
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS

DIVISION DE CIENCIAS AGRONOMICAS



EVALUACION DE LA PRUEBA DE SMART EN PELOS DE
ALAS DE *Drosophila melanogaster*.

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERO AGRONOMO
ORIENTACION FITOTECNIA
PRESENTA
ALEJANDRO ARMENTA CAMARGO
LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL. ABRIL DE 1996.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS AGRONOMICAS

COMITE DE TITULACION
 IFI95013/96

SOLICITUD Y DICTAMEN

SOLICITUD

M.C. SALVADOR MENA MUNGUIA
 PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACION
 P R E S E N T E

Conforme lo indica la Ley Orgánica de la Universidad de Guadalajara y su Reglamento, así como lo establece el Reglamento interno de la División de Ciencias Agronómicas, hemos reunido los requisitos necesarios para iniciar los trámites de Titulación, por lo cual solicitamos su autorización para realizar nuestro TRABAJO DE TITULACION, con el tema:

"EVALUACION DE LA PRUEBA DE SMART EN PELOS DE ALAS DE Drosophila melanogaster"

ANEXO ORIGINAL Y DOS COPIAS DEL PROYECTO DE INVESTIGACION
 MODALIDAD: INDIVIDUAL

NOMBRE DEL SOLICITANTE	CODIGO	GENERACION	ORIENTACION O CARRERA	FIRMA
ALEJANDRO ARMENTA CAMARGO	094005477	90-95	ING.AGR.FIT.	

Fecha de solicitud 15 DE NOVIEMBRE DE 1995

DICTAMEN DE APROBACION

DIRECTOR: M.C. CARLOS ALVAREZ MOYA
 ASESOR: M.C. SALVADOR GONZALEZ LUNA
 ASESOR: DR. MARIO ABEL GARCIA VAZQUEZ

M.C. SALVADOR MENA MUNGUIA
 PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACION

AUTORIZACION DE IMPRESION

DIRECTOR
 M.C. CARLOS ALVAREZ MOYA

ASESOR
 M.C. SALVADOR GONZALEZ LUNA

ASESOR
 DR. MARIO ABEL GARCIA VAZQUEZ

Vo. Bo. Pde. del Comité

Fecha: 17-07-96

AGRADECIMIENTOS

- Al M.en C. Carlos Alvarez Moya , por haberme dado esa oportunidad y extenderme la mano para la realización de mi trabajo de titulación.

- A la Dra. Anne Santerre, por su asesosamiento incondicional y muy valioso.

- Al M. en. C. Salvador Gonzalez Luna, por su apoyo asesoramiento en varios aspectos.

- Al Dr. Mario Abel Vazquez, por su apoyo y asesoramientos.

- A la E.S.A.H.E. Escuela de ciudad Juárez, por haberme permitido iniciar mis estudios y por enseñarme a decidir las cosas con decisión y criterio.

- A mis padres. Rosario y Antonia , por su apoyo moral, económico, durante toda mi carrera incondicionalmente.

DEDICATORIA

- Amis padres Rosario y Antonia, que con su amor y cariño siempre me han motivado para seguir adelante y los cuales me han apoyado en toda mi trayectoria incondicionalmente.
- A mis hermanos Rosario, Ramón, Jesús, Martín, Dora Aida, María y a todos mis familiares , que han sido parte de mi vida y comparten mi alegría por la realización de este trabajo.
- Al M. en C. Carlos Alvarez Moya, por su valiosa amistad y asesoría.
- A mis compañeros de estudio, por permitirme una estancia agradable con muy bonitos recuerdos.
- A Diana , por todo su tiempo , paciencia y apoyo.

CONTENIDO

	pag.
Indice de figuras y graficas -----	I
Indice de cuadros -----	II
RESUMEN	
1. INTRODUCCION -----	1
1.1. Objetivos	
1.2. Hipótesis	
2. REVISION DE LITERATURA -----	5
2.1. Descripción del género Drosophila	
2.2. Alas de Drosophila -----	9
2.3. Sustancias químicas tóxicas -----	11
2.3.1. Sustancias farmacéuticas	
2.3.2. Plaguicidas	
2.3.3. Emisiones gaseosas	
2.4. Bioensayos o sistemas de prueba -----	13
2.4.1. Ensayos microbiológicos	
2.4.2. Ensayos en células de mamíferos	
2.4.3. Ensayos en insectos	
2.5. Otros agentes mutagénicos -----	17
2.5.1. Agentes físicos	
2.6. Mutación y cáncer -----	21
3. MATERIALES Y METODOS -----	24
3.1. Material utilizado.	
3.1.1. Material genético	
3.1.2. Material físico	
3.1.3. Material químico	
3.2. Métodos	
3.2.1. Metodología experimental	
3.2.1.1. Análisis estadístico	
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES -----	30
5. CONCLUSIONES -----	36
6. BIBLIOGRAFIA -----	37

CUCEBA



BIBLIOTECA CENTRAL

INDICE DE FIGURAS Y GRAFICAS

Fig.1 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*; todos los tiempos (en horas).

Fig.2 Discos imagales de *Drosophila melanogaster*.

Fig.3 Alas en estado normal de *Drosophila melanogaster*.

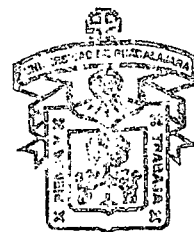
Fig.4 Prueba de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo (LRLS).

Fig.5 Ojo barrado (bar) en *Drosophila melanogaster*.

Fig.6 Tipos de pelos de *Drosophila melanogaster*; a) fenotipo mwh, b) fenotipo flr3.

Graf.1 Relación de la concentración y el número de mutaciones.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

INDICE DE CUADROS

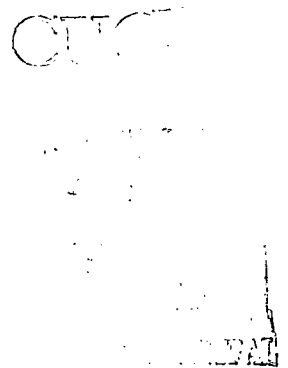
CUADRO 1 Pesticidas que se sabe o se sospecha causan cáncer,
E.P.A. Federal.

CUADRO 2 Sustancias reconocidas como cancerígenas.

CUADRO 3 Biensayos más utilizados.

CUADRO 4 Materiales utilizados, para la elaboración del medio
tradicional .

CUADRO 5 Resumen de los resultados obtenidos en la prueba de mutación y
recombinación somática (SMART) en el ala de *Drosophila*
melanogaster.



RESUMEN

Existe una gran cantidad de bioensayos para la detección de daño genético, sin embargo su alto costo y largos periodos de tiempo para obtener resultados son limitantes para un amplio uso de ellas. Un nuevo bioensayo llamado prueba de mutación y recombinación somática (SMART), ofrece ventajas sobre otras pruebas como son: mayor rapidez, mayor eficiencia y economía. Para lograr la optimización en el uso de la prueba de SMART en alas de *Drosophila melanogaster* y aplicarla posteriormente a otros estudios fue necesario verificar la eficiencia de la misma.

En el presente trabajo se estandarizó la prueba de SMART, se comparó la frecuencia de mutación inducida por diferentes sustancias mutagénicas y se evaluó su capacidad como sistema biológico para la detección de daño genotóxico.

El estudio se realizó bajo condiciones de laboratorio. Se utilizó como testigo (-) el etanol al 5%, y como testigos positivos (+) cinco compuestos químicos con capacidad mutagénica probada (excepto azida de sodio), uretano, etil nitroso urea, etil nitroso amida, hidrazina maleica. Se detectó que el uretano posee gran capacidad para causar daño genético y fue significativo con respecto al testigo (-), en similitud con el ENU en el cual su daño fue también muy significativo, y por arriba del uretano. Con respecto a la azida de sodio los resultados fueron inconclusos. En hidrazina maleica los resultados fueron negativos al igual que la etil nitroso urea.

Los resultados de la presente tesis nos permiten concluir que la prueba de SMART es un ensayo biológico eficiente para la detección de daño genotóxico, sin embargo debe ser complementada con otro sistema diferente.

1 INTRODUCCION

El desarrollo de las sociedades humanas se acompaña del uso de una cantidad elevada de agentes químicos (60 a 70 mil son comunes y muchos de ellos tóxicos) los cuales se utilizan en la industria, el hogar, el campo, etc; de tal manera que el hombre y otras especies que cohabitan con el se encuentran continuamente expuestos a tales agentes (Grimer, 1983). Es posible que un químico provoque no solamente daño fisiológico si no también mutaciones genéticas; cuando éste último ocurre lo hace atacando directa o indirectamente al ADN en diversas formas (mutaciones puntuales y alteraciones) (Heflich, 1991).

Para que el cáncer se desarrolle, el daño genético debe ser causado por los agentes químicos a nivel somático pero si la alteración sucede en las células germinales la aparición de dicho daño es expresada en las siguientes generaciones (Aust, 1991).

Muchos mutágenos químicos entran en contacto con el hombre a través de la actividad ocupacional o en su habitat, y hay trabajos que señalan relaciones entre el tipo de cáncer, la actividad ocupacional y la vía de entrada de la sustancia .

Por otra parte, aquellos que son contaminantes ambientales también representan riesgo genético siendo grave la exposición de las poblaciones ya sea de manera directa o a través de sus metabolitos (Albertini y Robinson, 1991). Gran cantidad de contaminantes químicos se hayan en los diversos ambientes, así por ejemplo los hidrocarburos aromáticos policíclicos, los bioxidos de azufre y de nitrógeno, las partículas de plomo (Molina, 1990), el cromo (Gomez et al. 1989) etc. Estos contaminantes se encuentran en distintos medios, agua, suelo.

Para la detección de la actividad mutagénica de los compuestos así como de las mezclas complejas se han desarrollado varios sistemas de prueba, entre ellos los microbianos (Würgler et al , 1985; De Marine, 1991) aunque también se emplean células de mamíferos (Lí y Lorenz, 1991) las cuales se basan principalmente en la observación de aberraciones cromosómicas y de intercambios de cromátidas hermanas (Preston , 1981; Ischidate, 1988) y a la visualización de cambios fenotípicos debido a la expresión de genes recesivos, ésto en algunas cepas de ratón (Rusell , 1981).

El problema que se presenta cuando se utilizan mamíferos radica en que el tiempo empleado para realizar las observaciones es muy largo y costoso .

Otra prueba incluyendo insectos que ha tenido éxito es la llamada de mutaciones letales recesivas ligados al sexo (LRLS) en *Drosophila melanogaster*, con ella se han logrado reconocer agentes mutagénicos de manera más económica que con otros sistemas de prueba animales (Lee et al., 1983) . Su gran desventaja es la gran cantidad de individuos que se tienen que analizar, el tiempo requerido para estos estudios y el número de personas que se requieren para el trabajo (Lee et al., 1983). En virtud de lo anterior se han desarrollado sistemas en células somáticas de *Drosophila melanogaster* para detectar la actividad mutagénica de diversos agentes, que se conoce como prueba de mutación y recombinación somática (SMART), con la cual no solo se determina la capacidad mutagénica si no también la recombinogénica (Graf et al., 1984; Graf, 1992). La importancia de la actividad recombinogénica radica en la asociación que existe entre ésta y la inducción de tumores cancerosos (Fahmy y Fahmy ,1970; Cairns ,1981; Graf et al., 1984; Würgler et al., 1985).

Una gran ventaja de esta prueba es que requiere solamente de una generación para la obtención de resultados además de tener la posibilidad de seleccionar cepas con altas capacidad metabólica para su realización (Graf, 1991).

En el presente trabajo se evaluó la efectividad de la prueba de SMART en alas de *Drosophila melanogaster*, que posteriormente será utilizada para la detección de daño genotóxico, provocado por agentes químicos cuya capacidad mutagénica sea desconocida.

CIENCIA

1992

ESTADO

182

1.1. OBJETIVOS.

- Evaluar la capacidad de la prueba de SMART en alas de *Drosophila melanogaster* para detectar daño genético.
- Estandarizar la prueba de SMART en *Drosophila melanogaster*.
- Comparar la frecuencia de mutación inducida por diversos mutágenos en pelos de alas de *Drosophila melanogaster*.

1.2. HIPOTESIS

Algunas sustancias químicas son capaces de producir alteraciones o efectos mutagénicos, dichos efectos pueden ser detectado en forma rápida, eficiente y económica a través de la prueba de SMART en alas de *Drosophila melanogaster*.

CUCBA



BIBLIOTECA

REVISION DE LITERATURA

2.1 DESCRIPCION DEL GENERO DROSOPHILA

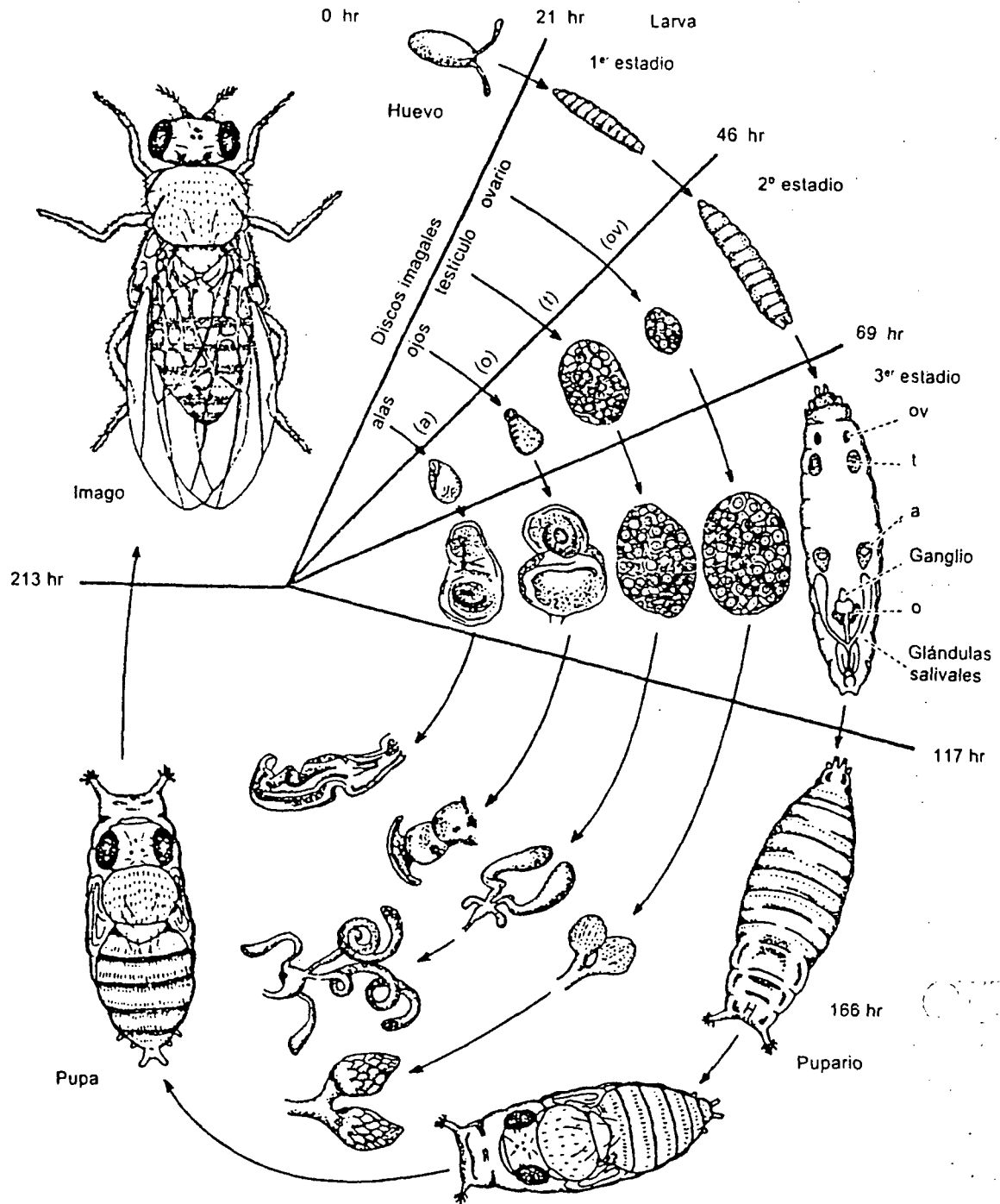
La mosca de la fruta es un insecto que pertenece al orden **Diptera** que agrupa aquellos organismos en los que sólo el primer par de alas es funcional y el segundo se ha transformado en órgano del equilibrio , los llamados halterios o balancines. *Drosophila* es un organismo representativo de la familia **Drosophilidae** la que incluye a mosquitas pequeñas , con algunas cerdas y venación . El género *Drosophila* comprende varias especies de moscas con la vena subcostal degenerada , incompleta o ausente. Las pertenecientes a la especie *melanogaster* , tienen interrupciones en la vena costal .(Ramos, 1993).

CICLO DE VIDA

El desarrollo de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* presenta un periodo de embriogénesis dentro del huevo y una sucesión de estadios larvales que culminan con una metamorfosis completa (holometabola), de la que finalmente surge un imago o adulto. La secuencia y duración de los diferentes estadios en el ciclo de vida son : huevo, un día ; larva de primer estadio , un día ; de segundo, un día , y tercero, un día ; pupa, 4.5 a 5 días (Fig. 1).

Así, la duración del ciclo de vida completo es de 9.5 a 10 días en condiciones controladas de temperatura y humedad relativa , 25°C y 60%, respectivamente .

Figura 1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*, (tiempo en horas)



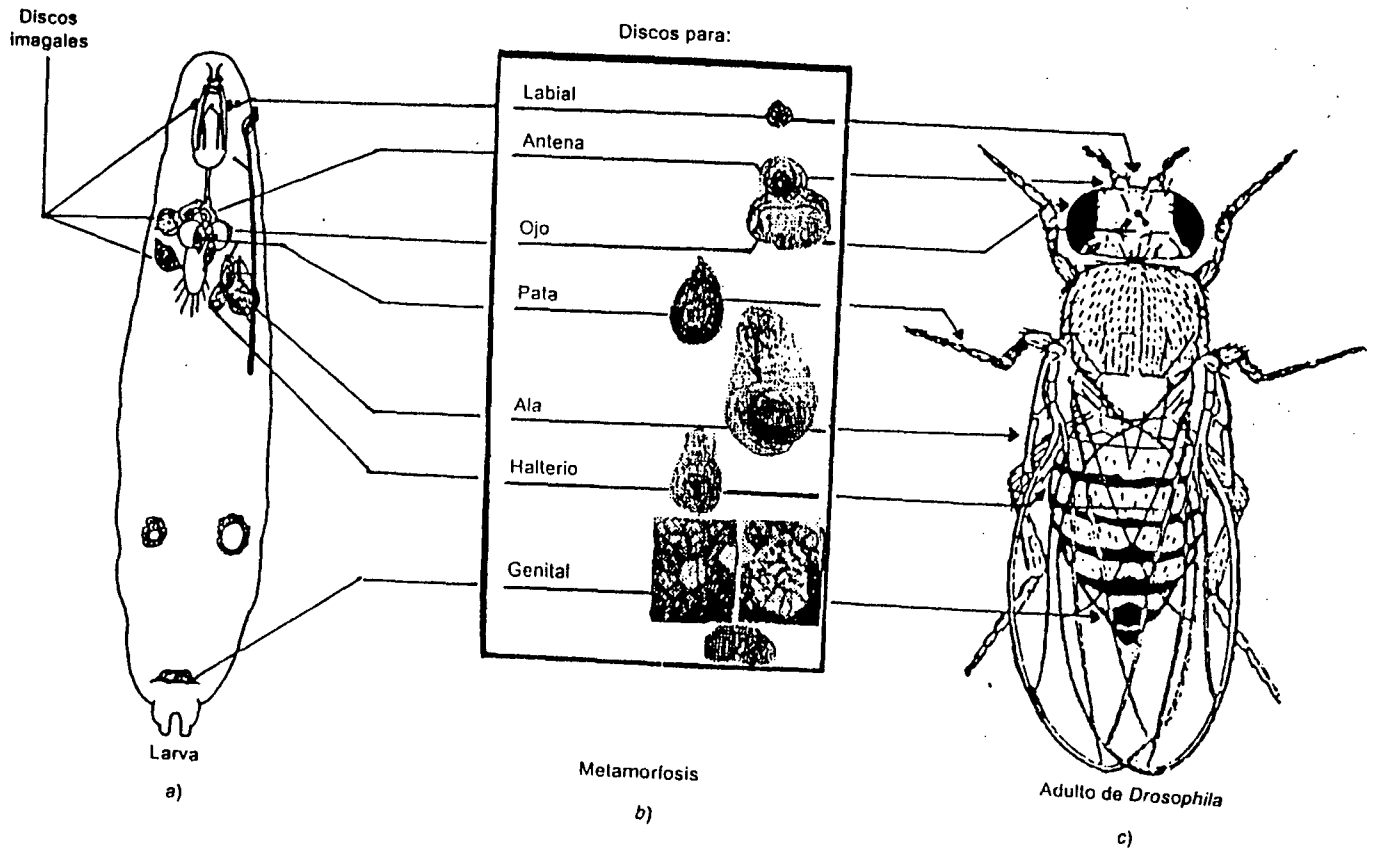
Huevo. El huevo es de color blanco lechoso , tiene una longitud promedio de 420 micras (1 u =10-3 mm) , la superficie dorsal es aplanada y la ventral algo convexa , tiene un par de filamentos delicados que son extensiones del **corión** situados en la región anterodorsal , los cuales impiden que se hunda el huevo en la superficie blanda del medio de cultivo (Fig . 1).

El huevo maduro está revestido por dos membranas , la interna es transparente y corresponde a la membrana vitelina la cual rodea el contenido protoplasmático, mientras que la externa o **corión** es firme , opaca y está ornamentada con figuras hexagonales o pentagonales producidas por las impresiones de las células foliculares ováricas.

Larva. Después de un día de desarrollo embrionario , eclosiona del huevo una pequeña larva , el color del cuerpo es blanco y está formado de doce segmentos no aparentes :1 segmento de la cabeza , 3 torácicos o **exocutícula** y la interna o **endocutícula** .

La larva presenta dos linajes celulares diferentes : las **células larvarias** y las **imagales** . Las células larvarias forman el cuerpo de la larva , se caracterizan porque han perdido la capacidad de división y solo aumentan su volumen ; en algunas se presentan cromosomas politénicos, son poliploides y están determinadas y diferenciadas genéticamente . Las células imagales no estan involucradas en la formación del cuerpo de la larva pero si de la mosca adulta y son distinguibles de las primeras porque tienen tamaño pequeño, constitución cromosómica diploide , retienen la capacidad de división celular, están determinadas genéticamente pero se diferencian hasta que la larva entra a la metamorfosis. Estas células se localizan en estructuras características denominadas **discos imagales** , cada disco dará origen a una estructura de la mosca adulta (Fig. 2).

Figura 2. Discos imagales de *Drosophila melanogaster*.



Pupa. En el último estado larvario, la larva que es delgada y blanquesina se endurece y torna oscura, posteriormente se forma el **pupario** (Fig. 1). Durante la metamorfosis, la hormona ecdisona desencadena una serie de cambios en el organismo, los cuales involucran la destrucción de ciertos tejidos y órganos larvarios (histólisis) y la organización de las estructuras del adulto a partir de los llamados **discos imagales**. El estado pupal toma de 3-5 días y termina cuando emerge el **imago** o adulto.

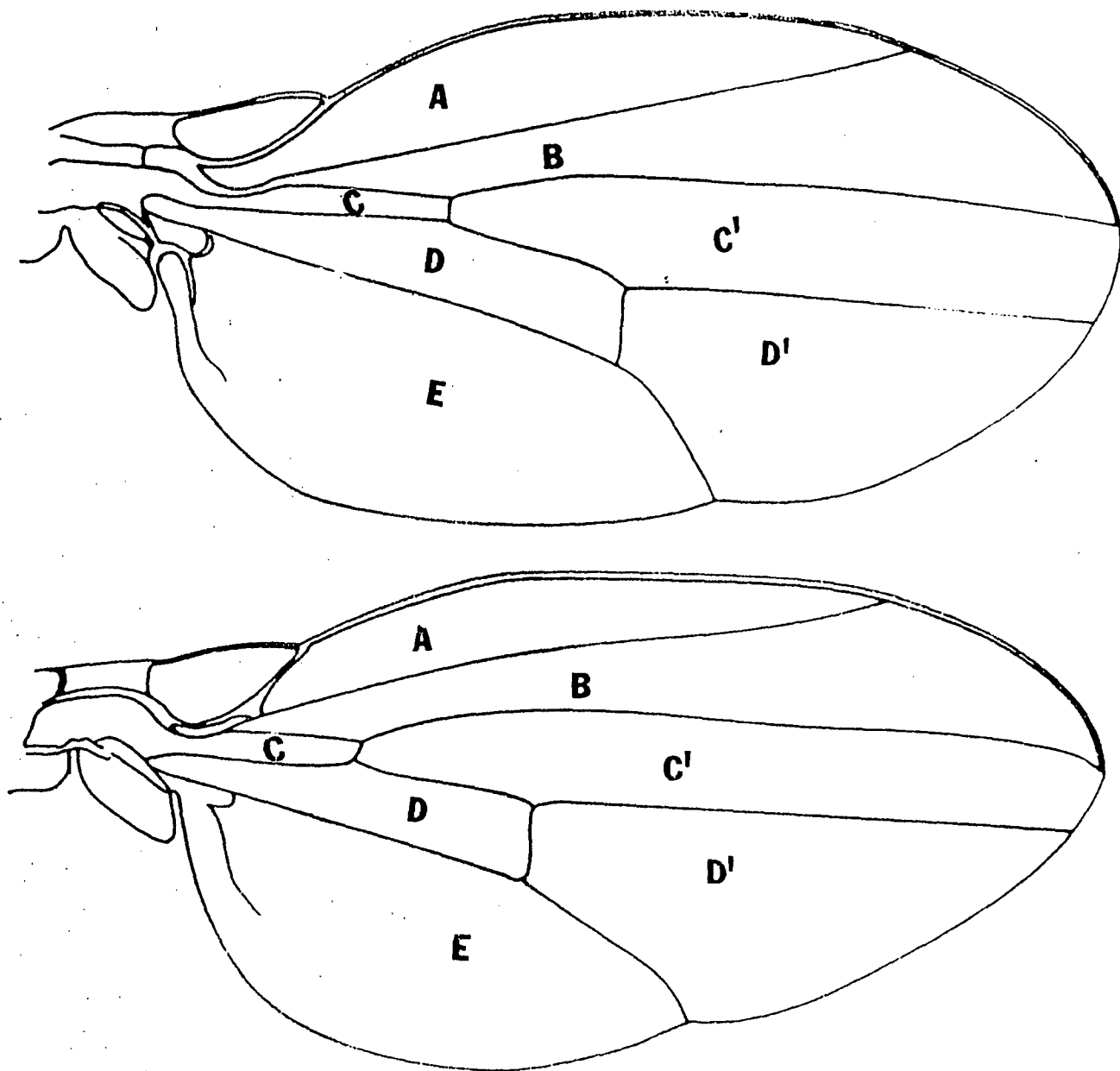
Adulto. El imago rompe el extremo anterior del pupario por donde sale. Al principio el cuerpo de la mosca es alargado, sin el pigmento característico y tiene las alas totalmente plegadas; durante una hora aproximadamente la mosca **inyecta** linfa a las alas (que son una especie de sacos que se extienden en forma gradual hasta quedar turgentes). A medida que pasa el tiempo el adulto adquiere su color característico. También aquí es la etapa reproductiva de este organismo; el imago alcanza la madurez sexual a las 8 o 9 horas de edad (Fig. 1).

2.2. ALAS DE DROSOPHILA MELANOGASTER

Estas partes son de gran importancia en *Drosophila melanogaster* para la detección de daño mutagénico. Las alas se dividen en cinco zonas (Fig. 3).



Figura 3. Alas en estado normal de *Drosophila melanogaster*.



2.3. SUSTANCIAS QUIMICAS TOXICAS

2.3.1 Sustancias farmacéuticas . Es innegable la importancia de los productos farmacéuticos para el tratamiento de enfermedades , nó obstante en los últimos años se ha dado una atención especial a los peligros de la medicación . Ciertos tipos de medicamentos o la administración simultanea pueden dar lugar a consecuencias inesperadas. La talidomida ejemplifica lo anterior, a principios de los sesentas esta sustancia provocó malformaciones congénitas (Vega, 1985) . Hoy se sabe que algunos fármacos y hormonas pueden producir cáncer (Higginsón, 1975; Hoover y Fraumeri, 1975.)

2.3.2 Plaguicidas . Los plaguicidas son sustacias químicas ampliamente utilizadas en todo el mundo no obstante muchos de ellos han provocado daños ecológicos enormes (DDT , ALDRIN , DIELDRIN) debido principalmente a su baja tasa de biodegradabilidad . Por otra parte, su efecto directo en el hombre abarca daños que van desde simples irritaciones epidérmicas hasta envenenamientos , mutaciones genéticas, cáncer y finalmente la muerte (Gomez, 1992).(Cuadro 1).

2.3.3 Emisiones gaseosas . Producto de la actividad industrial y automovilística una gran cantidad de emisiones gaseosas (hidrocarburos , bióxidos y monóxidos de carbono por mencionar solo algunos), son vertidas al medio . La interacción química de ellos tiene efectos perjudiciales para la salud , el cáncer es uno de ellos pero más problemas pueden ser observados .

Cuadro 1. Pesticida que se sabe o se sospecha causan cáncer, E.P.A.FEDERAL

INSECTICIDAS	FUNGICIDAS	HERBICIDAS	FUMIGANTES
Anidro	Captafol	Acetocloro	DBCP
Arsenico	Captan	Aciflurofen	EDB
Cadmio	Clorotalonil	Alacloro	Dicloropropano
Clordano	Folpet	Amitroles	Dicloropropeno
Clorodimeform	Hexaclorobenzeno	Oxadiazón	felone II
DDT	Maneb		
Diclorvos	Mancozeb		
Dieldrin			
Heptacloro			
Propoxur			

2.4 BIOENSAYOS O SISTEMAS DE PRUEBA

Los estudios epidemiológicos pueden aportar evidencia respecto a que un agente induce mutaciones heredables en humanos , sin embargo , es difícil obtener tales datos debido a factores como ; variabilidad genética humana , número reducido de hijos , tiempos prolongados entre la generaciones (Vega, 1985; Li y Loretz, 1991). Por lo tanto en ausencia de datos epidemiológicos es apropiado atenerse a datos en sistemas experimentales sobre animales siempre que estén claramente expresadas las limitaciones (diferencias en el metabolismo y en los sistemas de reparación del ADN).

En muchos países se ha establecido el requisito de ensayo (agudo de corto plazo y crónico o de largo plazo) así se ha fijado normas y niveles de tolerancias y se elaboraron listas de compuestos permitidos y prohibidos (Vega, 1985)(Cuadro 2).

En los últimos años se desarrollaron una serie de bioensayos de corto tiempo para la observación de cambios genéticos para varios usos como son ; 1) búsqueda de productos ambientales con actividad carcinogénica , 2) identificación de carcinógenos en fluidos del cuerpo, 3) entendimiento de los mecanismos de la activación química de carcinógenos y sus reacciones con el ADN y ; 4) predicción de carcinogenicidad en sustancias químicas, este último es el más importante porque su interpretación es difícil. Generalmente para afirmar que una sustancia química es carcinogénica se requieren de dos o tres bioensayos (Casciano,1991).

CUBA



BIBLIOTECA CENTRAL

Cuadro 2. Sustancias reconocidas como cancerígenas en E.U.A.

Sustancias que constituyen un riesgo ocupacional conforme al acta N° 6 de salud y seguridad en el trabajo.

SUSTANCIAS	FECHA DE LEGISLACION
Asbesto	junio 7-1972 (37 reg.fed. 11318)
2-Acetilaminofluoren	Enero 291947(39 reg.fed. 3756)
Alfa-naftilamina	
4-Aminobifenil	
Bencidina	
Beta-naftalina	
Beta-propiolactona	
3,3-diclorobencidina	
4-Dimetilaminoazobenceno	
Eter bisclorometilico	
Eter clorometilmetilico	
Etilenermina	
4,4-metilen-bis(2-cloroanidina),(MCCA)	
N-Nitrobifenilo	
N-Nitrosodimetilamina	
Cloruro de vinilo	Octubre 4-1974(39reg.fed.35890)
Emisiones de onda hulla	Octubre 22-1976(41 reg.fed.46741)

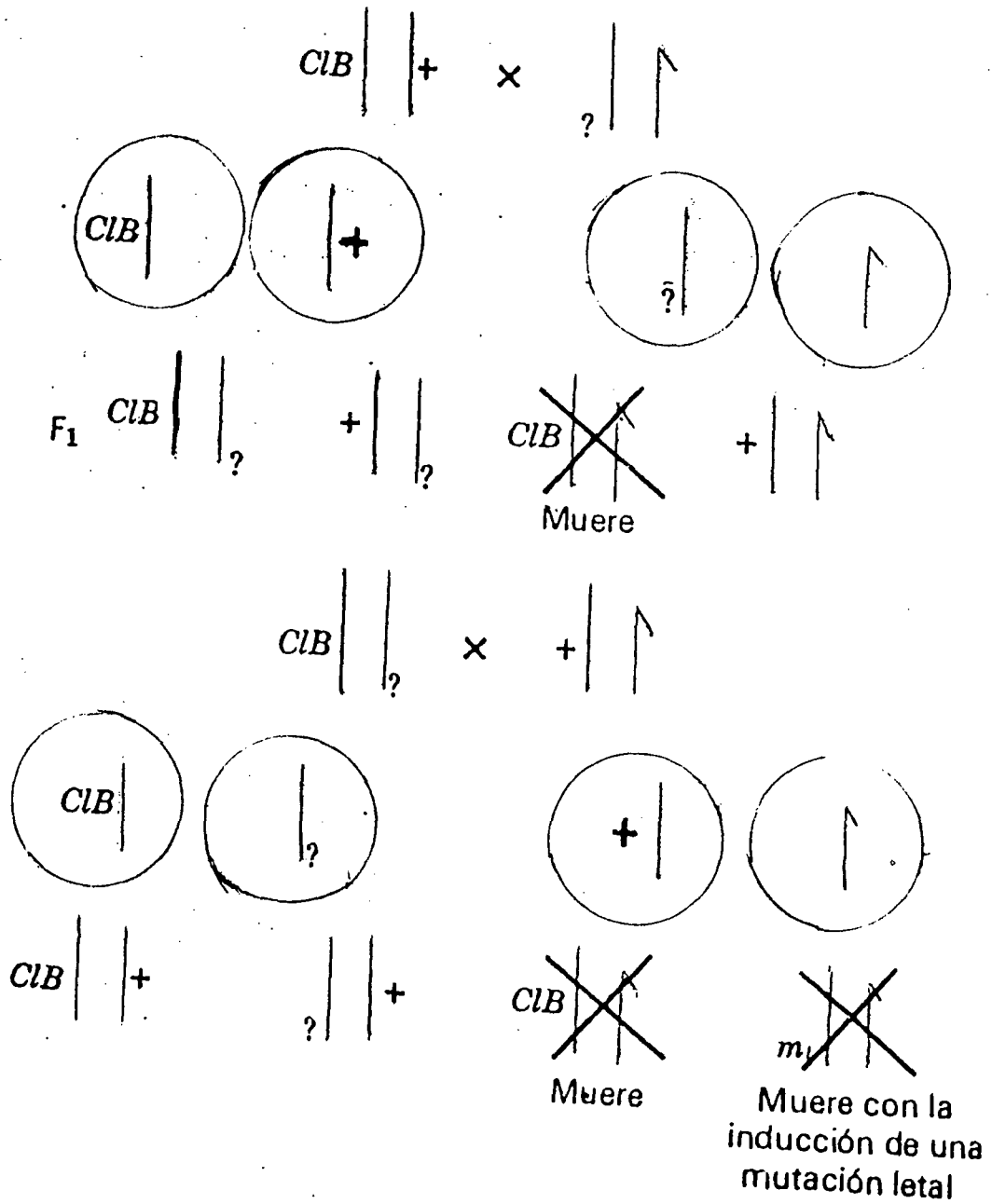
2.4.1 Ensayos microbiológicos . Los microorganismos fueron los primeros en utilizarse en genética toxicológica . El ensayo de reversión de histidina en *Salmonella typhimurium* (Ames , 1973), fue el primero usado para correlacionar mutagenicidad y carcinogenicidad . Son tres los bioensayos más utilizados con microorganismos ;a) reversión de histidina en *Escherichia coli* ; b) reversión de histidina en *Salmonella typhimurium* ;c) ensayos en *Saccharomyces cerevisiae* basados en la acumulación de pigmentos rojos en la cepa (Li y Loretz, 1991).

Las dos primeras son usadas para medir la dirección de la mutación que conduce a la reversión de las cepas especialmente construidas que requieren histidina en cuanto al tercero en *Saccharomyces cerevisiae* , las cepas ADE1 Y ADE2 forman colonias blancas cuando hay poco suplemento de adenina , cuando estas cepas mutan en los genes *ade1* y *ade2* la levadura formará colonias rojas (Li y Loretz, 1991).

2.4.2 Ensayos en células de mamíferos . Debido a las diferencias en la organización y complejidad del genoma se han utilizado células de animales para complementar los ensayos en microorganismos . Con células de mamíferos cultivadas , virtualmente todos los mecanismos de mutación pueden ser estudiados (mutación en un gen , aberraciones cromosómicas , intercambio de cromátides hermanas etc.) . La observación del cariotipo es la forma más simple para detectar mutaciones de tipo numérico y /o estructural (Kelsey, 1988; Ischidate et al, 1988; Salamanca, 1990) .

2.4.3 Ensayos en insectos . La prueba de letales recesivos ligados al sexo (LRLS) en *Drosophila melanogaster* (Fig.4) es uno de los bioensayos más utilizados a nivel internacional y surgió por la necesidad de abaratar el costo de las pruebas de mutagenicidad ya que , por ejemplo , el cultivo de células es un método sumamente costoso (Graf y Shalk, 1994) .

Figura 4. Prueba de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo (LRLS).



La prueba de LRLS se basa en la proporción de hembras machos de la F2 obtenidos después de que la generación parental fué sometida a un tratamiento. En este caso se utilizan hembras de la línea CIB (C=inversión cromosómica , I=letal recesivo y B= marcador ojo en barra),(Fig . 5).

El cuadro 3 presenta algunos de los principales bioensayos utilizados .

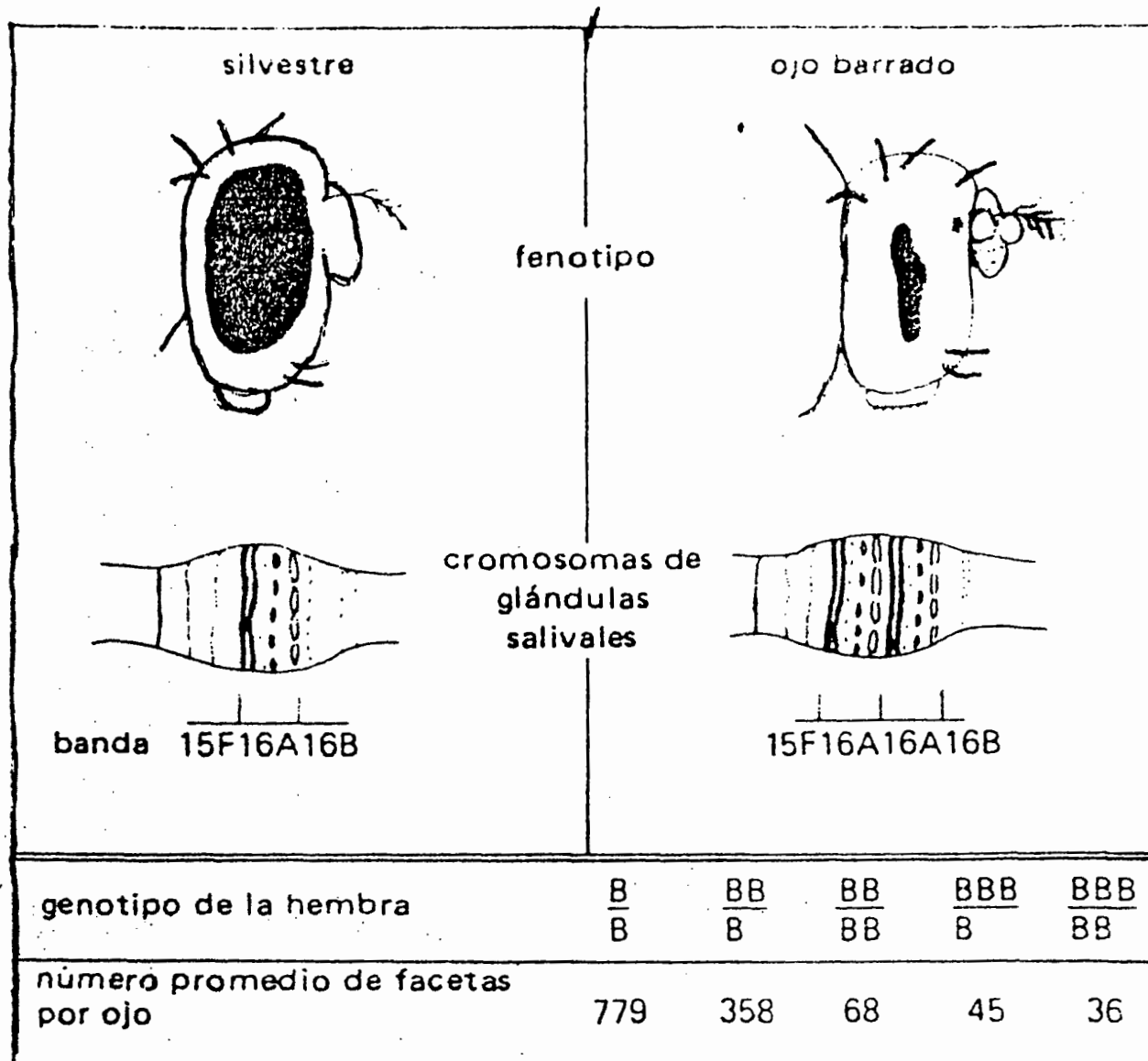
2.5 OTROS AGENTES MUTAGENICOS

2.5.1 agentes físicos. Al referirse a los métodos de estimación de frecuencia de mutación se dice que tales métodos servían para estimar la intensidad de acción de diversos agentes . Estos agentes , de los que se mencionan algunos que se consideran importantes, son también capaces, en general, de producir variaciones estructurales en los cromosomas .

El descubrimiento de los rayos X fue efectuado por Muller en 1927 y desde entonces se han venido acumulando datos sobre la inducción de mutaciones génicas y variaciones estructurales por este agente físico, siendo la *Drosophila melanogaster* el material que se ha usado con mas frecuencia . Generalmente se irradian los machos con una cierta dosis . Las mutaciones producidas por irradiación son con mucha frecuencia letales , mientras que las mutaciones con efecto fenotípico aparente son sólo alrededor de la décima parte de las letales (Lindsley, 1968).

Al parecer la temperatura tiene poca influencia mutagénica, sin embargo, los rayos X y otros tipos de radiaciones penetrantes, como las alfa , beta , y los protones y neutrones, son altamente mutagénicos.

Figura 5. Ojo barrado (bar) en *Drosophila melanogaster*.



Cuadro 3. Bioensayos más utilizados.

TIPO	NOMBRES	CARACTERISTICA OBSERVADAS	VENTAJA	DESVENTAJA
prueba en <i>Drosophila</i>	LRLS	proporción de machos y hembras	economía y rapidez	gran cantidad de moscas y personal
Prueba en <i>Drosophila</i>	Cromosoma x unido	machos con fenotipo distintivo	economía y rapidez	
revertantes nutricionales	prueba de Ames en <i>Salmonella typhimurium</i>	reversión de histidina	economía y rapidez	resultados no siempre extrapolables a otros seres vivos
revertantes nutricionales	prueba de Ames en <i>Escherichia coli</i>	reversión de histidina	economía y rapidez	resultados no siempre extrapolables a otros seres vivos
revertantes nutricionales	prueba de Ames en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	color rojo de la colonia	economía y rapidez	
cultivo de células		fenotipo bioquímico	eficiente	costoso
cultivo de células	cariotipo	cambios estructurales y numéricos	eficiente y rápido	costoso
cultivo de células	intercambio de cromátides hermanas	intercambios de cromátides	eficiente	costoso
ensayos in vitro	micronúcleos	aumento en la frecuencia de micronúcleos	rápido y eficiente	

CUCEB



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

Los rayos ultravioletas inducen mutaciones , pero tienen el inconveniente de que poseen muy poca penetrabilidad , por lo que se usan con mas ventaja para irradiar bacterias , esporas de hongos o polen de plantas , como también se ha realizado con éxito en el maíz. Gran número de los mutantes obtenidos en *Neurospora* y en diversas levaduras se han inducido por medio de los rayos ultravioletas . También en *Drosophila melanogaster* pueden inducirse mutaciones en los testículos del macho irradiando su abdomen comprimido entre dos láminas de cuarzo , para llevar así estos testículos cerca de la superficie o asegurar la penetración de la irradiación (Li y Loretz , 1991).

Las ondas ultrasónicas también han resultado capaces de inducir mutaciones y una frecuencia de 400 000 vibraciones por segundo produjo letales y mutaciones aparentes en *Drosophila* , así como variaciones estructurales en los cromosomas somáticos de varias plantas .

2.6 MUTACION Y CANCER

Una mutación es un hecho fortuito que se traduce por el cambio de carácter hereditario. Las mutaciones se producen raramente y pueden considerarse como fallos del proceso de autorreproducción idéntica del material genético.

La existencia de las mutaciones se conoce desde hace mucho tiempo por los criadores y agricultores que las han aprovechado para tener nuevas razas de animales domésticos o de plantas cultivadas. Darwin ya había llamado la atención sobre su importancia biológica. Por su parte, Mendel se sirvió de mutantes para establecer las leyes de la herencia, pero fue H. De Vries quien en 1900 empleó por primera vez el término mutación.

La mutación es el fenómeno más importante en el cual se basa la evolución. Mientras una especie queda expuesta a diferentes ambientes durante largos periodos, su capacidad de supervivencia depende de su acopio de diversidad genética para producir nuevos genotipos con nuevos límites de tolerancia que les permite a ciertos miembros de la población sobrevivir y reproducirse.

Existen dos grandes categorías de mutaciones: las que afectan la estructura de un gen y las que modifican la estructura o el número de cromosomas. Las primeras no modifican el carácter morfológico de los cromosomas y la observación microscópica de las células mutantes no revelan el lugar en donde se ha producido la mutación. Las segundas se caracterizan por modificaciones cromosómicas a menudo importantes que a veces pueden ser observadas en núcleos de las células mutantes (Aust ,1991).

Existen numerosos agentes físicos y químicos que pueden producir lesiones en el ADN y algunos de ellos sufren transformaciones secundarias consecuentemente se convierten en una fuente potencial de mutágenesis indirecta. Otros agentes físicos y químicos actúan directamente sobre el ADN lesionando su estructura tal es el caso de agentes mutagénicos tan potentes como el metil metano sulfonato (MMS), ciertos análogos de las bases y otros agentes químicos mencionados anteriormente.

El cáncer es un grupo complejo de enfermedades y existen varios cientos de tipos y múltiples agentes productores. Un agente inicia un complejo proceso celular que puede desencadenar con el tiempo un estado canceroso.

El cáncer se debe principalmente a un cambio en la proporción de división celular que parece haber descompuesto el complejo de mecanismo de control que indica cuando se debe dividir o no la célula. Algunos tumores crecen muy lentamente, pero otros lo hacen con rapidez y, por lo tanto, si no se eliminan por medio de cirugía o se tratan por radiación o agentes químicos pueden causar la muerte del organismo. Las células cancerosas pueden permanecer en un tumor localizado el cual puede extirparse quirúrgicamente.

Cuando se divide una célula produce dos células hijas idénticas las cuales, al igual que la célula paterna, pueden continuar dividiéndose sin control. Estos cambios persisten también en los cultivos de tejidos o cuando las células del cáncer se toman de un individuo y se inyectan a otro genéticamente similar.

Por lo tanto, parece ser heredable el cambio que produce el crecimiento sin restricciones, se han sugerido varias teorías para explicar este cambio, pero quizás la más satisfactoria intelectualmente es que muchos cánceres son debidos a mutaciones somáticas que ocurren, posiblemente, en los genes que controlan la proporción de la división celular. Si esta teoría es correcta entonces todos los compuestos que inducen cáncer (es decir, carcinógenicos) también podrían inducir mutaciones.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

3 MATERIALES Y METODOS.

3.1. Material utilizado

3.1.1. Material Genético.

Se utilizaron dos líneas de *Drosophila melanogaster* para la realización de esta prueba.

- mwh/ mwh (marcador: pelos múltiples en alas). (Fig.6).
- ORR-Flr3/TM3, ser (marcador: pelos en forma de flama y alas serratia). (Fig.6).

3.1.2. Material Físico.

Agujas de disección

Microscopio de disección.

Estereoscopio.

Platina de vidrio de 12 x 8 cm aproximadamente.

Eterizador.

Frasco gotero con éter etílico.

Morgue para poner las moscas de desecho (frasco con tapa, tiene la mitad del volumen de glicerina o aceite y la otra mitad con alcohol etílico al 70 %).

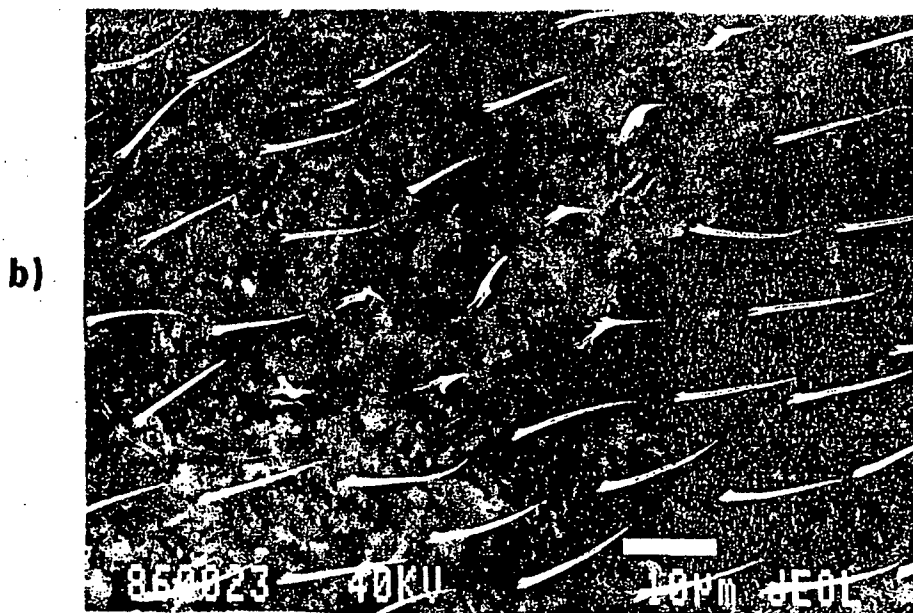
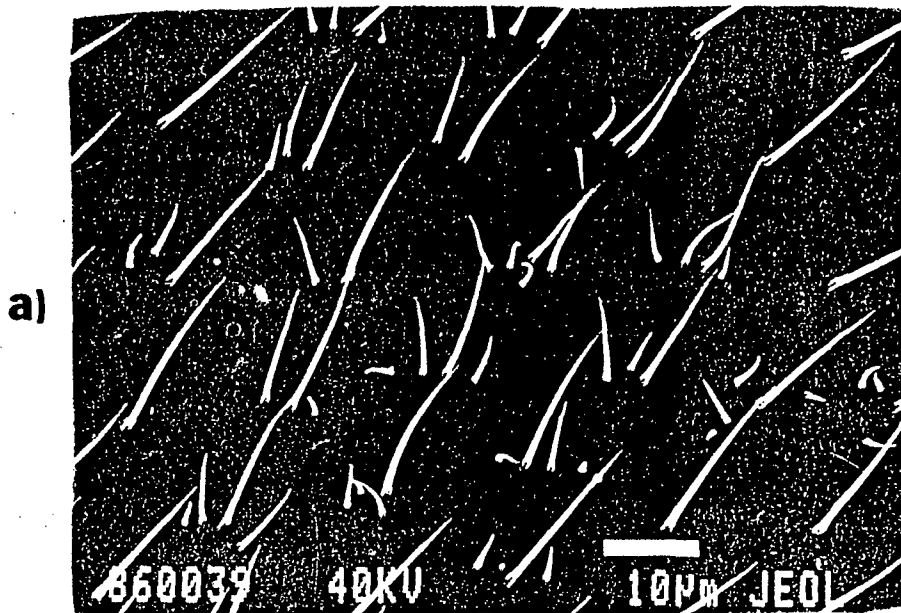
Una placa de corcho o unicel de 20x20x2 cm. aproximadamente.

Frascos o tubos homeopático con medio de cultivo y tapones de hule espuma o de gasa con algodón.

Pinzas de relojero

Medio de cultivo para *Drosophila Melanogaster*.

Figura 6. Tipos de pelos de *Drosophila melanogaster* a) fenotipo mwh, b) fenotipo flr3.



3.1.3. Material químico.

Uretano

Etil nitroso urea (ENU)

Etil nitroso amida(ENA)

Hidrazina maleica(HM)

Azida de sodio (AS)

Medio de cultivo. Se prepararon tres, medios tradicional, (cuadro 4), bioactivación (medio rico en levadura y azúcar), medio instantaneo de papa para el tratamiento experimental.

CUADRO 4 . Material utilizado para la elaboración del medio tradicional.

Agua-----	1250 ml.
Agar -----	7.6 grs.
Azúcar-----	70 grs.
Harina de maíz-----	112 grs.
Levadura de cerveza seca-----	55 grs.
Nipagin (Fungicida)-----	0.4 grs.
Acido propiónico-----	4 mm.



BIBLIOTECA CENTRAL

Juntos el azúcar y el agar se disolvieron en 870 ml de agua, mientras que se hizo lo mismo con la levadura y la harina en 380 ml de agua. La primera mezcla se llevó a ebullición con movimiento continuo. La segunda se agregó a la primera y se dejó hervir de 5-10 minutos, se retiró del fuego y se añadió el nipagin y el ácido propiónico, para posteriormente servirse en frascos de vidrio esterilizados (Demereck y Kaufmann, 1961).

3.2. Métodos

3.2.1. Metodología.

Condiciones experimentales. Las moscas y las larvas fueron mantenidas a 25°C y 60% de humedad relativa.

Líneas de *Drosophila melanogaster*. Para la realización de esta prueba se utilizaron dos líneas progenitoras (Graf y schalk ,1991):

1. **mwh/ mwh** (marcador: pelos múltiples en alas).
2. **ORR1; ORR2 flare / TM3, Ser** (marcador: pelos en forma de flama y alas serratia).

ORR1 y ORR2 se refiere a los cromosomas 1 y 2 respectivamente de la línea oregon R resistente al **DDT** y con actividad metabólica incrementada.

Cruzas. Hembras vírgenes de la línea **ORR1; ORR2; flr3 /TM3 ; Ser**, Con machos de la línea **mwh/mwh**.

Prueba de SMART.

Se realizó la cruce de 40 hembras **ORR-Flr3/TM3 , Ser**. 40 machos **mwh** por frasco. Las larvas de 72 horas resultantes fueron expuestas a los mutagénos en tubos durante 48 horas. Como testigo positivo se usaron, Uretano, Etil nitroso urea, Etil nitroso amida, Azida de sodio, Hidrazina maleica, como testigo negativo el etanol al 5% . El efecto fue detectado por la presencia de células con el fenotipo **mwh , Flr3** o ambas en las alas transheterocigotas. Las alas fueron montadas en portaobjetos y fijadas con solución de fauré (Graf et al., 1984).

Tamaño de la muestra. Se analizaron todas las larvas transheterocigotas que se produjeron después de ser sometidas al tratamiento. La manipulación fue como sigue: las larvas de cada uno de los frascos fueron lavadas con agua destilada y colectadas con una espátula pequeña (en la punta de esta se tomaron un promedio de 100 larvas).

3.2.1.1. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el método propuesto por Frei (1988) que consiste en una prueba de X^2 (chi cuadrada), la fórmula general es la siguiente:

$$X^2 = \sum_{i=1}^k \frac{[X_i - E(X_i)]^2}{E(X_i)}$$

Donde:

X_i = representa los valores observados

$E(x_i)$ = representa los valores que se esperan de los observados

K = la variable

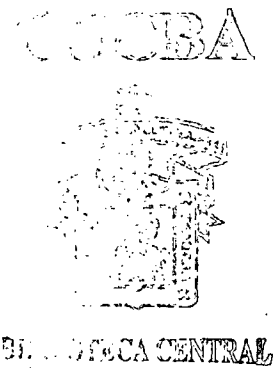
Para el análisis de los resultados se probaron dos hipótesis estadísticas: la hipótesis nula (H_0) y la hipótesis alternativa (H_A).

H_0 . No hay diferencia significativa entre el grupo control y el grupo tratado.

H_A . Si existe diferencia significativa entre el grupo control con respecto al grupo tratado.

Una vez que se prueban las hipótesis se realiza el siguiente diagnóstico:

	Ho Aceptada	Ho Rechazada
HA Aceptada	inconclusivo	positivo
HA Rechazada	negativo	positivo debil



4 RESULTADOS

Los resultados de la prueba de SMART se presentan en el Cuadro 5 , observandose lo siguiente:

El Uretano . mostró una capacidad creciente para producir daño genético y que va desde 1.5 veces hasta seis veces la frecuencia de mutación con respecto al testigo - (Graf. 1). La significancia fue muy alta.

Se observa que al incrementarse la dosis de uretano se incrementa el número de manchas simples, grandes y dobles o gemelas , aunque estas últimas aparecen mayormente a la concentración de 20 Mm.

Etil nitroso urea (ENU). Al probar ENU en SMART se observó también una capacidad creciente para producir daño genético (Graf. 1) . La menor concentración (1Mm) produjo 5 veces el daño genético, 3 Mm produjo 10 veces el daño y finalmente 5 Mm elevo hasta 12 veces el daño genético . En similitud con el uretano, produjo mayor número de manchas simples grandes , y manchas gemelas entre mayor fue la concentración . Estos resultados son muy significativos (cuadro 5) .

Etil nitroso amida (ENA). No se detecto daño significativo del ENA a 1 y 6 Mm sin embargo el resultado fue positivo (debil) con una concentración de 9 Mm (Graf. 1)(Cuadro 5).

Azida de sodio (AS). Los resultados obtenidos con AS fueron totalmente inconclusos.

Cuadro 5. Resumen de los resultados obtenidos en la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en el ala de *Drosophila melanogaster*.

COMPUESTO	(Mm)	CANTIDAD DE ALAS	MANCHAS SIMPLES CHICAS 1-2 CELULAS M=2	MANCHAS SIMPLES GRANDES > 3 CELULAS M=5	MANCHAS DOBLES (GEMELAS) M=5	TOTAL DE MANCHAS M=2	INTERPRETACION ESTADISTICA *
URETANO	5	18	11	1	1	13	+
URETANO	10	18	21	3	1	25	+
URETANO	20	18	26	14	21	61	+
ENU	1	10	14	8	9	31	+
ENU	3	10	9	12	23	44	+
ENU	5	10	17	24	26	67	+
ENA	1	18	6	1	0	7	-
ENA	6	18	6	1	0	7	-
ENA	9	20	4	7	1	12	+debil
AS	1	20	2	0	1	3	i
AS	2	11	2	0	0	2	i
AS	3	9	2	0	0	2	i
HM	0.5	20	4	0	0	4	-
HM	1	20	2	2	0	4	-
HM	2	20	2	1	1	4	-
T		18	3	0	0	3	

*El procedimiento estadístico se realizó de acuerdo a Frei (1988). Para la comparación con los controles correspondientes; + = positivo; - = negativo; i = inconclusivo. M= factor de multiplicación. Grados de probabilidad de error $\alpha = 0.05$.

TRATAMIENTO A 48 HRS.
 ENU=ETIL NITROSO UREA
 ENA =ETIL NITROSO AMIDA
 AS=AZIDA DE SODIO

HM=HIDRAZINA MALEICA
 T= TESTIGO (ETANOL 5%)

Mancha simple chica: una o dos células de un solo fenotipo; mwh o flare

Mancha simple grande: mas de tres células de un solo fenotipo; mwh o flare

Mancha gemela: dos o mas células con ambos fenotipos; mwh o flare



Hidrazina maleica (HM). Los resultados obtenidos con la HM fueron negativos, no se observó incremento de mutaciones al aumentar la dosis (Graf. 1), no se observó significancia estadística (cuadro 5).

DISCUSION

La evidencia de que un agente induce mutaciones genéticas en los seres humanos puede provenir de datos epidemiológicos (frecuencia de cáncer, anomalías de los productos, abortos, etc) que indican una fuerte relación entre la exposición a sustancias y los efectos heredables. Es difícil obtener tales datos porque cualquier mutación específica es un hecho infrecuente y solo una pequeña fracción de los genes humanos son considerados útiles como indicadores para calcular las tasas de mutación. La variabilidad genética, el número reducido de hijos y los prolongados tiempos entre las generaciones complican aun más los estudios (Gómez et al, 1992).

Los bioensayos o también llamados sistemas biológicos de prueba nos permiten obtener datos de las actividades mutagénicas de diversos agentes químicos o físicos sin la necesidad de recurrir a datos epidemiológicos, en otras palabras nos pueden ayudar a conocer el riesgo genético que representa un agente antes de que ocurra un daño en humanos. Varios cientos de bioensayos han sido desarrollados (Wurgler et al. 1985, De marine, 1991)(Cuadro 3) pero solo unos cuantos han mostrado viabilidad y efectividad entre los que destacan la prueba de Ames (Ames, 1973) y la prueba de letales recesivos (Lee et al, 1983).

La prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART), es un sistema sumamente reciente (1992) que ha mostrado gran efectividad, rapidez y sencillas (Graf, 1992).

Los resultados muestran que la prueba de SMART, posee un alto grado de eficacia para detectar el daño genético inducidos por mutagénos . El uretano ha sido reportado como mutagénico en diversas pruebas (Graf, 1992 ; Frolich, 1990). El presente estudio confirma lo anterior ya que presenta un comportamiento casi lineal proporcional entre la dosis y el número de mutaciones producidas (Graf. 1). Cabe destacar que solo en dosis muy altas (20 Mm) el uretano se comporta también como cancerígeno , lo coincide con lo reportado en la literatura (Graf ,1992; Graf ,1991).

El ENU también reportado como mutágeno (Graf ,1989) presentó una elevada actividad mutagénica incluso en dosis menores a las del uretano (Graf. 1). ENU se comporta también como carcinógeno a partir de una concentración de 3 Mm superando al uretano que se comporta como cancerígeno a partir de una dosis de 20 Mm . Ambos mutágenos resultaron ser los mas activos de los cinco probados.

El ENA a pesar de estar reportado en la literatura como mutágeno en la prueba de tradescantia (Gichner, 1982) no presentó actividad mutagénica sino hasta una concentración de 9 Mm , probablemente tal actividad se incremente en dosis superiores . La gráfica 1 muestra una curva contrastante a la pendiente de la actividad mutagénica del uretano y ENU.

Al trabajar con la AS los resultados fueron totalmente inconclusivos concordando con los trabajos reportados con esta prueba por (Delgado , 1992) . Otros sistemas de pruebas tampoco han presentado resultados concluyentes con la AS (Lí y Loretz ,1991). Cabe destacar que dosis mayores a 3 Mm provocaron la muerte de las larvas , por lo que nosotros nos inclinamos más por un efecto tóxico (agudo) inmediato que por uno de tipo genético (crónico).

La HM ha sido reportada como altamente mutagénica en sistemas de pruebas vegetales (Gichner ,1982) sin embargo no mostró efecto alguno en larvas de *Drosophila* por lo que se concluye que es mutagénica en plantas pero no en *Drosophila melanogaster* quizá el complejo enzimático S-9 presente en este insecto provoca la inactivación de HM o sus metabolitos . No podemos asegurar que HM sea mutagénica en el hombre pero tampoco podemos descartarlo .

Aunque los resultados obtenidos por la prueba de SMART son confiables no se puede asegurar con un solo ensayo que un compuesto químico posea actividad mutagénica para el hombre, sin embargo al probar dos bionensayos la certeza se incrementa . Lo aceptado a nivel internacional es la ejecución de tres bioensayos .

La prueba de SMART en ala de *Drosophila melanogaster* , es una excelente herramienta para detectar el daño genético producidos por los compuestos químicos mutagénicos . En adición a lo anterior existen otras ventajas que se observaron y que permiten utilizar a SMART en forma rutinaria como son ; a) económica, se requiere solo de un mínimo indispensable de equipo y de material de cualquier laboratorio, además las cepas pueden ser donadas por un laboratorio especializado ; b) rápida, con esta prueba es posible obtener resultados en tan solo un ciclo de vida de las moscas (10-20 días) ya que el efecto de los mutágenos es observado directamente sobre el individuo tratado y no sobre la descendencia ; c) eficaz , ya que la sensibilidad mostrada es adecuada y con una ventaja adicional, la observación de recombinación somática (manchas gemelas) nos permite predecir que un químico no solo es mutagénico sino también carcinogénico.

5 CONCLUSIONES

1 Los resultados muestran que la prueba de SMART, posee un alto grado de eficacia para detectar el daño genético inducido por mutágenos en alas de *Drosophila melanogaster*.

2 Aunque los resultados obtenidos por la prueba de SMART son confiables no se puede asegurar con un solo ensayo, que un compuesto químico posea actividad mutagénica para el hombre.

3 El etil nitroso urea fue el agente químico que mostró una capacidad creciente para producir daño genético, mientras que la hidrazina maleica mostró la menor capacidad para provocar daño mutagénico inducidos por mutagenos en alas de *Drosophila melanogaster*.

4. La prueba de SMART es una excelente herramienta que mostró gran efectividad para detectar alteraciones o efectos mutagénicos producidos por los compuestos químicos en forma rápida, eficiente y económica.

UNICDA



BIBLIOTECA CENTRAL

6 BIBLIOGRAFIA

- Albertini J.R. y Robinson H.S. (1991). Human population Monitoring. En: Genetic Toxicology (P.A.Li y R.H. Heflich, ed.). CRC press, New Jersey, pp. 375-420.
- Ames D.N. (1973). Carcinogens are mutagens: a simple test sistem combining liver homogenat for activation and bacteria for detection. Nat Acad. Sci USA. 69, 3128-3132.
- Aust A.E. (1991). Mutation and cáncer. En : Genetic Toxicology (P.A. Li y R.H. Heflich, De.). CRC press, New Jersey, pp. 93-118.
- Cairs J.F. (1981). The origin of the human cáncers. Nature. 289, 353-357.
- Casciano A.D. (1991). Introducción: Historical perspectives of En: Genetic Toxicology (P.A. Li y R.H. Heflich Ed). CRC press, New Jersey, pp. 1-12.
- Delgado AR.(1992). Protocolo de la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en *Drosophila melanogaster*. En: Memorias de la I Reunión Nacional de Investigación. De la sociedad Mexicana de Genética, la trinidad, Tlaxcala. México. 1992.
- Demereck M.y Kaufmann B.P. (1961) . *Drosophila* Guide. 7a DeWashington DC: Carne institution of Washington pp.1-32.
- De Marine M.D. (1991). Enviromental mutagens/complex mixtures. En: Genetic Toxicology (P.A. Li y R.H. Heflich, Ed). CRC press, New Jersey, pp. 41-92.
- Fahmy O.G y Fahmy M.J. (1970). Gene elimination in carcinogenesis: reinterpretation of the mutation theory. can. Res. 30, 195-205.
- Frei, H.J. y Würigler f.r. (1988). Statistical methods to decided wheater mutagenecity test, date from *Drosophila* assay indicate a positive, negative or inclusive result. Mutat. Res. 203, 297-308.
- Frolich A.(1990). Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila*. Wing spot test: Dependence on genotype- controlled metabolic capacity . Mutat. Res. 244, 201-208.
- Gomez- Arroyo S., Abarca-Hernández J.C. Cortéz- Eslava J.y Villalobos-Pietrini R.(1989). Sister Chromatid Exchanges induced by cadmium in *Vici faba* . Rev.Int. Contam. 3, 55-61.
- Gomez-Arroyo S.(1992). Sister Chromatid exchange analysis in a rural population of México exposed to pesticides. Mutat. Res. 281, 173-179.

- Gichner T.(1982). Somatic mutation induced by maleic hidrazine and its potassium and diethanolamine salts in tradescantia mutation assay. *Mutat. Res.* 103, 289-295.
- Graf U., Würgler F.R., Kazt A.J., Frei H., Hall C.B. y Kale P.G.(1984). Somatic and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6, 153-188.
- Graf U. (1989). Somatic and recombination test in *Drosophila melanogaster* . *Environ Mutagen.* 6, 153-188.
- Graf U.(1991). Improved High bioactivation cross for the winsomatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 00, 1-9.
- Graf U.(1992). Genotoxicity testing of promutagens in wings somating mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster* .*Rev. Int. Contam. Ambient.* 8,(1):15- 27.
- Graf V.and schalk NV.(1994). The actual situation of SMART (SOMATIC MUTATION AND RECOMBINATION TEST) en *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. ambient.* 10 (suplemento 1) , 5-7.
- Graf V. and Schalk NV.(1991). Improved high bioactivation Cross for the wings somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*_. *Mutat . Res.* 1-9.
- Grimmer G. (1983). Chemistry. EN : Enviromental Carcinogens. (G . Grimmer ; De.) . Boca Ratón, Florida, pp.220-216.
- Heflich H.R.(1991). Chemical mutagens. En: Genetic Toxicology. (Li P.A., Heflich R.H.Ed.). CRC. press, New Jersey, pp. 143-202.
- Higginson J.(1975). Cáncer etiology and prevention . En: persons at high risk of cáncer (J.F. Fraumeni. Ed .). Academic press, New York, pp. 385-396.
- Hoover R.y Fraumeri J.F. (1975). Drugs. En: persons at high of cáncer. (J.F. Fraumeri. Ed.). Academic press, New York,pp. 185-210.
- Ischidate Jr M., Harnols M.C. y Sutuni T. (1988). A comparative analysis of dates on theclastogenicity of 951 chemical sustances test in mammalian cell cultures . *Mutat. Res.* 195,15- 213.
- Kelsey K. (1988). Effects of cigarette smoking and solvent exposure on sister chromatid exchange frequency in painters. *Environ . Mol. Mutagen.* 11, 389-399.

- Lee W.R., Abrahamson S., Valencia R., Halle E.S., Würigler F.E., Zimmering S. (1983). The sex linked recessive lethal test for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. (a report of the U.S.A. Environmental protection Agency gene-tox program). *Mutat. Res.* 123, 183-279.
- Li A.P. y Loretz L.J. (1991). Assay genetic toxicology. En: *Genetic Toxicology* (P.A. Li R.H. Heflich, Ed). CRC. press, New Jersey, pp. 119-142.
- Lindsley D.L y Grell E.H. (1968). Genetic variation of the *Drosophila melanogaster*. Carnegie Instit. publ. 627, 1-60.
- Lindsley D.L. y Grell E.H. (1985). The genoma of *Drosophila melanogaster*, part I: GENES A-k *Drosoph. Serv.* 62, 1-60.
- Molina A.M. (1990). Contaminantes atmosféricos primarios. En: *Toxicología Ambiental* (A.L. Albert Ed.). Editorial Limusa, México D.F. pp. 43-53.
- Preston R.J., Bender M.A. Brewer J.G., Carrano A.V., Hedle J.A., McFee A.F. y Wolff S. (1981). Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assay (a report of the U.S. EPA, S Gene-tox program). *Mutat. Res.* 87, 142-188.
- Rusell L.R. (1981). Use de mouse spot test in chemical mutagenesis ; Interpretation of past date and recomendations future works. *Mutat. Res.* 86, 355-379.
- Ramos P. (1993). Manual de laboratorio de genética para *Drosophila melanogaster*. Mc Graw-Hill interamericana de México, México D.F. pp. 3-30.
- Salamanca F. (1990). Citogenética Humana 1a edición, Ed. Médica panamericana, México D.F., pp. 219-234.
- Vega S.G. (1985). Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales. Organización. panamericana de la salud. 15p.
- Würigler F.E., Graf U. y Frei H. (1985). Somatic mutation and recombination test in wings of *Drosophila melanogaster*. En: *Progress in mutation research* (F.J. De Serres. Ed.). Enselvier, Amsterdam, pp. 325-350.

CUICBA



BIBLIOTECA CENTRAL