) Portadoras de inversiones

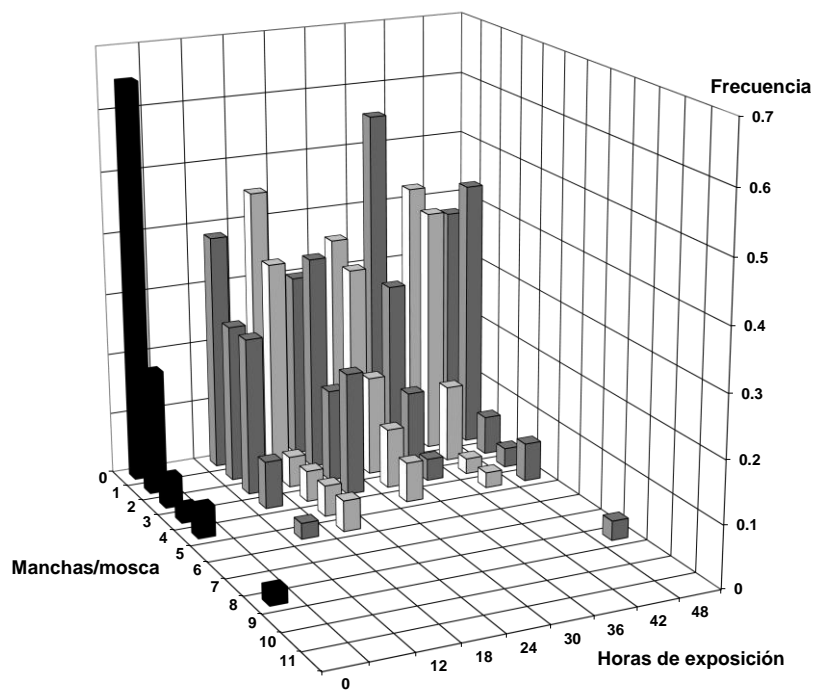


Figura 26. Distribución del número de manchas/mosca obtenida a partir de larvas (CM) expuestas a $[0.125 \text{ mM}]$ de CO con diferentes horas de exposición.

REFERENCIAS

- Aardema M. J., Albertini S., Arni P., Henderson L. M., Kirsch-Volders M., Mackay J. M., Sarrif A. M., Stringer D. A., Taalman R. D. F. (1998) Aneuploidy: a report of an ECETOC task force. *Mutation Res* 410, 3–79.
- Abraham R. T., Acquarone M., Andersen A., Asensi A., Belle R., Berger F., Bergounioux C., Brunn G., Buquet-Fagot C., Fagot D. (1995) Cellular effects of olomoucine, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Biol Cell* 83, 105-20.
- Abrahamson S., Houtchens K., Li Jia X. y Foureman P. (1983) Germ cell comparative *Drosophila* mutagenesis: sensitivity and mutation pattern in chemically treated stem cells. *Environ Mutagenesis* 5, 891-905.
- Adams M. D., Celniker S. E., Holt R. A., Evans Ch. 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. C., Blazej R. G., Champe M., Pfeiffer B. D., Wan K. H., Doyle C., Baxter E. G., Helt G., Nelson C. R., Gabor G. L., Miklos, Abril J. F., Agbayani A., Hui-Jin, 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., Brokstein P., Brottier P., Burtis K. C., Busam D. A., Butler H., Cadieu E., Center A., Chandra I., Cherry J. M., Cawley S., Dahlke C., Davenport L. B., Davies P., de Pablos B., Delcher A., Deng Z., Mays A. D., Dew I., Dietz S. M., Dodson K., Doup L. E., Downes M., Dugan-Rocha S., Dunkov B. C., Dunn P., Durbin K. J., Evangelista C. C., Ferraz C., Ferriera S., Fleischmann W., Fosler C., Gabrielian A. E., Garg N. S., Gelbart W. M., Glasser K., Glodek A., Gong F., Harley Gorrell J., Gu Z., Guan P., Harris M., Harris N. L., Harvey D., Heiman T. J., Hernandez J. R., Houck J., Hostin D., Houston K. A., Howland T. J., Wei M., Ibegwam Ch., Jalali M., Kalush F,

- Karpen G. H., Ke Z., Kennison J. A., Ketchum K. A., Kimmel B. E., Kodira Ch. D., Kraft Ch., Kravitz S., Kulp D., Lai Z., Lasko P., Lei Y., Levitsky A. A., Li J., Li Z., Liang Y., Lin X., Liu X., Mattei B., McIntosh T. C., McLeod M. P., D. McPherson, Merkulov G., Milshina N. V., Mobarry C., Morris J., Moshrefi A., Mount S. M., Moy M., Murphy B., Murphy L., Muzny D. M., Nelson D. L., Nelson D. R., Nelson K. A., Nixon K., Nusskern D. R., Pacleb J. M., Palazzolo M., Pittman G. S., S. Pan, Pollard J., Puri V., Reese M. G., Reinert K., Remington K., Saunders R. D. C., Scheeler F., Shen H., Shue B. Ch., Sidén-Kiamos I., Simpson M., Skupski M. P., Smith T., Spier E., Spradling A. C., Stapleton M., Strong R., Sun E., Svirskas R., Tector C., Turner R., Venter E., Wang A. H., Wang X., Wang Z., Wassarman D. A., Weinstock G. M., Weissenbach J., Williams S. M., Woodage T., Worley K. C., Wu D., Yang S., Yao Q. A., Ye J., Yeh R., Zaveri J. S., Zhan M., Zhang G., Zhao Q., Zheng L., Zheng X. H., Zhong F. N., Zhong W., Zhou X., Zhu S., Zhu X., Smith H. O., Gibbs R. A., Myers, Rubin G. M., Venter J. C. (2000) The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ASTRD) (1989) Toxicological Profile for N-Nitrosodimethylamina, Atlanta, Georgia: U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J.D. (1994) Molecular Biology of The Cell, 3a. ed. Garland Publishing, Inc., pp. 1294.
- Allen J. W., Collins B.W. y Evansky P. A. (1994) Spermatid micronucleus analyses of trichloroethylene and chloral hydrate effects in mice. *Mutation Res* 323, 81-88.
- Ames B; Durston W., Yamasaki E. y Lee F. (1973) Carcinogens are mutagens: A simple test systema combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc Nat Acad Sci* 70, 2281-2285.
- Antoccia A., Tanzarella C., Modesti D., Degrassi F. (1993) Cytokinesis-block micronucleus assay with kinetochore detection in colchicine-treated human fibroblasts. *Mutation Res* 287, 93-9.

- Avila J., Serrano L., Maccioni R. B. (1987) Regulatory aspects of the colchicine interaction with tubulin. *Mol Cell Biochem* 73, 29.
- Avila J. (1990) Microtubule proteins. CRC Press, Inc. USA. 270 pp.
- Baars A. J., Blijleven G. H., Mohn G., Natarajan A. T., Brüner D. D. (1980) Preliminary studies on the ability of *Drosophila melanogaster* preparations to active mutagens and carcinogens. *Mutation Res* 72, 257-264.
- Baker A. J. M. y Walker P. L. (1990) Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants, En: Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects, Shaw AJ. Ed. CRC Press, Florida, 163 pp.
- Baker B.S. y Carpenter A.T.C. (1972) Genetic analysis of sex chromosomal meiotic mutants in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 71, 255-286.
- Ballerling L. A. P., Nivard M. J. M. and Vogel E. W. (1993) Characterization of the genotoxic action of three structurally related 1, 2-dihaloalkanes in *Drosophila melanogaster*, *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 285, 209-217.
- Banerjee A., Barnes L. D., Luduena R. F. (1987) The role of the B-ring of colchicine in the stability of the colchicine-tubulin complex. *Biochim Biophys Acta* 913, 138-44.
- Bate M. y Martínez-Arias A. (1993) The Development of *Drosophila melanogaster*. Vol. II, Cap.15: Hormones and *Drosophila* development. 1523 pp.
- Bath M. A., Philp A.V., Glover D. M., Bellen H.J. (1996) Chromatid segregation at anaphase requires the barren product, a novel chromosome-associated protein that interacts with Topoisomerase II. *Cell* 87, 1103-14.
- Baudot A., de la Torre V., Valencia A. (2010) Mutated genes, pathways and processes in tumours. *EMBO reports* 11, 805-810.
- Bautista H. D. (2005) Comparación de la respuesta teratogénica en tres especies del Género *Drosophila*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México.

- Becker H. J. (1976) Mitotic recombination. En: The Genetics and Biology of *Drosophila*. Ashburner M. y E. Novitski Eds., Academic Press, Londres, pp. 1020-1083.
- Bendena W. G., Garbe J. C., Traverse K. L., Lakhotia S. C., Pardue M. L. (1989) Multiple inducers of the *Drosophila* heat shock locus 93D (hsr omega): inducer-specific patterns of the three transcripts. *J Cell Biol* 108, 2017-28.
- Bishop J.B., Dellarco V.L.Hassold., T., Ferguson L.R., Wyrobek A.J., Friedman J.M. (1996) Aneuploidy in germ cells: Etiologies and risk factors, *Environ and Mol Mutagenesis* 28,159-166.
- Boyd J.B., Golino M.D., Setlow R.B. (1976) Isolation and characterization of X-linked mutants of *Drosophila melanogaster* which are sensitive to mutagens, *Genetics* 84, 485-506.
- Boyd J.B., Mason J.M., Yamamoto A.H., Brodberg R.K., Banga S.S., Sakaguchi K. (1987) A genetic and molecular analysis of DNA repair in *Drosophila*. *J. Cell Sci Suppl* 6, 39-60.
- Brunner M., Albertini S. y Wurgler F.E. (1991) Effects of 10 known or suspected spindle poisons in the in vitro porcine brain tubulin assembly assay, *Mutagenesis* 6, 65-70.
- Brusick D. (1987) Principles of Genetic Toxicology, 2a. ed., Plenum Press, Londres, pp. 69, 82, 86, 91, 105, 109-110, 129.
- Brusick D. (1988) Evolution of testing strategies for genotoxicity. *Mutation Res* 205, 69-78.
- Butterworth F., Gonshebbatt B. M. E. (2000) Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change: A Handbook, Part II, Ed. Butterworth F. Kluwer Academic/Plenum Publishers. E. U. A.
- Buzard S. G. (1996) Studies of oncogene activation and tumor suppressor gene inactivation in normal and neoplastic rodent tissue. *Mutation Res* 365, 43-58.
- Callaini G., Dallali R., Riparbelli M. G. (1989) Diazepam induces abnormal mitosis in the early *Drosophila* embryo. *Biol Cell* 67, 313-20.

- Carmena M., Abad J. P., Villasante A., González C. (1993) The *Drosophila melanogaster* dodecasatellite sequence is closely linked to the centromere and can form connections between sister chromatids during mitosis. *J Cell Sci* 105, 41-50.
- Casarett L. J. y Doull J. (1975) Toxicology. The Basic Science of Poisons. Macmillan Publishing. pp 3.
- Chandley A. C. y Bateman A.J. (1962) Timing of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster* using tritiated thymidine. *Nature* 4812, 299-300.
- Concise International Chemical Assessment Documental (CICAD) (2002) World Health Organization, Geneva.
- Clare M. G., Lorenzon G., Akhurst L. C., Marzin D., van Delft J., Montero R., Botta A., Bertens A., Cinelli S., Thybaud V., Lorge E. (2006) SFTG international collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research* 607, 37-60.
- Clark A. M. (1982) The use of larval stages of *Drosophila* in screening for some naturally occurring mutagens, *Mutation Res* 2, 89-97.
- Clayson D. (1980) Comparison between *in vitro* and *in vivo* tests for carcinogenicity. *Mutation Res* 75, 205-213.
- Clements, J., Howe, D., Lowry, A., Phillips, M. (1990) The effects of a range of anti-cancer drugs in the *white-ivory* somatic mutation test in *Drosophila*, *Mutation Res.*, 228, 171-176.
- Dean R. (1981) Toxicology in water reuse. Problems and solutions. Academic Press, USA. 264 p.
- De Serres F. J. (1979) Evaluation of test for mutagenicity as indicators of environmental mutagens and carcinogens. *Am. N. Y. Acad. Sci.* 74-84.
- De Wulf P. y Cheeseman I. M. (2010) Tension at EMBO's Aneuploidy Workshop. *EMBO reports* 11, 727-729.
- Decordier I., Cundari E., Kirsch-Volders M. (2008). Survival of aneuploidy, micronucleated and/or polyploidy cells: Crosstalk between ploidy

- control and apoptosis. *Mutation Research* 651, 30-39.
- Deinum J. y Lincoln P. (1986) Binding to tubulin of an alkocolchicine spin probe: interaction with the essential SH groups and other active sites. *Biochem Biophys. Acta* 870, 226.
- Dellarco V.L., Voytek P. E., Hollaender A. (Eds) Aneuploidy: Etiology and mechanisms, Basic Life Sciences, Vol. -6, Plenum, New York, pp. 279-289.
- Demerec M. Ed. (1965) *Biology of Drosophila*. Hafner Publishing Co., 632 p.
- Dhamodharan R., Jordan M. A., Thrower D., Wilson L., Wadsworth P. (1995) Vinblastine suppresses dynamics of individual microtubules in living interphase cells. *Mol Biol Cell* 6, 1215-29.
- Downes C. S., Clarke D. J., Mullinger A. M., Gimenez-Abian J. F., Creighton A. M., Johnson R. T. (1994) A topoisomerase II-dependent G2 cycle checkpoint in mammalian cells. *Nature* 372, 467-70.
- Duesberg P., Rasnick D., Li R., Winters L., Rausch C., Hehlmann R. (1999) How aneuploidy may cause cancer and genetic instability. *Anticancer Res* 19, 4887-4906.
- Eichenlaub-Ritter U., Betzendahl I. (1995) Chloral hydrate induced spindle aberrations, metaphase I arrest and aneuploidy in mouse oocytes. *Mutagenesis* 10, 477-86.
- Endow S. A., Chandra R., Komma D. J., Yamamoto A. H., Salmon E. D. (1994) Mutants of the *Drosophila ncd* microtubule motor protein cause centrosomal and spindle pole defects in mitosis. *J Cell Sci* 107, 859-67.
- Epifanova O. I., Polunovsky V. A. (1986) Cell cycle controls in higher eukaryotic cells: resting state or a prolonged G1 period? *J Theor Biol* 120, 467-77.
- Eveden A. J. y Deplege M. H. (1997) Genetic Susceptibility in Ecosystems: The Challenge for Ecotoxicology. *Environ Health Persp Supple* 4, 849-854.
- Farooqi Z., Darroudi F., Natarajan A. T. (1993) The use of fluorescence in situ hybridization for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis* 8, 329-34.

- Ferguson L., Morcombe P. y Triggs C. (1993) The size of cytokinesis-blocked micronuclei in human peripheral blood lymphocytes as a measure of aneuploidy induction by Set A compounds in the EEC trial. *Mutation Res* 287, 101-112.
- Foureman P. A. (1986) A semiselective test for the detection of first-and second-division nondisjunction in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen* 8, 73-82.
- Foureman P. A. (1988) The TX: Y test for the detection of nondisjunction and chromosome breakage in *Drosophila melanogaster*. II. Results of female exposures. *Mutat Res* 203, 309-16.
- Frei H. y Würigler F. E. (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative or inconclusive results. *Mutation Res* 203, 297-308.
- García-Bellido A. y Dapena J. (1974) Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila*. *Mol Gen Genet* 128,117-130.
- García-Bellido A. y Merriam J.R. (1971a) Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 24, 61-87.
- García-Bellido A. y Merriam J.R. (1971b) Clonal parameters of tergite development in *Drosophila*. *Dev Biol* 26, 265-276.
- Gard D. L., Cha B. J., Roeder A. D. (1995) F-actin is required for spindle anchoring and rotation in *Xenopus* oocytes: a re-examination of the effects of cytochalasin B on oocyte maturation. *Zygote* 3, 17-26.
- Gatti M., Baker B. S. (1989) Genes controlling essential cell-cycle functions in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* 3, 438-53.
- Gebhart E., Schwanitz G., Hartwich G. (1997) Zytogenetische Wirkung von Vincristin auf menschliche Leukozyten *in vivo* und *in vitro*, In: Arni P., Hertner T. Chromosomal aberrations *in vitro* induced by aneugens. *Mutation Res* 379, 83-93.
- Gichner T., Vleminsky J. y Underbrink A. G. (1980) Induction of somatic mutation

- by the promutagen dimethylnitrosamine in hairs of *Tradescantia* stamen. *Mutation Res Elsevier/North Holland Biomedical Press* 78, 381-384.
- Gilbert L. A. y Hemann M. T. (2011) Chemotherapeutic Resistance: Surviving Stressful Situations. *Cancer Res* 71, 5062-6.
- Golsteyn R. M., Mundt K. E., Fry A. M., Nigg E. A. (1995) Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of P1k1, a human protein kinasa implicated in mitotic spindle function. *J Cell Biol* 129, 1617-28.
- González C. E. y Ramos-Morales P. (1997) Sodium azide induces mitotic recombination in *Drosophila*. *Mutation Res* 389, 157-65.
- González C., Casal Jimenez J., Ripoll P., Sunkel C. E. (1991) The spindle is required for the process of sister chromatid separation in *Drosophila* neuroblasts. *Exp Cell Res* 192, 105.
- González C., Cuello M. y Larripa M. T. (1999) Comparison of the aneugenic effect of vinorelbine and vincristine in cultured human lymphocytes, *Mutagenesis* 14, 63-6.
- Graf U., Green M. M. y Würgler F. E. (1979a) Mutagen-sensitive mutants in *Drosophila melanogaster*: Effects on premutational damage. *Mutation Res* 63, 101-112.
- Graf U., Juon H., Katz A.J., Freci H.J., Würgler F. E. (1983) A pilot study on a new *Drosophila* spot test. *Mutation Res* 120, 233-239.
- Graf U., Vogel E., Biber U.P. y Würgler F.E. (1979b) Genetic control of mutagen sensitivity in *Drosophila*. A new allele at the mei-9 locus on the X-chromosome. *Mutation Res* 59, 129-133.
- Graf U; Würgler F., Katz A., Frei H., Juon H., Hall C., Kale P. (1984) Somatic mutation and recombination teste in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutag* 6, 153-188.
- Graf, U. (1995) Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Experientia* 51, 168-173.

- Graf, U., Wild D., Würzler F. E. (1992b) Genotoxicity of 2-amino-3-methylimidazo(4, 5-f)quinoline (IQ) and related compounds in *Drosophila*. *Mutagenesis* 7, 145-149.
- Graf, U., y van Schaik N. (1992a) Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, *Mutation Res* 271, 59-67.
- Grawe J., Adler I. D., Nusse M. (1997) Quantitative and qualitative studies of micronucleus induction in mouse erythrocytes using flow cytometry. II. Analysis of micronuclei of aneugenic and clastogenic origin by dual-colour FISH on populations of bone marrow PCEs flow sorted on the basis of their relative DNA content, *Mutagenesis* 12, 9-16.
- Greenspan R. J. (2004) Fly Pushing: The theory and Practice of *Drosophila* Genetics. Segunda edición, Impreso en China. 191 pp.
- Griffiths, J.F. , Miller J. H., Suzuki D. T., Lewontin R.C., Gelbart W. M. (2000). An Introduction to Genetic Analysis. 6th. ed. Freeman and Co.
- Hällström I., Blanck A., Atuma S. (1984) Genetic variation in cytochrome P-450 and xenobiotic metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Pharmacol* 33, 13-20.
- Hällström I., Magnusson J., Ramel C. (1982) Relation between the somatic toxicity of dimethylnitrosamine and a genetically determined variation in the level and induction of cytochrome P-450 in *Drosophila*. *Mutation Res* 92, 161-168.
- Harrington-Brock, K., Doerr, C. L. y Moore, M. M. (1998) Mutagenicity of three disinfection byproducts: Di- and trichloroacetic acid and chloral hydrate in L5178Y/TK+/- -3.7.2C mouse lymphoma cells. *Mutation Res* 413, 265-276
- Hawley S. R., Holly I., Anne Z., Deana H., Allan L., Christine N., Michelle W., Tamar A., Janet J., Kim M., Geoffrey C. (1993) There are two mechanisms of achiasmate segregation in *Drosophila* females, one of which requires heterochromatic homology. *Developmental Genetics* 13, 440-467.
- Heck M. M., Pereira A., Pesavento P., Yannoni Y., Spradling A.C., Goldstein L. S.

- (1993) The kinesin-like protein KLP61F is essential for mitosis in *Drosophila*. *J Cell Biol* 123, 665-79.
- Hernández-Bernal, 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. México. 72 pp.
- 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. México. 92 pp.
- Honma M., Momose M., Sakamoto H., Sofuni T., Hayashi M. (2001) Spindle poisons induce allelic loss in mouse lymphoma cells through mitotic non-disjunction, *Mutation Res* 493, 101-114.
- Huber R., Salasidis K., Kulka U., Braselmann H. y Bauchinger M. (1996) Detection of centromeres in vinblastine- and radiation-induced micronuclei of human lymphocytes using FISH with an alpha satellite pancentromeric DNA probe, *Environ Mol Mutagen* 27, 105-9.
- Hyams J. S. y Brinkley B. R. (1989) Mitosis: Molecules and Mechanisms. Academic Press Inc. 350 pp.
- IARC International Agency for Research on Cancer (1987) IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. Overall evaluations of carcinogenicity, Vols. 1- 42, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 100-106.
- IARC International Agency for Research on Cancer (1995) IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol. 63. Dry cleaning, some chlorinated solvents and other industrial chemicals, Lyon, France.
- IARC International Agency for Research on Cancer (1996) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Pharmaceutical Drugs, IARC, Lyon, France.

- IARC International Agency for Research on Cancer (2002) *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, Vol. 82. Some traditional herbal medicines, some cycotoxins, naphthalene and styrene. IARC, Lyon, France.
- Index Merck (1989) Merck, O'Neil Maryadele J. (Editor), Smith A. (Editor), Heckelman P. E. Budavari S. Eds.
- IPCS (1985) Guide to short-term for detecting mutagenic and carcinogec chemicals. *Environ. Health Criteria* 51. WHO, Geneva, pp. 14-15.
- Islas G. MJ (1996) Comparación de la actividad genotóxica de tres compuestos del grupo de las azidas en células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. México. 85 pp.
- Jimenez M. y Goday C. (1993) A centrosome-associated antibody from *Drosophila melanogaster* reveals a new microtubule-dependent structure in the equatorial zone of *Parascaris univalens* embryos. *J Cell Sci* 106, 719-30.
- Jiménez M. G. M. (2011) Efecto de la N-dimetilnitrosamina (NDMA) en el desarrollo pupal de *Drosophila melanogaster*. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. 55 pp.
- Jordan MA; Himes RH; Wilson L (1985) Comparison of the effects of vinblastine, vincristine, vindesine, and vinepidine on microtubule dynamics and cell proliferation *in vitro*. *Cancer Res* 45: 2741-7.
- Jordan M. A., Thrower D., Wilson L. (1992) Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. *J Cell Sci* 102, 401 -16.
- Kallio M., Sjoblom T., Lahdetie J. (1995) Effects of vinblastine and colchicine on male rat meiosis *in vivo*: disturbances in spindle dynamics causing micronuclei and metaphase arrest. *Environ Mol Mutagen* 25, 106-17.
- Kilbey B. J., MacDonald D. J., Auerbach C., Sobels F. H., Vogel E. W. (1981) The use of *Drosophila melanogaster* in tests for environmental mutagens. *Mutation*

Res 85,141-146.

- Kolmer M., Roos C., Tirronen M., Myohanen S., Alo H. (1994) Tissue-specific expression of the diazepam-binding inhibitor in *Drosophila melanogaster*: cloning, structure and localization of the gene. *Mol Cell Biol* 14, 6983-95.
- Kopnin, B. P. (1999) REVIEW: Targets of Oncogenes and Tumor Suppressors: Key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. <http://www.protein.bio.msu.su/biokhimiya/contents/v65/full/65010005.htm>
- Kroeger-Koepke M. B y Michejda C. J. (1979) Evidence for several demethylase enzymes in the oxidation of dimethylnitrosamine and phenylmethylnitrosamina by rat liver fractions. *Cancer Res* 39, 1587 - 1591.
- Kubiak J. Z., Weber M., de Pennart H., Winston N. J., Maro B. (1993) The metaphase II arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF. *EMBO J* 12, 3773-8.
- Lakhotia S. C., Sharma A. (1995) RNA metabolism *in situ* at the 93D heat shock locus in polytene nuclei of *Drosophila melanogaster* after various treatments. *Chromosome Res* 3, 151-61.
- Lambert S., Saintigny Y., Delacote F., Amiot F., Chaput B., Lecomte M., Huck S., Bertrand P., Lopez B.S. (1999) Analysis of intrachromosomal homologous recombination in mammalian cell, using tandem repeat sequences. *Mutation Res* 433:159-168.
- Lee W. R., Abrahamson S., Valencia R., von Halle E. S., Würgler F. E., Zimmering S. (1983) The sex-linked recessive lethal test for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res* 123, 183-279.
- Lewis I. y Held Jr. (1982) Polyploidy and aneuploidy by colcemid in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 94, 87-100.
- Li R., Murray A. W. (1991) Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* 66, 519-31.
- Lindsley D. L. y Zimm G. (1992) The genome of *Drosophila melanogaster*.

Academic, Press, Inc. U.S.A., 1133 pp.

- Little M. y Ludueña R . F. (1985) Structural differences between brain $\beta 1$ y $\beta 2$ tubulins: implications for microtubule assembly and colchicine binding. *EMBO J* 4, 51.
- Lobert S., Frankfurter A., Correia J. J. (1995) Binding of vinblastine to phosphocellulose-purified and alpha beta-class III tubulin: the role of nucleotides and beta-tubulin isotypes. *Biochemistry* 34, 8050-60.
- Lynch D. W., Ronald L. S., Ronald D. H. y Davis D. G. (1991) Evaluation of *Drosophila* for screening developmental toxicants: Test results with eighteen chemicals and presentation of a new *Drosophila* bioassay. *Terat Carcinog and Mutag* 11,147-173.
- Mailhes J. B., Aardema M. J., y Marchetti F. (1993) Investigation of aneuploidy induction in mouse oocytes following exposure to vinblastine-sulfate, pyrimethamine, diethylstilbestrol diphosphate, or chloral hydrate. *Environ Mol Mutagen* 22, 107-14.
- Margolis R. L. y Wilson L. (1977) Addition of colchicine-tubuline complex to microtubule ends: the mechanism of substoichiometric colchicine poisoning, *Proc Natl Acad Sci* 74, 3466.
- Marrazzini A., Betti C., Bernacchi F., Barrai I. y Barale R. (1994) Micronucleus test and metaphase analyses in mice exposed to known and suspected spindle poisons, *Mutagenesis* 9, 505-15.
- Masuda H. (1995) The formation and functioning of yeast mitotic spindles. *Bioessays* 17, 45-51.
- McGregor D. B., Rice J. M. y Venitt S. (1999) The Use of Short-and Medium-term Test for Carcinogens and Data on Genetic Effects in Carcinogenic Hazard Evaluation. International Agency for Research on Cancer World Health Organization, IARC, Scientific Publications, No. 146, Lyon, pp. 427-470.
- McIntosh J. R., Ross U. P., Neighbors B., McDonald K. L. (1985) Architecture of the

- Microgubule componente of mitotic spindles from *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Sci* 75, 93-129.
- Muñoz H. A. (1995) Relación entre el tiempo de acción de dos mutágenos y el tamaño de mancha inducidos en células somáticas de las alas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura), Fac. de Ciencias, U. N. A. M., 58 pp.
- Muñoz H. A. (1997) Comparación del potencial aneuploidógeno de compuestos citostáticos en células somáticas de *D. melanogaster*. Tesis Maestría en Ciencias (Biología Celular), Fac. de Ciencias, U. N. A. M., 70 pp.
- Muñoz H. A., Hernández B. BR., Rivas M. H., Herrera B. J., y Ramos-Morales P. (2002) *Drosophila*: Una alternativa *in vivo* para la evaluación de actividad teratogénica. Memorias del Congreso Nacional 2002 de la Sociedad Mexicana de Genética. Morelia, Mich.
- Muñoz H. A., Ramos-Morales P. y Muñoz J. A (2008) Exploring the mutagenic activity of colchicine in *Drosophila*. *Dros Inf Serv* 91, 127-133.
- Nilan, R. A., Sideris E. G., Kleinhofs A., Sander C. y FKonzak C. (1973) Azide- a potent mutagen, *Mutation Res* 17, 142–144.
- Nigg E. A., Blangy A. y Lane H.A. (1996) Dynamic changes in nuclear architecture during mitosis: on the role of protein phosphorylation in spindle assembly and chromosome segregation. *Exp Cell Res* 229, 174-80.
- Nöthiger, R. (1970) Sucrose density separation: a method for collecting large numbers of *Drosophila* larvae. *Dros Inf Serv* 45, 177.
- Owais, W.M., Zarowitz M.AGunovich., R.A., Hodg-don A.L., Kleinhofs A. y Nilan R.A. (1978) A mutagenic *in vivo* metabolite of sodium azide. *Mutation Res* 53, 355–358.
- Onks D. L., Robertson A. F., Brodersen R. (1992) The effect of chloral hydrate and its metabolites, trichloroethanol and trichloroacetic acid, on bilirubin-albumin binding. *Pharmacol Toxicol* 71, 196-7.

- Pacchierotti F., Bassani B., Leopardi P. y Zijno A.(1991) Origin of aneuploidy in relation to disturbances of cell-cycle progression. II: Cytogenetic analysis of various parameters in mouse bone marrow cells after colchicine or hydroquinone treatment. *Mutagenesis* 6, 307-11.
- Parry J. M. y Andrew S. (1993) The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community Aneuploidy Project. *Mutation Res* 287, 3-15.
- Parry J. M. (2008) The analysis of activity of aneugenic chemicals, from cultured cells to rodent zygotes: An overview of the Protection of the European Population from aneugenic chemicals (PEPFAC Project) *Preface/Mutation Research* 651,1-2.
- Parvinen L. M., Soderstrom K. O., Parvinen M. (1978) Early effects of vinblastine and vincristine on the rat spermatogenesis: analyses by a new transillumination-phase contrast microscopic method. *Exp Pathol* (Jena) 15, 85-96.
- Petersen N. S. (1990) Effects of health and chemical stress on development. *Adv Genet* 28, 275-296.
- Pfitzer E. A. y Vouk V. (1986) General considerations of dose-effect and dose-response relationships, En: Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects, Friberg L, G.F. Nordberg y V. B. Vouk Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, pp. 149, 169, 172-173.
- Pihan G.A., Doxsey S. J. (1999) The mitotic machinery as a source of genetic instability in cancer. *Semin Cancer Biol* 9, 289-302.
- Public Health Goals for Chemical in drinking water (PHG) N-Nitrosodimethylamine. (2006). California, USA.
- Raff J. W., Glover D. M. (1989) Centrosomes, and not nuclei, initiate pole cell formation in *Drosophila* embryos. *Cell* 57, 611-9.
- Ramos M. P., Abundis H. M., Gaytán J. C., Ordaz M. G., Orozco P. G., Maldonado J., Hernández J., González E., Reyes P., Galicia E., Muñoz J.

- A. (1993) Manual de Laboratorio de genética para *Drosophila melanogaster*. McGraw-Hill, México, 131 pp.
- Ramos M. P. (1994) Efectos Genotóxicos de algunas sales de arsénico en *Drosophila melanogaster*. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, UNAM. 142 pp.
- Ramos M. P., Ordaz MG., Maldonado J., Muñoz J.A., González E., Abundis H. M., Campos P. A., Martínez M., Páez Y., Islas MJ., Gaytan JC., Orozco PG., Hernández BR., Dorantes AY., Rivas H., Muñoz A., Jiménez I. (1996) Suceptibilidad diferencial de *Drosophila melanogaster* en la Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART). Análisis de la distribución muestral. 4º Congreso conjunto de las Sociedades Mexicanas de Genética y Toxicología Genética, A.C., Aguascalientes, Aguascalientes.
- Ramos M. P., Ordaz MG., Muñoz JA., Muñoz A., Rivas H., Hernández BR., (2000) Construcción de la cepa de *Drosophila* MEX2000. Comparación de su respuesta genotóxica ante la Etilnitrosourea (ENU). Memorias del Congreso de Genética y Biomedicina Molecular 2000. Monterrey, N. L.
- Ramos M. P., Ordaz M. G., Dorantes A., Rivas H., Campos P., Martínez M., Hernández B. (2001) *Drosophila* is a reliable biomonitor of water pollution. En: *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change: A Handbook, Part II*, Eds. Butterworth F., Gunatilaba A., Gensebatt M. E. Kluwer Academic/Plenum Press, New York, ISBN 0-306-46387-3, p 257 – 299
- Ramos M. P., Muñoz JA., Muñoz A., Rivas M. H., Hernández B., Herrera B. J. (2002) Thalidomide: A mutagen at low concentration?. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 39, Suplemento 33.
- Ramos M. P., Muñoz H. A. (2003) *Biología de Drosophila*. Mutagénesis. Coloquio de la Facultad de Ciencias, U. N. A. M.
- Ramos M. P., Herrera B. J. H., Muñoz M. J. A., Muñoz H. A., Rivas M. H., Hernández B. B. R. (2007) Transgenerational damage induced by N-nitrosodimethylamina (NDMA) in *Drosophila melanogaster*. 38th Annual

Meeting "Mutational and Epigenetic Mechanisms of Susceptibility and Risks for Genetic Diseases", of Environmental Mutagen Society.

Ranganathan S., Davia D. G., Hood R. D. (1987) Developmental toxicity of ethanol in *Drosophila melanogaster*. *Teratology* 36, 45-49.

Rodríguez A. R. y Ramos M. P. (1992). Los Pequeños Manuales: *Drosophila* como sistema para detectar agentes genotóxicos. 1ª Ed., Prensas Ciencias, UNAM, 49 pp.

Roos W., Baumgartner M., Kaina B. (2004) Apoptosis triggered bby DNA damage O6-methylguanine in human lymphocytes requires DNA replication and is mediate by p53 and Fas/CD95/Apo-1. *Oncogene* 23, 359-367.

Rouan S. K., Otterness I. G., Cunningham A. C., Holden H. E., Rhodes C. T. (1990) Reversal of colchicine-induced mitotic arrest in Chinese hamster cells with a colchicine-specific monoclonal antibody. *Am J Pathol* 137, 779-87.

Sackett D. L. (1995) *Vinca* site agents induce structural changes in tubulin different from and antagonistic to changes induced by colchicine site agents. *Biochemistry* 34, 7010-9.

Salceda V. M. (1984) *Genética de Drosophila*, Técnicas de Laboratorio, Limusa, México. 97 p.

Saltarelli D., Pantaloni D. (1983) Copolymerization of tubulin-colchicine complex and unliganded tubulin in a nonmicrotubular polymer. *Bioch* 22,1556.

Satya-Prakash K. L., Liang J. C., Hsu T. C., Johnston D. A. (1986) Chromosome aberrations in mouse bone marrow cells following treatment *in vivo* with vinblastine and colcemid. *Environ. Mutagen* 8, 273-282.

Sawicki E. (1980) Handbook of Environmental Genotoxicology, Vol. I Environmental Aspect, CRC Press, Florida, 141 y 168 pp.

Schiff P. B., Fant J., Horwitz S. B. (1979) Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. *Nature* 277, 665.

Schuler R. L., Hardin B. D., Niemeier R. W. (1982) *Drosophila* as a tool for the rapid assessment of chemicals for teratogenicity. *Teratogenesis Carcinog*

Mutagen 2, 293-301.

Schuller R. L., Radike M. A., Harding B. D., Niemeier R. W. (1985) Pattern of response of intact *Drosophila* to known teratogens. *J Am Coll Toxicol* 4, 291-303.

Science (2000) Vol. 297. Portada

Sehgal A., Osgood C., Zimmering S. (1990) Aneuploidy in *Drosophila*. III: Aneuploidogens inhibit *in vitro* assembly of taxol-purified *Drosophila* microtubules. *Environ Mol Mutagen* 16, 217-24.

Serrano L. (1985) Dominios estructurales y Funcionales del dímero de Tubulina: Implicaciones en la regulación de la polimerización y morfogénesis del microtúbulo, Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid.

Serrano L., Avila J. y Maccioni R. B. (1984) Limited proteolysis of tubulin and the localization of the binding sites for colchicine. *J Biol Chem* 259, 6607.

Sieber S. M., Whang-Peng J., Botkin C., Knutsen T. (1978) Teratogenic and cytogenetic effects of some plant-derived antitumor agents (vincristine, colchicine, maytansine, VP-16-213 and VM-26) in mice. *Teratology* 18, 31-47.

Singer W. D., Jordan M. A., Wilson L, Himes R. H. (1989) Binding of vinblastine to stabilized microtubules. *Mol Pharmacol* 36, 366-70.

Skoufias A. D. y Wilson L. (1992) Mechanism of inhibition of Microtubule polymerization by colchicine: Inhibitory potencies of unliganded colchicine and tubulin-colchicine complexes. *Biochemistry* 31, 738-746.

Sobrier M. L., Couderc J. L., Chapel S., Dastugue B. (1986) Expression of a new beta tubulin subunit is induced by 20-hydroxyecdysone in *Drosophila* cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun* 134,191-200.

Sorsa M., Hemminki K. y Vainio H. (1985) Occupational exposure to anticancer drugs – Potential and real hazards. *Mutation Res/Reviews in Genetic Toxicology* 154, 135-149.

Stopper H., Eckert I., Schiffmann D., Spencer D.L. y Caspary W.J. (1994) Is micronucleus induction by aneugens an early event leading to mutagenesis?, *Mutagenesis* 9, 411-6.

- Stratton M. R., Campbell P. J., Futreal P. A. (2009) The cancer genome. *Nature* 458, 719-724.
- Sunkel CE *et al* (1995) Gamma-tubulina is required for the structure and function of the microtubule organizing centre in *Drosophila* neuroblasts. *Embo J* 14, 28-36.
- Szabad J. (1986) A genetic assay for the detection of aneuploidy in the germ-line cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 164, 305-26.
- Szabad J., Würgler F. E. (1987) A genetic assay to detect chromosome gain and/or loss in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 180, 201-6.
- Tateno H. *et al* (1995) Induction of aneuploidy in Chinese hamster oocytes following *in vivo* treatments with trimethoxybenzoic compounds and their analogues. *Mutat Res* 327, 237-46.
- The analysis of the activity of aneugenic chemicals, from cultured cells to rodent zygotes: An overview of the Protection of the European Population from Aneugenic Chemical (PEPFAC project) (2008). *Mutation Research* 651, 1-2.
- Tijet N., Helvig Ch., Feyereisen R. (2001) The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: Annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene* 262, 189-198.
- Thybaud V., Aardema M., Casciano D., Dellarco V., Embry M. R., Gollapudi B. B., Hayashi M., Holsapple M. P., Jacobson-Kram D., Kasper P., MacGregor J.T., Rees R. (2007) *Mutation Research* 633 (2007) 67–79.
- Tinwell H. and Ashby J. (1991) Micronucleus morphology as a means to distinguish aneugens and clastogens in the mouse bone-marrow micronucleus assay. *Mutagenesis* 6, 193–198.
- Tokai N., Fujimoto-Nishiyama A. Toyoshima Y., Yonemura S., Tukita S., Inoue J. y Yamamota T. (1996) Kid, a novel kinesin-like DNA binding protein, is localized to chromosomes and the mitotic spindle, *EMBO J* 15, 457-67.
- Tood N., Clements J., Zoeller P y Phillips M. (1983) Absence of a mutagenic effect

- after feeding 4 anti-cancer drugs to *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res* 120, 121-125.
- Travis C. (1988) Carcinogen risks assessment, Plenum Press, Londres, pp. 8-9.
- Uppuluri S., Knipling L., Sackett D. L., Wolff J. (1993) Localization of the colchicine-binding site of tubulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 11598-602.
- Valencia R., Abrahamson S., Von Halle W., Woodeuff R., Würgler F. E. y Zimmering S. (1984) Chromosome mutations test (SCLT) for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res* 134, 61-88.
- Van Hummelen P., Deleener A., Vanparys P., Kirsch-Volders M. (1992) Discrimination of aneuploidogens from clastogens by C-banding, DNA and area measurements of micronuclei from mouse bone marrow. *Mutation Res* 271, 13-28.
- van Schaik N., Graf U. (1993) Structure-activity relationships of tricyclic antidepressants and related compounds in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 286, 155-63.
- Vega L. L., Yaschine A. C., González G. A. U., Levi M. A., Galicia M. E., Aguirre H. E., Ordaz MG y Ramos M. P. (1990) Obtención de la curva de respuesta inducida por distintas concentraciones de DMN en células del ojo de *Drosophila melanogaster*. En memorias de la I reunión Nacional de investigación de la Sociedad Mexicana de Genética, La Trinidad Tlaxcala, México.
- Vega S. (1985) Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales, Toxicología IV, Carcinogénesis química, Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. *Organización Panamericana de la Salud y la Organización Mundial de la Salud* 10:1-47.
- Vian L., Van Hummelen P., Bichet N. Gouy D. y Krish-Volders M. (1995) Evaluation of hydroquinone and chloral hydrate on the *in vitro* micronucleus test on isolated lymphocytes. *Mutation Research* 334,1-7.
- Voguel E. y Sobels F. (1976) The function of *Drosophila* in genetic toxicology testing.

Chemical Mutagens 4, 93-142.

- Vogel E. y Natarajan A. (1979a) The relation between reaction kinetics and mutagenic action of monofunctional alkilating agentes in eukaryotic systemas. I. Recessive lethal mutations and translocations in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res* 62, 51-100.
- Vogel E. y Natarajan A. (1979b) The relation between reaction kinetics and mutagenic action of monofunctional alkilating agents in eukaryotic systemas. II. Total and partial sex chromosome loss in *Drosophila*. *Mutation Res* 62,101-123.
- Vogel E. W. (1985) Summary report on the performance of the *Drosophila* assays, En: Progress in Mutation Res. Vol. 5, Ashby J. de Serres Eds., Elsevier. pp 47-57.
- Vogel E. W. y Ramel C. (1988) Mutagenesis assays with *Drosophila*. En: Evaluation of short-term tests for carcinogens. Ashby J., F. de Serres, M. D. Shelby, B. H. Margolin, M. Ishidate y G. C. Becking Eds., Report of the International Program on chemical Safety's Collaborative study on in vivo Assays II, WHO, Cambridge, pp. 277-285.
- Vogel E. W. (1992) Tests for recombinagens in somatic cells of *Drosophila*. *Fund and Mol Mech Mutag* 284,159-175.
- Vogel E. W. y Nivard M. J. M. (2000) Parallel monitoring of mitotic recombination, clastogenicity and teratogenic effects in eye tissue of *Drosophila*. *Mutation Res* 455, 141-153
- Vogt E., Kirsch-Volders M., Parry J., Eichenlaub-Ritter U. (2008) Spindle formation, chromosome segregation and the spindle checkpoint in mammalian oocytes and susceptibility to meiotic error. *Mutation Res* 651,14 -29.
- Warr T. J., Parry E. M., Parry J. M. (1993) A comparison of two in vitro mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens. *Mutation Res* 287, 29 -46.
- Weisenberg R. (1972) Microtubule formation *in vitro* in solutions containing low

- calcium concentrations, *Sci* 177, 1104.
- Weisenberg R., Borisy G. G., Taylor E. W. (1968) The colchicine-binding protein of mammalian brain and its relation to microtubules. *Bioch* 7, 4466.
- Wendell K. L., Wilson L., Jordan M. A. (1993) Mitotic block in HeLa cells by vinblastine: ultrastructural changes in kinetochore-microtubule attachment and in centrosomes. *J Cell Sci* 104, 261-74.
- Wheeler M. R. (1981) Cap. 95 *Drosophilidae*. En *Manual of Nearctic Diptera*. Research Branch Agricultural Canada. 1(27): 1011-1018.
- WHO (1984) Principles for Evaluating Health Risks to Progeny Associated with Exposure to Chemicals During Pregnancy. World Health Organization, Geneva, 175 pp.
- William B. C., Karr T. L., Montgomery J. M., Goldberg M. L. (1992) The *Drosophila* l (1)zw10 gene product, required for accurate mitotic chromosome segregation, is redistributed at anaphase onset. *J Cell Biol* 118, 759-73.
- Wittkopp P. J., True J. R., Carroll S. B. (2002) Reciprocal functions of the *Drosophila* Yellow and Ebony proteins in the development and evolution of pigment patterns. *Development* 129, 1849-1858.
- Woodruff R. C., Mason J. M., Valencia R y Zimmering S. (1985) Chemical mutagenesis testing in *Drosophila* V. Results of 53 coded compounds tested for the national toxicology program. *Environ Mutagen* 7, 677-702.
- Woodruff R. C., Seeger M. A. (1991) Test of a semiselective screen for induced aneuploidy in germ cells of *Drosophila melanogaster* females with structurally normal chromosomes. *Mutat Res* 252, 61-82.
- Wu C. T., Budding M., Griffin M. S., Croop J. M. (1991) Isolation and characterization of *Drosophila* multidrug resistance gene homologs. *Mol Cell Biol* 11, 3940-8.
- Wügler F., Juon H. y Frei H. (1983) Promutagens detected by a rapid test with *Drosophila* somatic cells (Abstract) *Experientia* 39, 686.
- Würgler F.E., y Graf U. (1982) Stability of *Drosophila melanogaster* chromosomes replicating for the first time in a repair-deficient cell. *Mutation Res* 92, 99-106.

- Würgler F.E., y Vogel E.W. (1986) *in vivo* mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*. In de Serres Fj (ed): "Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection", vol. 10 New York: Plenum Press, pp 1-72.
- Xing S.G., Shi X., Wu Z.L., Chen J.K., Wallace W., Whong W.Z. y Ong T. (1992) Transplacental genotoxicity of triethylenemelamine, benzene, and vinblastine in mice. *Teratog Carcinog Mutagen* 12, 223 -30.
- Yahuaca P., Amaya A., Rojkind M., Mourelle M., (1985) Cryptic adenosine triphosphatase activities in plasma membranes of CCl₄-cirrhotic rats. Its modulation by changes in cholesterol/phospholipid ratios. *Lab Invest* 53, 541-5.
- Yamaguchi M., Nishimoto Y., Hirose F., Matsukage A.(1995) Distribution of PCNA during postblastoderm cell division cycles in the *Drosophila melanogaster* embryo: effect of a string-mutation. *Cell Struct Funct* 20, 47-57.
- Zar J H (1999) *Biostatistic*, Prentice Hall, Londres. 731 p.
- Zecca M., Basler K., Struhl G. (1995) Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Develop* 121, 2265-78.
- Zijlstra J., y Vogel E.W. (1988a) Influence of inhibition of the metabolic activation on the mutagenicity of some nitrosamines, triazenes, hidrazines and seniciphylline. *Mutation Res* 202, 251-267.
- Zijlstra J., y Vogel E.W. (1988b) Metabolic inactivation of mutagens in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res* 198, 73-83.
- Zijno A., Quaggia S., Pacchierotti F. (1989) A cytogenetic approach to evaluate *in vivo* somatic aneuploidy. Effects of diethylstilboestrol on mouse bone marrow cells.
- Zimmering, S. (1976) Selected methodologies for mutagenicity testing in *Drosophila melanogaster*, Brown University. pp. 1-26.
- Zimmering S. (1983) The mei-9^a test for chromosome loss in *Drosophila*: A review of

assays of 21 chemicals for chromosome breakage. *Environ Mutagen* 5, 907-921.

Zimmering S. (1987) Aneuploidy in *Drosophila*. Alan R Liss, Inc. 32 p.

Zimmering S., Osgood C., Mason J. M. (1990) Aneuploidy in *Drosophila*, I. Genetic test systems in the female *Drosophila melanogaster* for the rapid detection of chemically induced chromosome gain and chromosome loss. *Mutation Res* 234, 319-26.

Jordan M. (1989) The effects of vinblastine in the SMART test in *Drosophila melanogaster*: chromosome-specific aneuploidy? *Mutat Res Letters* 194 p.

Jordan M., Osti M., Pesce M., Costa R. (1994) Chloral hydrate is recombinogenic in the wing spot test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res/Genetic Toxicology* 322, 111-116.

Sitios web

MD Consult Information Site: info.mdconsult.com

<http://www.mdconsult.com/das/pharm/body/283614138-3/0/full/147>

National Cancer Institute at the National Institutes of Health:

www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer

IARC International Agency for Research on Cancer

<http://www.icarc.fr>

Apéndice 1

Colchicina, CO.

Extraída a partir de plantas de la familia *Colchicum* y *Gloriosa superba* (Avila, 1990).

Desde el punto de vista médico, es clasificada como un agente anti-inflamatorio que tiene capacidad para inhibir la peroxidación lipídica (Rojkind, 1992), estabilización de la membrana (Yahuaca *et al.*, 1985) y reducción en los niveles de citocromo P-450 (Muriel *et al.*, 1994). Es un remedio ancestral para tratar dolores articulares. Es un agente de uso preferido en el tratamiento de artritis gotosa aguda, amiloidosis, enfermedad de Behcet's, dermatitis pseudogotosa, fiebre familiar del Mediterráneo, enfermedad de Paget's y pericarditis. También ha resultado benéfica en el tratamiento de la cirrosis biliar y hepática (<http://www.mdconsult.com>).

Fue el primer compuesto con el que se inició el estudio de la interacción de drogas con la tubulina. Su actividad citostática ha sido demostrada en diferentes líneas celulares (IARC, 1996).

Ha sido clasificada como aneuploidogéno (IARC, 1996) y se utiliza ampliamente en la quimioterapia del cáncer por sus propiedades antimitóticas, sin embargo, poco se sabe de su actividad mutagénica y teratogénica.

Presenta afinidad específica a la tubulina, previniendo el ensamble de los microtúbulos (MTs), de igual manera que algunos de sus derivados (ver tabla XX) y el grupo de los alcaloides de *Vinca* (*Cantharanthus roseus*).

Es metabolizada por el hígado y es dependiente de P-glicoproteínas e isoenzimas CYP3A4. Se distribuye hacia el riñón, hígado, bazo y tejidos intestinales, concentrándose principalmente en los leucocitos. Su eliminación puede ser a través del metabolismo o por la orina (<http://www.mdconsult.com>).

Se reporta que sus metabolitos son atrapadores de radicales reactivos que podrían formar radicales secundarios, los cuales exhiben reactividad alta para biomoléculas como los lípidos, tioles y el ascorbato (Mondriansky *et al.*, 2002).

En ratones, induce mutaciones y aberraciones cromosómicas en células linfoides a través del metabolismo celular (Honma *et al.*, 1999); induce no disyunción cromosómica sin cambios estructurales en el DNA (Honma *et al.*, 2001) y aberraciones cromosómicas numéricas y micronúcleos en células de médula ósea (Marrazzini *et al.*, 1994), sin embargo es negativo para la inducción de SCE (Pacchierotti *et al.*, 1991); en células meióticas de ratas machos, indujo micronúcleos centrómero positivo (57%), pero no muerte celular (Kallio *et al.*, 1995). En linfocitos de sangre periférica, la CO indujo arresto en metafase.

Apéndice 2

Compuestos derivados de la colchicina, CO.

R1	R2	Compuesto
CO – CH ₃	O – CH ₃	Colchicina
CH ₃	O – CH ₃	desacetil-N-metil-colchicina (demecolchicina, colcemid)
H ₃	O – CH ₃	desacetil-amino-colchicina
CO – CH ₃	- CH ₂ – CH ₂ = N <	Colchicamidas
CO – CH ₃	S – CH ₃	Thiocolchicina
CO – CH ₂ – F	S – CH ₃	Fluorthiocolchicina
CO – CH ₂ – Cl	S – CH ₃	Chlorthiocolchicina
CO – CH ₂ – F	S – CH ₃	N-fluoro-desacetilcolchicina
CO – CH ₃	O – CH ₃	Colchiceina
CH ₂ – CHCl – CN	OH	Chlorocianoetil (derivado de la N- desacetil-colchicina)
H	O – CH ₃	Ácido trimetilcolchicínico
CO – CH ₂ – Br	O – CH ₃	Bromocolchicina

Apéndice 3

Hidrato de cloral, HC.

Clasificado como un compuesto angioplítico, sedante e hipnótico. Es una sustancia controlada ya que se reconoce como una sustancia de tipo C-IV.

Fue producido comercialmente desde 1940 por clorinación del etanol. A partir de 1970, su mayor uso fue en la producción del insecticida DDT y también como intermediario en la producción de otros insecticidas (metoxiclor, triclofon y diclorvos) y herbicidas. De uso alternativo a las benzodiazepinas; empleado como sedante en tratamientos dentales. Su uso fue aprobado por FDA en 1938.

Su mecanismo de acción es desconocido, sin embargo sus efectos sobre el sistema nervioso central se le atribuyen a su metabolito activo, el tricloroetanol. El HC es reducido por la enzima alcohol deshidrogenasa a su metabolito primario, el tricloroetanol, en el hígado y en eritrocitos. Pocas cantidades de ambas moléculas pueden ser metabolizadas a través de la oxidación a ácido tricloroacético en el hígado y riñones. El ácido tricloroacético es excretado en la orina y bilis en compañía del tricloroetanol en forma libre o conjugada.

Existen numerosos reportes sobre su toxicidad genética. Se reporta como un mutágeno y clastógeno débil; induce aneuploidías en una amplia variedad de tipos celulares, actividad que se relaciona con su capacidad para interferir con el aparato del huso. Se requiere de concentraciones altas para que los efectos sean observables. En conjunto, se considera que existen evidencias de actividad carcinogénica, sin embargo el peso de éstas no son lo suficientemente sólidas para conducir a una evaluación de riesgo asumiendo una respuesta lineal a exposición baja (DRAFT, 2003).

Actividad aneugénica asociada a retraso en el ciclo celular, hiperploidia, no-disyunción e hipoploidía. Es considerado un clastógeno dependiente de fase S (Natarajan *et al.*, 1993; Warr *et al.*, 1993; Vian *et al.*, 1995). En machos de rata induce c- mitosis (Miller and Adler, 1989) y en células germinales de hembras de rata altera el huso mitótico, la citocinesis, la progresión del ciclo celular (Eichenlaub and Betzendahl, 1995) y provoca alteraciones cromosómicas de tipo numérico y estructurales (Maihes *et al.*, 1993). A concentraciones de 60 mM, inhibe el ensamblaje de tubulina en condiciones *in vitro* (Brunner *et al.*, 1991) e induce aneuploidia mitótica

(Natarajan *et al.*, 1993). Induce la formación de micronucleos (Van Hummelen and Kirsch-Volders, 1992; Ferguson *et al.*, 1993), los cuales contienen todo el cromosoma, fragmentos ecéntricos (Antoccia *et al.*, 1993); también induce aberraciones cromosómicas de tipo numérico en células de médula ósea de ratón (Marrazzini *et al.*, 1994). Se reporta que tiene actividad mutagénica, citotóxica y clastogénica en células de linfoma de ratón (Harrington-Brock *et al.*, 1998); se ha determinado su capacidad para inducir micronúcleos con cinetocoro negativo en células germinales de ratón, sin discriminar su origen a partir de rompimiento o pérdida cromosómica (Allen *et al.*, 1994).

La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) revisó los datos disponibles sobre su actividad carcinogénica y determinó debido a que existen “evidencias limitadas” de su actividad en animales experimentales y “evidencia inadecuadas” en humanos, que no puede ser incluido en el grupo 3 (IARC, 1995y 2002; <http://www.iarc.fr>). La Agencia de Protección Ambiental (2000) determinó que el hidrato de cloral muestra evidencias sugerentes de actividad carcinogénica en humanos a través de la exposición por vía oral.

Apéndice 4

Vinblastina, VB.

Miembro de la familia de los alcaloides de *Vinca*, extraídos a partir de *Catharanthus rosea*.

Los derivados de *Vinca* muestran diferente toxicidad y alta eficiencia para retrasar el crecimiento de tumores cancerosos, siendo la VB mejor inhibidor de la proliferación celular que la vincristina (Jordan *et al.*, 1985). De manera adicional, estos compuestos interfieren con procesos celulares como la síntesis de DNA y RNA, biosíntesis de lípidos, metabolismo cíclico de nucleótidos y metabolismo del glutatión y calmodulina dependiente del transporte de calcio (Skoufias y Wilson, 1992).

Agente citostático utilizado en el tratamiento de carcinoma de mama y de vejiga, enfermedad de Hodgkin's, melanoma y carcinoma testicular. La FDA aprobó su uso en 1961.

Presenta metabolismo hepático vía la isoenzima CYP3A4 y es eliminada a través de la bilis y las heces fecales. Se distribuye a través de muchos tejidos, uniéndose rápidamente a los leucocitos y plaquetas. Su eliminación se describe por el modelo de tres compartimentos: la vida media-alfa es < 5 minutos, la vida media beta = 50 -155 minutos y la eliminación final se da entre 23 - 85 horas. Se ha reportado solo un metabolito activo, el desacetilvinblastina (VDS), el cual podría ser tan activo como la molécula parental (Jordan y Thrower, 1992).

In vitro a [0.002 mM] inhibe el ensamblaje de la tubulina en células del cerebro de porcinos (Brunner *et al.*, 1991). En esplenocitos de ratón bloquea la citocinesis y la frecuencia de micronúcleos con centrómero positivo se incrementa después del tratamiento *in vitro* con VB. (Farooqi *et al.*, 1993). En células de médula ósea de ratón, induce micronúcleos y aberraciones cromosómicas de tipo numérico (Marrazzini *et al.*, 1994), pero no de tipo estructurales (Mailhes *et al.*, 1993) o intercambio de cromátidas hermanas (Xing *et al.*, 1992). Además de su actividad aneugénica, tiene potencial clastogénico en eritrocitos de ratón (Grawe *et al.*, 1997). En ratón (Stopper *et al.*, 1994) y en linfocitos de humano (Huber *et al.*, 1996) aproximadamente el 85% de los micronúcleos inducidos *in vitro* contienen cinetocoros de los cuales, solo 50.7% inducidos en machos de rata son centrómero positivo (Kallio *et al.*, 1995). En ratón, a [0.5 - 2 mg/kg] mostró actividad genotóxica transplacentaria (Xing *et al.*, 1992). Honma *et al.*, (2001) reportaron que CO y VB inducen mutaciones por no-disyunción sin

cambios estructurales en el DNA y sugirieron un mecanismo en el que involucran una mutación recesiva mediada por aneuploidía, la cual podría promover el desarrollo de tumores. Por otro lado, VB es un potente inductor de muerte celular (Kallio *et al.*, 1995).

from the insertion site towards 3' side. So, this P-element insertion could be affecting the *frizzled* gene and so its functions, and it is worth investigating at greater detail. The molecular function of this gene is described as: Wnt receptor activity; Wnt-protein binding; transmembrane receptor activity; non-G-protein coupled 7TM receptor activity; G-protein coupled receptor activity. It is involved in many biological processes like anatomical structure development; cell communication; sensory organ development; signal transduction; macromolecule localization; protein localization; regulation of cellular component organization and biogenesis; Wnt receptor signaling pathway. Thus, this gene is reported to be involved in sensory system development and signal transduction pathways which are important for mediating sense of smell and learning and memory.

Acknowledgments: Financial assistance in the form of Research Fellowship from Indian Council of Medical Research (ICMR), New Delhi to J.A. is gratefully acknowledged. This project was funded by a grant of Defence Research & Development Organization (DRDO).

References: Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman 1990, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410; Khurana, S., 2003, M.Sc. Thesis. The Manipal Academy of Higher Education; Rodrigues, V., and O. Siddiqi 1978, *Proc. Indian Acad. of Sci. B.* 87: 147-160; Rodrigues, V., 1981, Ph.D. Thesis. Bombay University; Subhra Chakraborty, T., S. Pati Goswami, and O. Siddiqi 2008, *J. Neurogenet.* 11: 1-10; Wilson, C., R.K. Pearson, H.J. Bellen, C.J. O'Kane, U. Grossniklaus, and W.J. Gehring 1989, *Genes Dev.* 3: 1301-1313.



Exploring the mutagenic activity of colchicine in *Drosophila*.

Muñoz-Hernández, Adriana, Patricia Ramos-Morales*, and J. Armando Muñoz Moya.

Lab. Genética, Dpto. Biología Celular, Facultad Ciencias, UNAM. Circuito

Exterior de Ciudad Universitaria, C. P. 04510, México, D. F.; *Correspondence,

Tel/Fax (55)-56-22-51-94, e-mail: prm@hp.fciencias.unam.mx.

Introduction

Drosophila melanogaster has been used successfully to evaluate *in vivo* genetic endpoints resulting from DNA damage, and diverse mating systems have been employed to determine the effect of genotoxins on germinal and somatic cells. In the present study, we assayed colchicine (CO) for the induction of somatic mutation and mitotic recombination in the *Drosophila* Somatic Mutation and Recombination Test (SMART).

Material and Methods

Mating System

Standard cross (SC): 3-day-old virgin females from the *flr³/TM3, Bd^S* stock were mated with *mwh/mwh* males. From this cross, two types of progeny were recovered: inversion-free and inversion-carrier flies. During larval stage they are indistinguishable from one another. As adults, the presence of the *Bd^S* marker allows the classification of the progeny based on wing phenotype: wild-type wing borders in the inversion-free flies (+, *flr³ / mwh*, +), and nicks in the wing border of inversion-carrier flies (*TM3, Bd^S / mwh*, +) (Figure 1a).

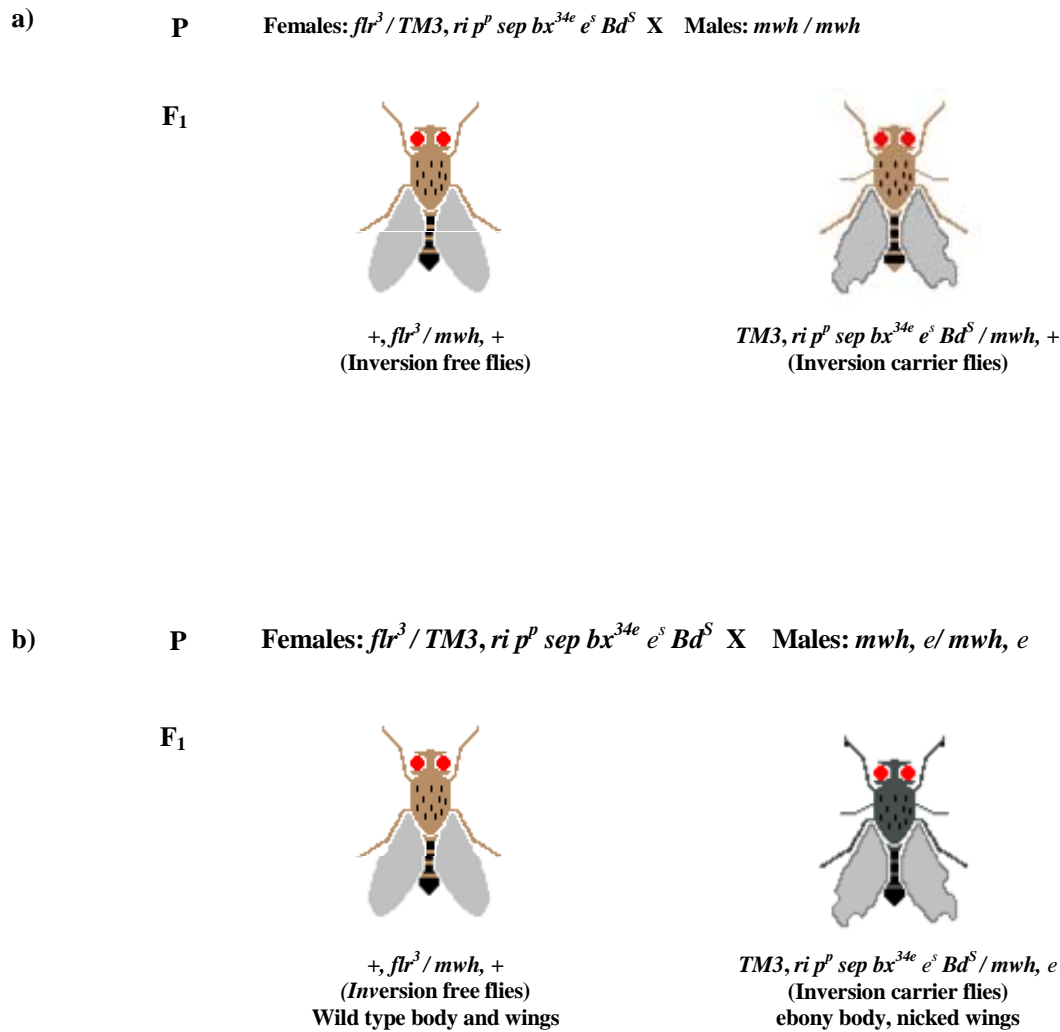


Figure 1. Cross and progeny obtained in the Mutation and Recombination test (SMART) in *Drosophila*. a) Standard Cross (SC); b) Modified cross (MC).

Modified cross (MC): 3-day-old virgin females from the $flr^3 / TM3, Bd^S$ stock were mated with $mwh e / mwh e$ males. Two types of progeny were recovered. The e marker was used as a second morphological trait to confirm the inversion-carrier phenotype. Inversion-carrier flies which carry the e marker on the $TM3, Bd^S$ chromosome became homozygous for the *ebony* marker and, in addition to nicked wings, had a dark body color (Figure 1b). For more detail of the markers, view Lindsley and Zimm (1992).

Chemicals

Colchicine (CO; CAS 64-86-8) was purchased from Sigma-Aldrich Química S. A. de C. V., Toluca, MX.

Treatments

Two types of treatments were performed.

a) Semi-chronic exposure. 72 ± 4 hr-old larvae from the SC were transferred to fresh medium supplemented with CO. Larvae remained feeding on this medium until pupation, for a total exposure period of 48 hr.

b) Interrupted exposure. 72 ± 4 hr-old larvae from the MC cross were transferred to medium supplemented with 0.125 mM CO. Groups of larvae were removed from the treatment medium at intervals of 6 hr, rinsed with tap water, and transferred to fresh standard food until adult emergence. The exposure times were: 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, and 48 hr (Figure 2) (Muñoz-Hernández, 1997).

In both treatments, the adult flies recovered were counted, sexed, classified by phenotype, and fixed in 70% ethanol.

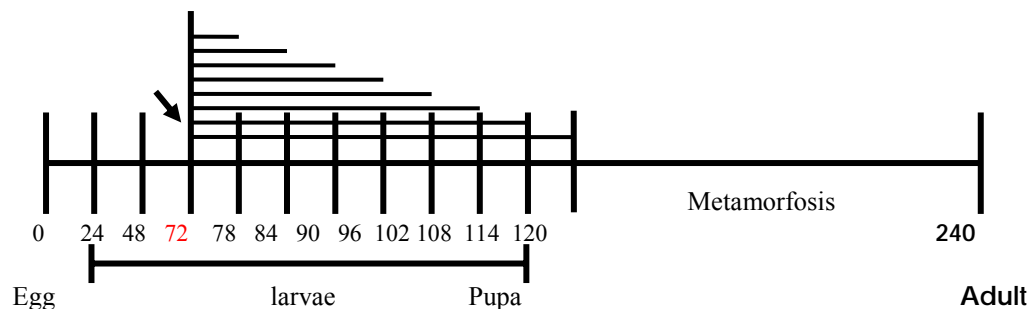


Figure 2. Interrupted treatment with colchicine.

Mounting of slides

Wings from 10 females and 10 males from each treatment/progeny combination were dissected in Faure's Solution and wing pairs were mounted on glass slides (Graf *et al.*, 1984). Slides were made from both types of the recovered progeny: inversion-free (wild type) and inversion-carriers (with nicks on the wing blade for the SC; or ebony body color and nicks on the wing blade for the MC).

Statistical analysis

SMART software was used for data processing (Frei and Wurgler, unpublished). The frequency of small, large, twin, and total spots from the experimental and control series were compared through the Multiple Decision Procedure (Frei and Würgler, 1988) in order to determine a positive, negative, inconclusive or weak positive diagnosis.

Results and Discussion

i. Semi-chronic exposure of SC flies in the SMART

Table 1 and Figure 3 show the total spot frequency obtained after exposure of third instar larvae to different concentrations of CO. Significant increases in inversion free flies were found at

0.063 and 0.125. With inversion-carrier flies, treatment with 0.063, 0.25, and 0.5 mM CO increased the total spot frequency. A change in the behavior of the curve between two types of progeny was observed at 0.125 and 0.25 mM.

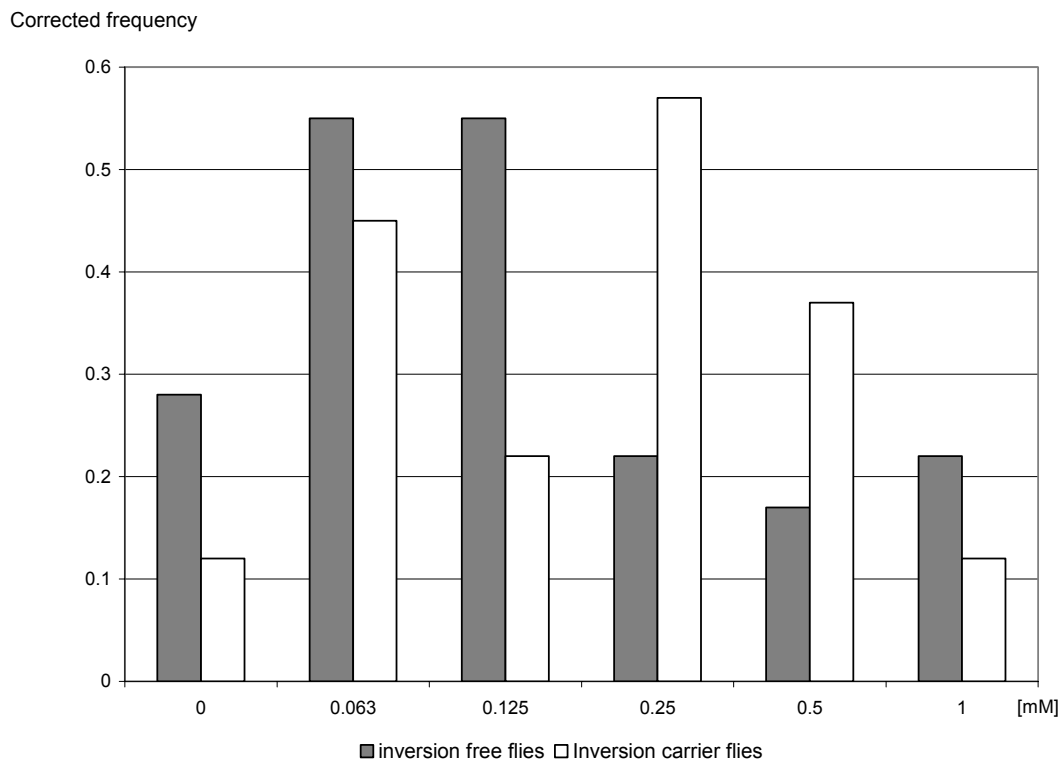


Figure 3. Corrected frequency of total spots from (SC) flies fed at different concentrations of colchicine.

Table 1. Frequency of total spots recovered from flies from the standard cross (SC) exposed to CO. Subchronic exposure (72 x 48 h).

Concentration [mM]	Number of Wings N	Total spots	
		Fr.	n
Inversion free flies			
0	80	0.28	(22) -
0.063	40	0.55	(22)+
0.125	40	0.55	(22)+
0.25	40	0.22	(9) --
0.5	80	0.17	(14) -
1.0	80	0.22	(18) -
Inversion carrier flies			
0	80	0.12	(10)
0.063	40	0.45	(18) +
0.125	40	0.22	(9) i
0.25	40	0.57	(23) +
0.5	80	0.37	(30) +
1.0	40	0.12	(5) -

Fr = Frequency; (n) number of spots. Statistical diagnosis according to Frei and Wurgler (unpublished). $\alpha = \beta = 0.005$. +, positive; -, negative; i, inconclusive; two side test. Distilled water was used as solvent and negative control

Comparison between the total spot frequencies in the two types of progeny indicated that the induction of spots was generally higher in inversion-carrier flies. These data apparently indicate that the CO effects could be associated with the presence of chromosomes with multiple inversions. Zordan (1989), using the *Drosophila* Somatic Mutation and Recombination Test (SMART), reported that multiple inversion-carrier flies seemed to have a greater sensitivity towards the genotoxicity of the aneuploidogen vinblastine than inversion-free flies. On the other hand, Lynch *et al.* (1991) reported that in *Drosophila* the exposure to diverse compounds induced among other malformations, nicked wings. Consequently, there was a possibility that this feature, which is used to classify the inversion-carrier flies in the SMART, would be expressed in inversion-free flies as a result of treatments with CO (which is a known aneuploidogen) and, therefore, some organisms would be misclassified as inversion carriers flies (named phenocopies) and an apparent mutagenic effect would be obtained.

Table 2. Frequency of spots per wing recovered from flies of the modified cross (MC) with different hours of exposure to [0.125 mM] colchicine. Interrupted exposure (72 x 6 h).

Length of exposure (h)	Number of Wings N	Type of Spots					
		Small Single		Large Single		Total spots	
		Fr.	n	Fr.	n	Fr.	n
Inversion free flies							
0	80	0.44	(35)	0.09	(7)	0.52	(42)
6	80	0.54	(43) -	0.10	(8) -	0.66	(53) -
12	78	0.72	(56)+	0.15	(12) -	0.91	(71)+
18	62	0.45	(28) -	0.08	(5) -	0.56	(35)-
24	80	0.60	(48) i	0.25	(20)+	0.86	(69)+
30	78	0.90	(70)+	0.10	(8) -	1.00	(78)+
36	40	0.65	(26) i	0.17	(7) i	0.85	(34)+
42	80	0.96	(77)+	0.09	(7) -	1.08	(86)+
48	40	0.62	(25) i	0.12	(5) -	0.75	(30) i
Inversion carrier flies							
0	80	0.32	(26)	0.06	(5) -	0.39	(31)
6	40	0.37	(15) -	0.05	(2) -	0.43	(17) -
12	78	0.49	(38) i	0.08	(6) -	0.56	(44) i
18	40	0.28	(11) -	0.25	(10)+	0.52	(21) i
24	40	0.37	(15) -	0.25	(10)+	0.62	(25) i
30	62	0.50	(31) i	0.10	(6) i	0.60	(37)+
36	112	0.27	(30) -	0.05	(6) -	0.32	(36) -
42	80	0.35	(28) -	0.06	(5) -	0.41	(33) -
48	64	0.50	(32) -	0.08	(5) -	0.58	(37) i

Fr = Frequency; (n) number of spots. Statistical diagnosis according to Frei and Würzler (unpublished). $\alpha = \beta = 0.005$. +, positive; -, negative; i, inconclusive; two side test. Distilled water was used as solvent and negative control for CO.

ii, *Interrupted exposure of MC flies in the SMART*

In order to evaluate this possibility, we carried out experiments using 0.125 mM CO, since with this concentration we find differences between the genotoxicity response in both two types of progeny using the SC, and:

a. Larvae from the MC (which carried the additional marker for body color, *ebony*) to identify the correct genotype of the progeny and discard phenocopies induction as the cause for the higher activity of CO on inversion-carrier flies. With this cross, inversion-free flies were heterozygous for the recessive marker (*e*) and had a wild-type body color, whereas inversion-carrier flies were homozygous for this marker and had a dark body color and nicks on the wing border (Figure 1b).

b. Different lengths of exposure to explore CO effect. Two vials containing larvae were withdrawn from treatment every 6 hours (beginning at 12 hr of exposure), rinsed, and put into fresh medium until development was complete; the maximum time of exposure was 48 hr.

Table 2 shows the spots per wing frequency obtained from flies from the modified cross (classified according to two markers: *Bd^S* and *e*). With this cross, the treatment of MC larvae yielded significant increases in the frequency of small (12, 30, and 42 hr of exposure), large (24 hr of exposure), and total spots (12, 24 to 42 hr of exposure) in inversion-free flies ($P < 0.05$). For inversion-carrier flies, small spots were not significantly increased by any exposure period, the frequency of large spots increased after 18 and 24 hr of exposure, and the increase in the frequency of total spots was significant only following 30 hr of exposure.

The fact that it is not possible to recover mutant spots through recombinogenic events in inversion-carrier flies leads us to the conclusion that the spots recovered in these flies were produced by a weak mutagenic activity of CO.

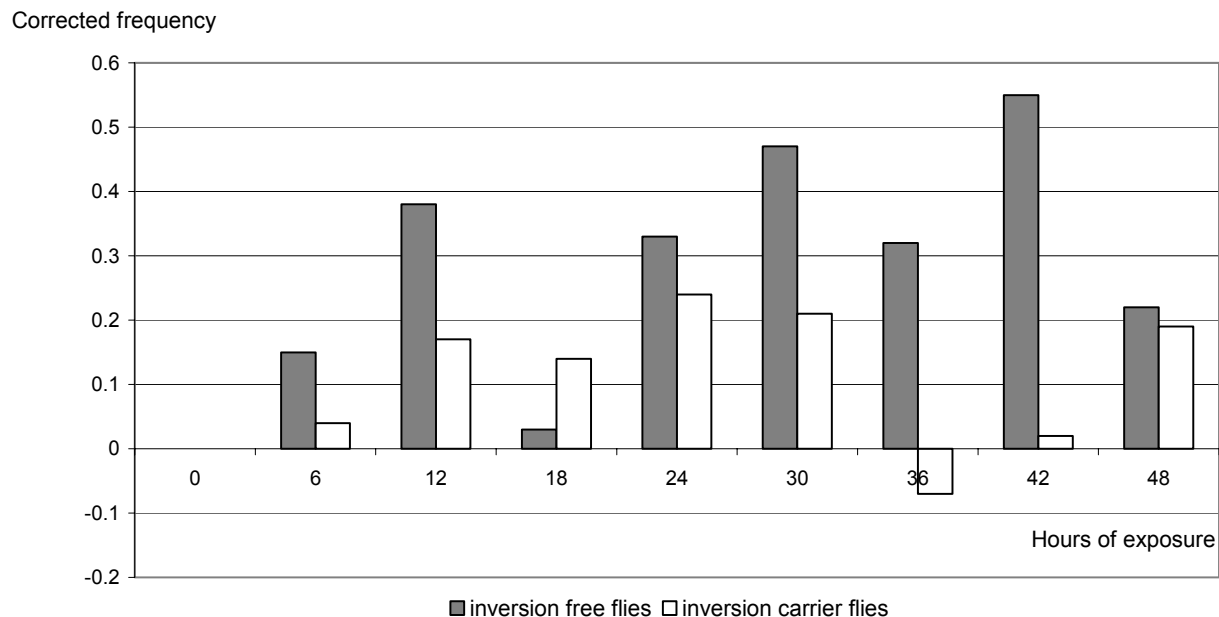


Figure 4. Corrected frequency of total spots from MC flies fed at different time of exposure with 0.125 mM of colchicine.

Figure 4 shows the corrected frequencies of total spots from the two types of progeny. The corrected spot frequencies in experimental series were obtained by subtracting the number of spontaneous spots; hence, the corrected frequencies correspond to an estimate of the mutant spots actually induced by the compound. Using both two markers to identify the progeny phenotype, data show that the corrected frequency of total spots in inversion-free flies was clearly higher than the corrected frequency in inversion-carrier flies.

In the present study, the observed genotoxic effect suggests that CO, in addition to aneuploidogenic activity, is a mutagen that induces spots in the SMART of *Drosophila*. The use of a second marker (ebony) improved the classification of the phenotypes of the progeny analyzed.

More experimental evidence needs to be obtained to explore whether the nicks on the wings induced in treated flies could be associated to aneuploidogenic activity and, in consequence, whether the alteration in the border of wings could be an auxiliary tool to identify compounds with aneuploidogenic activity.

Acknowledgments: To: Biol Hugo Rivas Martinez, who helped with some of the schemes used in this paper; Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Programa de Apoyo a Estudios de Posgrado (PAEP), Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) and Programa de Apoyo a Proyectos de Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME).

References: Clare, M.G., G. Lorenzon, L.C. Akhurst, D. Marzin, J. van Delft, R. Montero, A. Botta, A. Bertens, S. Cinelli, V. Thybaud, E. Lorge 2006, *Mutation Res.* 607: 37–60; Frei, H., and F.E. Würigler 1988, *Mutation Res.* 203: 297-308; Graf, U., F. Würigler, A. Katz, H. Frei, H. Juon, C. Hall, and P. Kale 1984, *Environ. Mutagen.* 6: 153-188; Lindsley, DL, and G. Zimm 1992, *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic, Press, Inc., U.S.A., 1133 p; Lynch D.W., L.S. Ronald, D.H. Ronald, and D.G. Davis 1991, *Terat. Carcinog. and Mutag.* 11: 147-173; Muñoz-Hernández, A., 1997, *Comparación del potencial aneuploidógeno de compuestos citostáticos en células somáticas de D. melanogaster*. Tesis Maestría en Ciencias (Biología Celular), Fac. de Ciencias, UNAM, 70 p.



Mammals replacement: *Drosophila* is a reliable option for the screening of anti-inflammatory activity.

Muñoz-Moya, Armando, Patricia Ramos-Morales*, and Adriana Muñoz-Hernández.

Laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 3000, México D.F. CP 04510, MX.; *Correspondence, Tel/Fax (55)-56-22-51-94; e-mail: prm@hp.fciencias.unam.mx.

Introduction

Inflammation induced by chemical, physical, or biological agents implies both vascular and cellular reaction mediated by chemical factors. Chronic inflammation has been associated with several steps preceding cancer as cellular transformation, cellular proliferation, tissue invasion, angiogenesis, and metastasis (Mantovani, 2005). The cancer's risk increases in patients showing inflammatory processes (Ohshima *et al.*, 2003), and in cancerous patients the inflammation accelerates tumor growth and cancer progression.

Methods for screening compounds for anti-inflammatory activity use rodent models, which previously were injected with croton oil or similar agents as swollen inductors. After a period of