

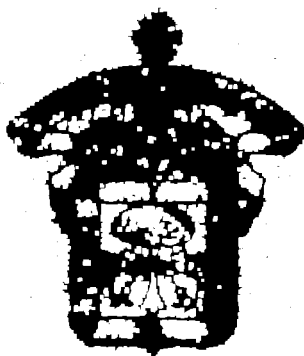
1986 - 2

Exp. No. 79013293

*Universidad de Guadaluajara*

---

FACULTAD DE CIENCIAS



EFFECTO DE LA RADLACION IONIZANTE SOBRE  
EL GENOMA DE *Drosophila melanogaster*.

TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**Biólogo**

PRESENTA

**CAROLINA ANGELO MENDOZANO**

**GUADALAJARA, JAL., 1989**

MX 9100009

1986 - 2

Exp. No. 79013293

# Universidad de Guadalajara

---

FACULTAD DE CIENCIAS



EFEECTO DE LA RADIACION IONIZANTE SOBRE  
EL GENOMA DE *Drosophila melanogaster*.

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**Biólogo**

PRESENTA

**CAROLINA ARCEO MALDONADO**

**GUADALAJARA, JAL., 1989**

## DEDICATORIAS

A MIS PADRES, DAVID Y MERCEDES  
A QUIENES TANTO LES DEBO.

A MIS HERMANOS,

NORMA ANGÉLICA Y MARIO ALBERTO

ARACELI

CINTHYA DEYANIRA

DAVID REY

GRACIAS POR TODO

LOS QUIERO.

A ARMANDO.  
CON RESPETO, CARIÑO Y ADMIRACIÓN.

## AGRADECIMIENTOS

DRA. JUDITH GUZMÁN RINCÓN.

POR SUS CONSEJOS, PACIENCIA Y DEDICACIÓN.

DR. GUILLERMO PÉREZ GARCÍA.

POR SUS ATINADAS OBSERVACIONES.

DRA. MA. ESTHER DE LA ROSA DUQUE

M. EN C. OLGA OLVERA RAMÍREZ

A MARTHA PATRICIA Y EMILIO



MI SINCERO AGRADECIMIENTO A  
BIOL. JOEL ENRIQUE TLACUILO PARRA  
ARQ. ENRIQUE BOBADILLA JIMÉNEZ  
ING. ABEL ANTONIO OLIVA MORALES

À TODAS LAS PERSONAS QUE DE ALGUNA MANERA HAN CREÍDO EN MÍ Y  
EN LO QUE HAGO, BRINDANDOME SIEMPRE SU APOYO.

MUCHAS GRACIAS.

MI AGRADECIMIENTO AL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES, AL M. EN C. CARLOS DÍAZ PICO Y AL DR. FEDERICO GARCÍA SANTIBÁÑEZ, POR LAS FACILIDADES OTORGADAS PARA PODER LLEVAR A CABO ESTA TESIS, LA CUAL FUE DESARROLLADA EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA Y RADIOBIOLOGÍA DE DROSOPHILA, DEL DEPARTAMENTO DE RADIOBIOLOGÍA DE LA GERENCIA DE INVESTIGACIÓN BÁSICA.

EFFECTO DE LA RADIACIÓN IONIZANTE SOBRE EL  
GENOMA DE DROSOPHILA MELANOGASTER

1989.

## INDICE

I. - GENERALIDADES DEL ADN .....	4
II. - RADIACIONES .....	8
A. - Radiaciones naturales .....	8
B. - Radiaciones producidas por el hombre .....	9
C. - Inicio de la Energía Nuclear en México .....	10
D. - Riesgos y beneficios de la radiación ionizante .....	11
E. - Usos de la radiación ionizante en el presente siglo .....	11
F. - Radiobiología .....	12
III. - <u>Drosophila melanogaster</u> COMO SISTEMA DE PRUEBA .....	15
A. - Ventajas .....	15
IV. - ANTECEDENTES .....	18
V. - HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	21
A. - Hipótesis .....	21
B. - Objetivos .....	21

VI. - MATERIALES .....	22
A. - Biológicos .....	22
B. - Laboratorio .....	24
C. - El irradiador .....	24
D. - Medio de cultivo .....	25
VII. - MÉTODO .....	27
VIII. - RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	31
IX. - CONCLUSIONES .....	42
X. - BIBLIOCRAFIA .....	43

## GENERALIDADES DEL ADN.

En la actualidad, cuando se mencionan los términos gen o genética, la mayoría de los biólogos piensan de modo inmediato en el ADN que es bien conocido como el portador químico de la información que determina las características de los seres vivos y que es transmitida de generación en generación (Goodenough, 1981).

Entre las características que presenta dicha molécula, resalta su estabilidad, en base a su naturaleza fisico-química que le confiere continuidad estructural y funcional a las especies biológicas.

El ADN tiene la capacidad de duplicarse a sí mismo mediante un proceso de autoduplicación; este proceso puede considerarse exacto puesto que la frecuencia de errores es de menor de  $10^{-9}$ , es decir, un error por cada mil millones de bases duplicadas (Alberts y Sternglaz, 1977). Sin embargo, la ocurrencia de dichos errores conduce a alteraciones en el mensaje genético.

Además de los errores acumulados durante la duplicación, el ADN está expuesto a agentes físicos, químicos y biológicos que pueden producir alteraciones en su estructura y que a su vez dan origen a cambios visibles en la morfología y en las funciones de los individuos portadores de

dichas alteraciones.

Estos cambios son conocidos como mutaciones y a los agentes que los producen se les llama mutágenos.

Fronte a ellos, las células tienen diferentes sistemas de protección que van desde los estructurales, como la agrupación de genes en cromosomas, la membrana nuclear y la celular; hasta los enzimáticos, como son la degradación de los mutágenos, destruyéndolos, antes de que lleguen a lesionar al ADN.

Sin embargo, puede ocurrir que los mutágenos superen estos sistemas de protección y ataquen al ADN. Cuando este ha sido dañado, las células muestran diferentes respuestas que dependen de su estado fisiológico; si la cantidad de alteraciones es tanta como para que exceda la capacidad de reparación de la célula, ésta muere, si se producen alteraciones leves en el ADN que no son reparadas ni mortales, aumenta la frecuencia de mutaciones, es decir, ocurre mutagénesis directa.

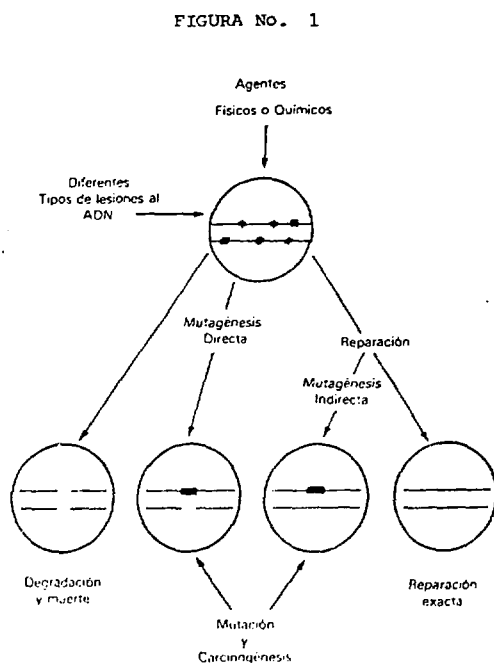
La tercera posibilidad es que el ADN sea reparado de una manera inexacta la cual conduciría también a mutaciones, en este caso mutagenesis indirecta (Radman, 1979).

La cuarta opción es que el ADN sea reparado de



una manera exacta y no ocurra ningún cambio en la información.

Figura No. 1.



Los primeros organismos que aparecieron sobre la Tierra, estaban expuestos a varios tipos de radiación, como la ultravioleta que proviene del sol por consiguiente, los mecanismos de protección y reparación de las lesiones que las radiaciones provocaban en los ácidos nucleicos debieron surgir al mismo tiempo que los primeros intentos de vida sobre el planeta.

La presencia de estos mecanismos permitió que algunos individuos originalmente destinados a morir, no perecieran, con lo cual aumentó la variabilidad sobre la cual actuaría posteriormente la selección natural.

Los mecanismos de reparación estudiados en la actualidad se pueden clasificar en dos grupos: los constitutivos, que son aquellos que están siempre presentes en las células (Fotorreactivación, reparación por excisión y la reparación por recombinación); y los inducibles, que son aquellos que necesitan de algún estímulo para que se presenten (los más estudiados en el proceso regulatorio SOS y la respuesta adaptativa).

## RADIACIONES.

Las radiaciones forman parte del mundo en que vivimos, han existido desde el principio del tiempo y son parte integral de nuestra vida.

La humanidad ha estado siempre expuesta a radiaciones visibles e invisibles que proceden de la materia existente en todo el Universo. Así, todos estamos familiarizados con varias formas de radiación, de hecho, la vida tal como la conocemos en la tierra, ha evolucionado en medio de la radiación y es ampliamente conocido que la radiación interactúa con las moléculas biológicas produciendo cambios que pueden ser favorables o desfavorables.

## RADIACIONES NATURALES.

A lo largo de toda nuestra vida nos hallamos sumergidos en radiación ionizante de bajo nivel, procedente de fuentes naturales. (Upton, 1982).

Las radiaciones naturales provienen de los rayos cósmicos que nos llegan del espacio exterior (del sol y de otras estrellas), y de los elementos radiactivos naturales que existen en la tierra, que se encuentran incluso en los materiales con los que se fabrican las casas-habitación, en el aire que respiramos, en el agua que bebemos y en los alimentos que ingerimos.

En la naturaleza existen pocos elementos radiactivos, siendo el Uranio el más conocido por su utilidad en la generación de energía eléctrica. El Uranio y el Radio se encuentran en pequeñas cantidades en rocas tan comunes como el granito.

Las radiaciones naturales provienen también de nuestro cuerpo, principalmente del potasio 40, carbono 14 y otros isótopos radiactivos que se encuentran en el organismo (Cipon 1982; del fuego a la energía nuclear, 1987, Introducción a la Física Nuclear, 1983).

#### RADIACIONES PRODUCIDAS POR EL HOMBRE.

Durante los últimos doscientos años, el hombre ha desarrollado una gran diversidad de tecnologías y procesos industriales, que al mismo tiempo que han promovido avances, han traído consigo la producción de numerosos compuestos químicos a los que el hombre se expone constantemente y que pueden constituir un riesgo para la salud.

Los avances tecnológicos han introducido nuevas fuentes de radiación que incluyen las máquinas de Rayos X, aparatos de T.V., relojes con carátula luminosa, aparatos de radiografías y materiales radiactivos usados en la medicina y en la industria, las emisiones de Plantas Nucleares, etc.

De todas las radiaciones producidas por el

hombre, los aparatos utilizados para las radiografías son las fuentes que emiten mayor cantidad de ellas.

#### INICIO DE LA ENERGÍA NUCLEAR EN MEXICO.

El inicio de las actividades nucleares en México, a nivel Institucional, data desde hace más de treinta años (desde el 30 de julio de 1956); cuando en respuesta a las expectativas generadas por el "Programa de Atomos para la Paz" y de la Primera Conferencia Internacional sobre Aplicaciones Pacíficas de la Energía Nuclear", nuestro Gobierno creó la Comisión Nacional de Energía Nuclear en diciembre de 1955.

Treinta años de actividades en el campo nuclear, pueden parecer a primera vista un período muy largo, sin embargo, en otro sentido es mucho más largo el camino por recorrer.

Actualmente con fundamento por la Ley Reglamentaria del Artículo 27 constitucional en materia nuclear, el Estado Mexicano se ha reservado el derecho de promover y desarrollar las actividades conducentes para el aprovechamiento de las aplicaciones pacíficas de la Energía Nuclear, y en breve se iniciará el funcionamiento de la primera Planta Nucleoeléctrica del País (Logros ININ, 1986).

#### RIESGOS Y BENEFICIOS DE LA RADIACIÓN IONIZANTE.

Dado que todo avance tecnológico lleva riesgos

colaterales, es conveniente hacer una evaluación de la relación costo-beneficio de los mismos.

Se acepta el peligro inherente en muchos de estos casos, porque sus beneficios son deseables para nuestra comunidad y bienestar, y superan ampliamente los riesgos asociados a su uso.

Este es el caso de la energía nuclear en cualquiera de sus formas, como son los usos en medicina nuclear, que implican exposiciones importantes a diferentes tipos de radiación, pero que permiten realizar estudios que mejoran la salud y calidad de vida.

Otro ejemplo son las plantas nucleoelectricas, las que utilizadas de una forma correcta y responsable, ofrecen riesgos inferiores a los que implican otras fuentes de energía convencionales.

La energía nuclear puede ser una fuente de energía eléctrica que proporcione un buen sustituto para los recursos no renovables, como el petróleo que es más caro y peligroso que el carbón.

#### USOS DE LA RADIACION IONIZANTE EN EL PRESENTE SIGLO.

1. - Los Rayos X se utilizan ampliamente para el diagnóstico de lesiones y de algunas enfermedades.

- 2.- La radiación es la mejor herramienta médica para el tratamiento de algunos tipos de cáncer.
- 3.- En diagnóstico médico se usan sustancias radiactivas, para determinar el estado y el funcionamiento de los órganos.
- 4.- La radiación se usa para esterilizar instrumental médico y productos farmacéuticos.
- 5.- La radiación es una alternativa en la conservación de los alimentos y aditivos alimenticios.
- 6.- Producir energía eléctrica a un bajo costo, protegiendo los recursos no renovables.

#### RADIOBIOLOGIA.

En el presente estado del conocimiento, el progreso de las ciencias biológicas equivale al progreso de la medicina, ya que esta disciplina basada frecuentemente en las generalizaciones de la Biología, recurre a la información biológica para fundamentar sus adelantos.

Puesto que el objetivo de la ciencia por el hombre es utilizada para el hombre mismo, prácticamente cualquier conocimiento que se obtenga acerca de los seres vivos es relevante para el entendimiento de la naturaleza humana y la conservación de la salud.

En este campo el punto de partida lógico es la Genética, como ciencia central de la Biología y de la Radiobiología, si se considera que el control genético del organismo y de cada una de sus células constituye un aspecto básico para las ciencias naturales, dado que en la actualidad es una generalización válida la que señala que los efectos biológicos de las radiaciones se deben principalmente a los disturbios inducidos en el mecanismo genético, no es un resultado casual por consiguiente, que el florecimiento de la Radiobiología coincide la consolidación de la Genética.

El ADN es una macromolécula biológica muy importante afectada por la radiación ionizante. El daño infligido en el ADN por la trayectoria de una radiación con baja transferencia lineal de energía (Rayos Gamma), consiste con bastante seguridad en lesiones simples, ruptura de una de las dos cadenas que configuran la doble hélice de ADN. Estas lesiones pueden ser fácilmente detectadas porque en algunos casos cambian las propiedades físico-químicas de los individuos portadores de dichas alteraciones (Arena, 1971.).

Con los experimentos de Müller se originó la genética de las radiaciones, él fue quien demostró que los Rayos X, pueden alterar al gene, anticipándose la utilidad de las radiaciones ionizantes en la Biología, al disponerse de una herramienta que induce cambios en la información genética.



No obstante, dicha herramienta se calificó como relativamente cruda, ya que la acumulación de iones portadores de energía afecta a cualquier tipo de molécula en su trayectoria. A pesar de esa falta de especificidad la genética de las radiaciones constituye un campo muy fructífero de investigación en el que colaboran genetistas, radiobiólogos y biofísicos.

Por su misma naturaleza, la genética de las radiaciones implica además de la investigación básica, las aplicaciones de sus propios principios. Al considerar que grandes sectores de la población humana, están expuestos a ella mediante diferentes vías, se ha puesto mucho interés sobre la investigación del riesgo genético de estas poblaciones.

Por consiguiente, se justifica el gran esfuerzo realizado para la obtención de datos sobre la tasa de mutación en algunos mamíferos con la esperanza de extrapolar los resultados a la tasa de mutación correspondientes al *Homo sapiens* (Félix, 1972).

## Drosophila melanogaster COMO SISTEMA DE PRUEBA.

Hacia el año de 1911, el Profesor T. H. Morgan, que estaba entonces en la Universidad de Columbia, inició los estudios de genética con Drosophila. De ahí en adelante, las investigaciones con este insecto se extendieron a más de doscientos laboratorios donde actualmente se realizan estudios con este sistema en los cinco continentes.

Mediante los esfuerzos iniciales del Profesor Morgan y su grupo, y los trabajos más recientes de investigadores de otros laboratorios, se cuenta con un gran número de líneas de Drosophila que muestra diversos caracteres hereditarios. Las líneas de Drosophila han sido de valor incalculable para la investigación científica (Félix, 1972).

### VENTAJAS.

Por varias razones, estos insectos constituyen un material biológico especialmente adecuado para la detección de eventos mutacionales.

La "mosca de la fruta" constituye un sistema muy adecuado para el trabajo de laboratorio, puesto que para obtener conclusiones en los estudios genéticos, es necesario observar varias generaciones e incluir un gran número de individuos, por lo tanto se eligen para dichos estudios, los individuos que se reproducen rápidamente, que sean fáciles de

cultivar y que tengan descendencia abundante.

Al respecto, Drosophila melanogaster, requiere solamente de diez días para completar su desarrollo que incluye desde el estadio de huevo hasta adulto, lo que permite el análisis de varias generaciones en un año; una pareja puede producir varios cientos de descendientes; como es un organismo poiquilotermo, propicia el estudio de la velocidad de envejecimiento en relación con la temperatura.

Su alta fecundidad proporciona poblaciones numerosas en un lapso razonablemente corto para propósitos experimentales, y finalmente lo que completa su importancia al respecto, es el conocimiento tan amplio de su genética, que posibilita la comparación entre individuos genéticamente homogéneos, que pueden ser portadores de mutaciones fácilmente detectables y que permiten, mediante la realización de un sistema de cruce adecuado, la detección de cambios en la naturaleza y organización de la información genética.

Generalmente se trabaja con líneas mantenidas en el laboratorio durante muchas generaciones por entrecruzamiento que tienen lugar principalmente entre individuos de la misma generación.

Drosophila se desarrolla en una variedad de medios de cultivo de fácil preparación, se pueden cultivar en

frascos lecheros, lo que permite poblaciones grandes en espacios pequeños y no es necesario el uso de equipo sofisticado para su manejo, por lo que su estudio resulta sumamente económico (Felix, 1972).

Estas son las principales razones por las que Drosophila es uno de los organismos más importantes para los estudios genéticos.

## ANTECEDENTES

En bacterias y eucariontes inferiores, se ha descubierto una respuesta de reparación inducible del ADN y analoga al sistema SOS, incluyendo S. typhimurium (Pang y Walker, 1983), Proteus mirabilis (Hofmeister y Eitner, 1981), Bacillus subtilis (Fields y Yasbin, 1983), Neurospora crassa (Stadler y Moyer, 1981; Baker, 1983), Saccharomyces cerevisiae (Fabre y Roman, 1977; Eckardt, et. al., 1978) y Ustilago maydi (Leaper et. al., 1980).

En Drosophila, es ampliamente conocido que los rompimientos cromosómicos inducidos por Rayos X en espermatozoides, no se reúnen antes de la fertilización (Kaufmann, 1941; Müller, 1940).

Estudios llevados a cabo durante las últimas tres décadas han evidenciado la existencia de sistemas de reparación en las hembras, los cuales actúan sobre la inducción de daño por radiación en los cromosomas de los espermatozoides fecundantes. (Mendelson, 1974, 1976; Mendelson y Sobels, 1974; Proust, et. al., 1972; Würgler y Maier, 1972; Würgler, et. al., 1972).

Proust, et. al., en 1972, sugieren la existencia de sistemas de reparación de las hembras, actuando sobre el daño presente en los cromosomas de los

espermatozoides maduros, activos en el estado de la formación de pronúcleos que son requeridos para la reparación (restitución) o reparación equivocada (reuniones que dan origen a translocaciones de rompimientos inducidos en espermatozoides maduros).

Esta diferencia podría reflejar la diferencia fundamental entre los requerimientos de sobrevivencia de una población de organismos unicelulares contra los de organismos pluricelulares (Eiespuru, 1987).

Estudios previos realizados en el Laboratorio de Genética y Radiobiología de Drosophila del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), aportan resultados consistentes en cuanto a la disminución de la frecuencia de individuos con pérdida de cromosomas sexuales de origen paterno, cuando las hembras han sido irradiadas a 2500 rads previamente a la cruce. Sin embargo, cuando fueron irradiadas a 250 rads no se detectó respuesta (Guzmán, 1986; Guzmán, et. al. 1987).

Estos resultados podrían implicar la inducción de un mecanismo de reparación inducido mediante la radiación, o bien, su interferencia con los mecanismos de reparación existentes y constitutivos retardando o impidiendo la reunión de fragmentos cromosómicos de tal manera que individuos que podrían ser recobrados como portadores de pérdida de

cromosomas en realidad se pierden dando como resultado letales dominantes.

Debido a que los espermatozoides carecen de mecanismos de reparación, y que los daños ocurridos en los cromosomas son reparados después de la fecundación mediante el sistema enzimático de las hembras.(Guzmán, 1986; Guzmán, et. al. 1987) se propuso realizar experimentos irradiando hembras a diferentes dosis, para determinar su efecto sobre la pérdida de cromosomas sexuales de origen paterno.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### HIPÓTESIS.

La radiación ionizante modifica la proporción de individuos con daño cromosómico mediante su interacción con los mecanismos de reparación.

### OBJETIVOS.

- 1.- Verificar que la radiación ionizante aplicada a las hembras de Drosophila, modifica la frecuencia de individuos con pérdida de cromosomas sexuales de origen paterno.
- 2.- Determinar la dosis umbral de radiación que desencadena la respuesta fisiológica que modifica la frecuencia de individuos con pérdida de cromosomas sexuales de origen paterno en hembras irradiadas.



## MATERIALES

### A. - BIOLÓGICOS.

En el presente trabajo se emplearon hembras vírgenes de la línea yw/yw que se cruzaron con machos de la línea  $X^{CZ}$  y f bb<sup>-</sup> /B<sup>S</sup> Y y<sup>+</sup> de Drosophila melanogaster.

Los marcadores que tienen las líneas empleadas corresponden a la siguiente descripción. Véa la figura No. 2.

y	yellow	cuerpo amarillo claro.	0.0
w	white	ojos blancos.	1.5
$X^{CZ}$		cromosoma X en forma de anillo.	
f	forked	cerdas acortadas.	56.7
bb	bobbed	pelos más cortos y más delgados.	66.0
B	bar	ojo reducido a una barra vertical.	57.0
s	short	brazo corto del cromosoma X pegado al cromosoma Y.	

Por lo tanto se puede observar que las hembras tienen el cuerpo amarillo y los ojos blancos, mientras que los machos presentan una modificación en la forma de los ojos que los reduce a una barra, y que tienen el cromosoma X en forma de anillo, lo que los hace sumamente sensibles a los diferentes agentes mutagénicos.

figura # 2.

B. - LABORATORIO.

Frascos lecheros de 1/4 de litro.

Tapones de poliuretano de 4 cm de diámetro.

Agujas.

Pinceles.

Platina Esmerilada.

Microscopio estereoscópico.

Cuarto de cultivo a una temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Marcador de tinta permanente.

Eterizador.

Algodón.

Ligas.

Morge.

Estufa.

Batidora.

C. - EL IRRADIADOR.

Esencialmente un irradiador consistió de los siguientes componentes:

Fuentes de Radiación. Cobalto 60.

Blindaje. - La instalación que permite usar la radiación en un área específica, reduciendo al mínimo la exposición fuera de ella.

Mecanismos para colocar el producto frente a la radiación. - Generalmente son dispositivos electromagnéticos que atraviezan o rodean el blindaje.

Sistemas de Seguridad.- Permite operar el irradiador manteniendo las áreas de control al mínimo nivel posible de radiación.

El Vick Rad 2000 es una unidad de irradiación con Rayos Gamma de  $\text{Co}^{60}$ , construido para utilizarse en un cuarto sin blindaje. Es de la Marca Vickers Radiation Division Swindon England. Consta de una fuente anular cerrada permanente dentro del blindaje de plomo, constituida por lapices de acero inoxidable que contienen  $\text{Co}^{60}$ .

El  $\text{Co}^{60}$ , que es un isótopo radiactivo, es comúnmente usado en equipos para radioterapia en hospitales y clínicas. Se encuentra en la naturaleza como  $\text{Co}^{59}$ , al cual al ser irradiado con neutrones en un reactor se convierte en  $\text{Co}^{60}$ . Para usar al  $\text{Co}^{60}$  se encapsula en acero inoxidable.

La radiación gamma de  $\text{Co}^{60}$  es muy penetrante (por eso se requieren blindajes gruesos en los irradiadores).

#### D. - MEDIO DE CULTIVO.

Para preparar cuatro litros de medio de cultivo se necesita el siguiente material:

Agua	4000 ml.
Agar en polvo	36 grs.
Harina de maíz	187 grs.
Sacarosa	105 grs.

Dextrosa	75 grs.
Levadura en polvo	90 grs.
Agua para disolver la levadura	600 ml.
Acido propiónico	15 ml.
Tegosep	15 ml.

Forma de Prepararse:

1. - Se miden 4000 ml de agua.
2. - Se le agrega harina de maíz, sacarosa, dextrosa, agar en polvo.
3. - Se pone al fuego.
4. - Cuando está hirviendo se baja la flama durante 20 minutos.
5. - Se le agrega la levadura ya disuelta.
6. - Se deja hervir otros 20 minutos.
7. - Se quita de la estufa y dejamos que baje la temperatura a 55°C.
8. - Se le agrega el ácido propiónico y el Tegosep.
9. - Se sirve en frascos lecheros de 1/4 y se tapan.

## METODO

Para evaluar el efecto de la radiación en los óvulos sobre el daño presente en los espermatozoides irradiados, se tomó en cuenta a los individuos masculinos con fenotipo *yw* considerados como individuos con pérdida completa de cromosomas sexuales de origen paterno (ésta es, mayoritariamente, del cromosoma X en anillo), en base al método realizado por S. Zimmering, 1983.

Se aislaron hembras vírgenes de 0 a 6 horas de emergidas y se les dejó envejecer durante seis días en medio de cultivo fresco y nuevo. También se separaron a los machos.

Una vez envejecidas las hembras y separados los machos se integraron los grupos mostrados en la tabla No. 1. con el sistema de cruza del esquema 1.

Con el objeto de coleccionar únicamente células que se encontraban en estado de espermatozoide (durante la irradiación), se dejaron cruzar durante dos días (camada 1), después de los cuales se eliminaron a los machos y las hembras fueron transferidas a cultivos nuevos dejándolas ovipositar durante cinco días más (camada 2), posteriormente se eliminaron las hembras y los frascos con huevecillos se dejaron incubar a 25°C durante 14 días.

grupo	descripción
I	Hembras sin irradiar cruzadas con machos sin irradiar.
II	Hembras sin irradiar cruzadas con machos irradiados a 2500 rads.
III	Hembras irradiadas a 100 rads cruzadas con machos irradiados a 2500 rads.
IV	Hembras irradiadas a 200 rads cruzadas con machos irradiados a 2500 rads.
V	Hembras irradiadas a 300 rads cruzadas con machos irradiados a 2500 rads.
VI	Hembras irradiadas a 400 rads cruzadas con machos irradiados a 2500 rads.
VII	Hembras irradiadas a 500 rads cruzadas con machos irradiados a 2500 rads.
VIII	Hembras irradiadas a 600 rads cruzadas con machos irradiados a 2500 rads.
IX	hembras irradiadas a 700 rads cruzadas con machos irradiados a 2500 rads.
X	Hembras irradiadas a 800 rads cruzadas con machos irradiados a 2500 rads.
XI	Hembras irradiadas a 900 rads cruzadas con machos irradiados a 2500 rads.
XII	Hembras irradiadas a 1000 rads cruzadas con machos irradiados a 2500 rads.
XIII	Hembras irradiadas a 1500 rads cruzadas con machos irradiados a 2500 rads.
XIV	Hembras irradiadas a 2000 rads cruzadas con machos irradiados a 2500 rads.

Tabla No. 1.- Grupos de trabajo con elementos irradiados.

Una vez transcurrido el periodo de incubación se llevó a cabo el conteo de la progenie, en la F<sub>1</sub>.

clasificandola mediante el sistema de cruza del esquema No. 1, y con la ayuda del microscopio estereoscópico se determinó la frecuencia de pérdida de cromosomas sexuales de origen paterno.

De cada uno de los experimentos que se hicieron, la población que se sembró por frasco fue de 50 hembras por 40 machos.

De todos y cada uno de los experimentos se realizaron tres repeticiones y a los resultados obtenidos se les aplicó la prueba de  $\chi^2$  para determinar su significatividad.



ESQUEMA No. 1

DIAGRAMA DE LA CRUZA

P <sub>1</sub>	$\frac{y \quad w}{y \quad w}$	X	$\frac{X^{c2} \ yf \ bb-}{B^S \ Y \ y^+}$
F <sub>1</sub> normal	$\frac{\text{♀ } y \quad w}{X^{c2} \ yf \ bb-}$	N	$\frac{\text{♂ } Bw}{y \quad w}$ $\frac{R^S \ Y \ y^+}{}$

	ND y PERDIDA DE CROMOSOMAS X en ♀♀	ND y PERDIDA DE CROMOSOMAS X en ♂♂
F <sub>1</sub> no disyuncional	$\frac{y \quad w}{y \quad w}$ $\frac{X^{c2} \ yf \ bb-}{B^S \ Y \ y^+}$	$\frac{X^{c2} \ yf \ bb-}{X^{c2} \ yf \ bb-}$ $\frac{y \quad w}{B^S \ Y \ y^+}$
FENOTIPO	♀ Bw	♀ B      ♂ yw

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las tres repeticiones de cada uno de los experimentos, los resultados fueron consistentes en cuanto al parámetro a evaluar, frecuencia de pérdida de cromosomas sexuales de origen paterno.

Se puede observar, con los resultados obtenidos, que la descendencia promedio por hembra se vió notablemente disminuída conforme fue aumentando la dosis de radiación, (gráficas No. 1 y 2). El efecto de la radiación sobre el ADN, es dependiente de la dosis, tiempo y estado celular (Kadar, N. 1984).

Este efecto fue más evidente en la primera camada, (tabla No. 2 y gráfica No. 1), que comprende a los individuos producto de la fecundación ocurrida durante los dos primeros días después de la irradiación; que en la segunda camada, que comprende a los individuos producto de la fecundación de 3 a 5 días después del tratamiento.

Esto hace evidente la diferencia de sensibilidad a la radiación que existe entre los ovocitos del estado 14 que son los que se colectan en la primera camada, y el resto de los ovocitos colectados en la segunda progenie.

La ovogénesis está subdividida en catorce

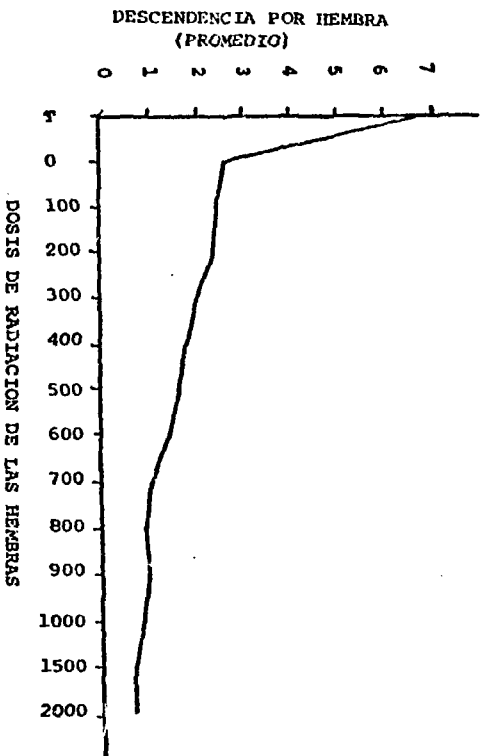
C A M A D A 1

GRUPO	DOSIS DE HEMBRAS	IPRADIACION MACHOS	HEMBRAS PROBADAS	INDIVIDUOS CON PERDIDA DE CROMOSOMAS SEXUALES DE ORIGEN PATERNO (%)		TOTAL PROGENIE	DESCENDENCIA POR HEMBRA
I	-----	-----	1100	89	(1.23)	7245	6.58
II	-----	2500	1200	214	(6.60)	3247	2.70
III	100	2500	550	91	(6.49)	1402	2.54
IV	200	2500	550	92	(6.90)	1333	2.42
V	300	2500	550	74	(6.56)	1128	2.05
VI	400	2500	1300	160	(6.96)	2414	1.86
VII	500	2500	1100	123	(6.43)	1914	1.74
VIII	600	2500	1750	158	(6.35)	2485	1.42
IX	700	2500	1750	83	(4.12)*	2012	1.14
X	800	2500	1550	92	(6.67)	1378	0.88
XI	900	2500	1750	86	(5.01)*	1715	0.98
XII	1000	2500	1300	24	(3.82)*	1202	0.92
XIII	1500	2500	850	18	(2.83)*	634	0.74
XIV	2000	2500	850	24	(3.69)*	649	0.76

\* SIGNIFICATIVO P < 0.05

TABLA No. 2. Individuos de 0 a 2 días después de la irradiación.

CAMADA 1



GRÁFICA No. 1. Individuos de 0 a 2 días después del tratamiento.

estados. En los primeros siete, las células nodrizas crecen en igual proporción; subsecuentemente empieza la formación del vitelo y el ovocito crece rápidamente.

En el estado 11, el ovocito tiene más citoplasma que todas las células nodrizas juntas; y en el estado 12 ha alcanzado su volumen máximo ( $9 \times 10^3 \text{ mm}^3$ ).

En el estado 13 desaparece la membrana nuclear. Las células nodrizas empiezan a encogerse y son subsecuentemente reabsorbidas. A partir del estado 14, y bajo condiciones normales, todos los procesos siguientes se completan en 3 días.

La radiación X afecta más cuando el ovocito se encuentra en el estado 14. Con esto podemos explicar la diferencia de sensibilidad del ovocito en estado 14, que como ya se dijo, son los que se colectan en la primer camada.

Al evaluar el parámetro de la frecuencia de individuos que perdieron un cromosoma sexual de origen paterno, se notó un incremento significativo de éstos individuos al aplicar la prueba estadística de  $\chi^2$ , comparando al grupo I con relación a los demás grupos, en los cuales los machos habían sido irradiados.

Sin embargo, cuando se comparó el grupo II Cen

donde las hembras no recibieron tratamiento alguno y se cruzaron con machos irradiados a 2500 rads) contra el grupo III al grupo VIII no se encontró diferencia significativa.

A partir del grupo IX, con excepción del grupo X, cuando los resultados se compararon con el grupo II, se encontró que las diferencias entre ellos fueron significativas.

Estos resultados hacen suponer que la radiación en las hembras de Drosophila melanogaster produjo algún cambio en el metabolismo del óvulo, que disminuye la prole promedio por hembra, debido probablemente a la disminución de óvulos maduros; aumento en los ovocitos con mutación que originan, cuando son fecundados, individuos que mueren antes de alcanzar el estado de adulto (imago). Se sabe que no todos los estados de las células germinales son igualmente sensibles a la acción mutagénica de la radiación ionizante. Con los experimentos de Heys y Harris mostraron que existe susceptibilidad diferente en los distintos estados de la gametogénesis. Hoy se sabe que los espermatozoides maduros son más susceptibles a los rayos X que las células germinales inmaduras. Además que los espermatozoides maduros no poseen la maquinaria bioquímica necesaria para reparar lesiones premutacionales; en cambio los espermatocitos si poseen dicha maquinaria (Maddern, et. al., 1976; Sankaranarayanan, et. al., 1976; Wüglér, et. al., 1976; Alexander, et. al., 1965;

Browning, 1969 y Sram, 1972).

Se han realizado muchos estudios para comparar la susceptibilidad de los espermatozoides, espermátidas, espermatoцитos y espermatogonias y los resultados siempre han sido consistentes, los espermatozoides son más susceptibles a la radiación y además carecen de mecanismos de reparación.

Pontecorvo (1940-1941; citado en Herskowitz y colaboradores, 1959), y en experimentos preliminares Müller (1940), observó que la frecuencia de pérdida de cromosomas sexuales (parcial ó total) inducidos en los espermias de Drosophila (irradiando al macho) se incrementaba cuando eran expuestos a rayos X.

Traut y colaboradores (1970) llevaron a cabo estudios para examinar la relación dosis-respuesta de pérdida de cromosomas sexuales en espermatozoides maduros y determinar la proporción parcial de pérdidas.

Leigh (1969), quien estudió la pérdida de cromosomas sexuales en forma de anillo en los machos, fundamenta que la frecuencia de machos que habían perdido un cromosoma sexual (X/O) se incrementó cuando se irradiaron a dosis de 500 a 3000 rads.

Se ha demostrado que en Drosophila, el daño

presente en los cromosomas de los espermatozoides, no es reparado sino hasta después de que se realiza la fecundación, utilizando las enzimas existentes en el óvulo de la hembra. La fertilización del huevo ocurre en el útero.

Estudios llevados a cabo han evidenciado la existencia de mecanismos de reparación en las hembras, los cuales actúan sobre el daño inducido por la radiación en los cromosomas de los espermatozoides fecundantes.

Cuando se compararon los resultados obtenidos en este trabajo con los resultados previos (Guzmán y colaboradores, 1986; 1987), se pudo observar que la tendencia es la misma, puesto que la radiación a las hembras, previamente a la cruce, disminuía la frecuencia de individuos que habían perdido un cromosoma sexual de origen paterno.

Los resultados obtenidos en la camada 2, tabla No. 3 y gráfica No. 2, que comprende de tres a cinco días después del tratamiento con la radiación, al evaluar el parámetro de pérdida de cromosomas sexuales de origen paterno, los resultados no fueron significativos, sin embargo, se notó que como en la camada 1, tabla No.2, también disminuye la descendencia promedio por hembra, aunque tiende a estabilizarse.

Esto sugiere que la radiación produce un

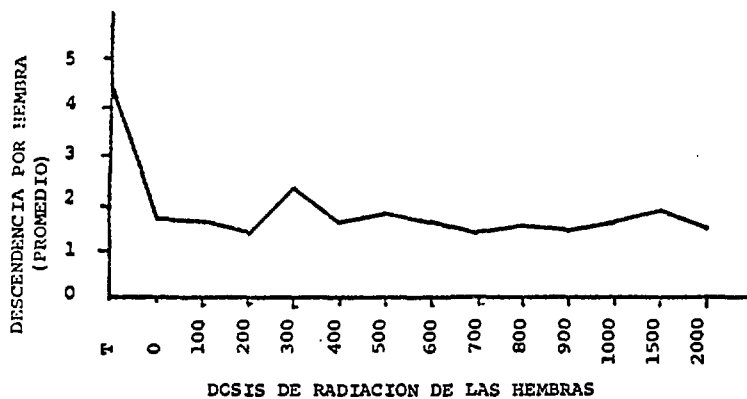


C A M A D A      2

GRUPO	DOSIS DE IRRADIACION		HEMBRAS PROBADAS	INDIVIDUOS CON PERDIDA DE CROMOSOMAS SEXUALES DE ORIGEN PATERNO (%)		TOTAL PROGENIE	DESCENDENCIA PCR HEMBRA
	HEMBRAS	MACHOS					
I	-----	-----	1100	45	(0.94)	4759	4.32
II	-----	2500	1200	67	(3.34)	2006	1.67
III	100	2500	550	41	(4.54)	903	1.64
IV	200	2500	550	19	(2.33)	813	1.47
V	300	2500	550	45	(3.56)	1264	2.30
VI	400	2500	1300	72	(3.37)	2139	1.64
VII	500	2500	1100	67	(3.15)	2130	1.85
VIII	600	2500	1750	117	(3.97)	2941	1.63
IX	700	2500	1750	94	(3.53)	2660	1.40
X	800	2500	1550	102	(3.86)	2641	1.55
XI	900	2500	1750	83	(2.99)	2771	1.49
XII	1000	2500	1300	72	(3.00)	2394	1.65
XIII	1500	2500	850	62	(3.95)	1568	1.84
XIV	2000	2500	850	36	(2.73)	1314	1.54

TABLA No. 3. Individuos de 3 a 5 días después de la irradiación.

CAMADA 2



GRAFICA No. 2. Individuos de 3 a 5 días después del tratamiento.

efecto en el metabolismo de los ovocitos, y que este efecto disminuye a medida que pasa el tiempo, de manera que en la segunda camada no se detectan diferencias; ni en la frecuencia de pérdida de cromosomas, ni en el tamaño de la progenie, que puedan ser atribuidos a la dosis de radiación.

Esto podría significar que la disminución de este daño no está relacionado con la inducción de un mecanismo de reparación radioinducible semejante al SOS que se ha descrito en levaduras y bacterias (Pang y Walker, 1983; Hofmeister y Eitner, 1981; Fields y Yasbin, 1983; Stadler y Meyer, 1981; Baker, 1983; Fabre y Roman, 1977; Eckardt y colaboradores, 1978; Leaper y colaboradores, 1980) y que puede ser desencadenada por los daños producidos por luz ultravioleta ó radiación gamma (Mac Phee y Leiden, 1985).

Se puede pensar que la radiación ionizante quizá interfiera con los mecanismos de reparación existentes y constitutivos, retardando ó impidiendo la restitución de fragmentos cromosómicos, y esto se traduce en un incremento en la frecuencia de letales dominantes, muerte de cigotos, o muerte de ovocitos, lo que disminuye la frecuencia de individuos portadores de aberraciones cromosómicas numéricas ó estructurales, es decir, que los individuos que se recobrarían como portadores de pérdida de cromosomas sexuales en realidad se pierden, dando como resultado una disminución en el tamaño de la progenie.

Otra alternativa podría ser que los gametos y cigotos portadores de daño cromosómico significativo (que normalmente se restauraría en forma parcial, mediante los mecanismos de reparación y que en este caso permanecen sin reunirse), mueren en diferentes estados del desarrollo, lo que redundaría, también, en la disminución de la progenie, y por lo tanto la de individuos anormales que se recuperarían la progenie.

Se sugiere continuar con las investigaciones en cuanto al parámetro de pérdida de cromosomas sexuales de origen paterno, realizando experimentos utilizando líneas de laboratorio deficientes en diferentes sistemas de reparación, para poder esclarecer el mecanismo que modifica la frecuencia de daño de origen paterno recuperado en las progenies. Además aplicar dosis menores de radiación a los machos de la línea X<sup>2</sup>, ya que estos individuos son sumamente sensibles a los diferentes agentes mutagénicos.

## CONCLUSIONES

- I.- La radiación ionizante aplicada a las hembras de Drosophila melanogaster modifica la frecuencia de pérdida de cromosomas sexuales de origen paterno.
  
- II.- Se puede observar que la disminución de la frecuencia de pérdida de cromosomas sexuales de origen paterno, se presenta cuando la dosis de radiación de las hembras es de 700 rads.

## BIBLIOGRAFIA

- Aiberts, B., y Sternglanz, R., 1977. Recent excitement in the DNA replication problem. *Nature*, Num. 269, pp. 655-661.
- Alexander, M. L., y Evalea, G., 1965. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Num. 53, 282-288.
- Arena, B., 1971. *Ionizing radiation and life*. The C.V. Mosby Company. Saint Louis.
- Baker, T. I., 1983. Inducible nucleotide excision repair in Neurospora. *Mol. Gen. Genet.*, 190:285-299.
- Browning, L. S., 1969. *Mutation Res.*, 8, pp. 157-164.
- C.F.E. Comisión Federal de Electricidad, 1987. *Del fuego a la energía nuclear*. Folleto de divulgación.
- Eckardt, F., Moustacchi, E., y Haynes, P. H., 1978. On inducibility of error prone repair in yeast. In Hanawalt, P., Friedberg, E., Fox, C., (eds): *DNA repair mechanisms*. New York Academic, pp. 421-423.
- Eiespuru, R. K., 1984. Induction of bacteriophage-lambda by DNA-interacting chemicals. *Chem. Mutagens*, 9:213-231.

Fabre, F., y Roman, F., 1977. Genetic evidence for inducibility of recombination competence in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 74:1667-1671.

Félix, E., 1972. Teoría sobre la mutación somática en relación con el envejecimiento. Efecto de la radiación con el envejecimiento. Efecto de la radiación ionizante y de algunos compuestos antioxidantes sobre la duración de la vida de Drosophila melanogaster. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. U.N.A.M.

Fields, P. I., y Yasbin, R. E., 1983. DNA repair in E. subtilis: An inducible dimer specific W-reactivation systems. Mol. Gen. Genet., 190:475-480.

Goodenough, U., 1981. Genética. Ed. Omega, Barcelona. Cap. 1.

Guzmán, J., 1986. Mecanismos de reparación del ADN. I Congreso Colombiano y VII Latinoamericano de Genética. Serie Eventos Científicos Colombianos. Ed. Guadalupe L.T.D.A., Num. 43:97-101.

Guzmán, J., Cortinas, C., De la Rosa, M. E., Olvera, O., 1986. Efecto de la radiación ionizante sobre la reparación del ADN de Drosophila melanogaster. Informe técnico científico. Radiobiología 86-11, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.

- Harris, B. B., 1929. The effects of aging of X-rayed males upon mutation frequency in Drosophila. J. Heredity, 20:299-302.
- Herskowitz, I. H., 1977. Principles of genetics. 2a. ed. McMillan Publishing Co. Inc. N. Y.
- Hoffmeister, J., y Eitner, G., 1981. Repair and plasmid R46 mediated mutation requires inducible functions in Proteus mirabilis. Mol. Gen. Genet., 183:369-375.
- Kaufmann, B. P., 1941. The time interval between X-radiation of sperm of Drosophila and chromosome recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 27:18-24.
- Leaper, S., Resnick, M. A., y Holliday, R., 1980. Repair of double strand breaks and letal damage in DNA of Ustilago maydis. Genet. Res., 35:291-307.
- Leigh, B., 1969. Radiation-induced loss of ring-X chromosomes in the germ cells of Drosophila melanogaster males. Mutation Res., 8:101-109.
- Maddern, R. H., y Leigh, B., 1976. Mutation Res., 41:255-268.
- Mendelson, D., 1974. The effect of caffeine on repair systems in oocytes of Drosophila melanogaster. Mutation Res.,



22:145-156.

Mendelson, D., y Sobels, F. H., 1974. The inhibiting effect of caffeine on the maternal repair of radiation induced chromosome breaks in Drosophila. Mutation Res., 26:123-128.

Mendelson, D., 1976. The effect of caffeine on repair systems in oocytes of Drosophila melanogaster, II, The induction of chromosome aberrations in irradiated males. Mutation Res., 35:91-100.

Müller, H. J., 1940. An analysis of the process of structural change in chromosomes of Drosophila. J. Genet., 40:1-66.

Pang, P. P., y Walker, G. C., 1983. Salmonella typhimurium. LT2 uvr D gene is regulated by the lexA gene product. J. Bacteriol., 154:1502-1504.

Pontecorvo, G., 1940. Researches on the mechanisms of induced chromosome rearrangements in Drosophila melanogaster. Ph. D. Thesis, Univ. Edinburg.

Pontecorvo, G., 1941. The induction of chromosome losses in Drosophila sperm and their linear dependence on dosage og irradiation. Genet., 41:195-215.

- Proust, J. P., Sankaranarayanan, K., Sobels, F. H., 1972. The effect of treating Drosophila females with Actinomycin D on the yield of dominant lethals, translocations and recessive lethals recovered from X irradiated spermatozoa. *Mutation Res.*, 16:65-72.
- Radman, M., Villani, G., Boiteux, S., Kinsella, A. R., Glickman, B. W., y Spadari, S., 1979. Replicational fidelity: mechanisms of mutation avoidance and mutation fixation. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* XLIII; 937-946.
- Sankaranarayanan, K., y Sobels, F. H., 1976. In: M Ashburner and biology of Drosophila, Academic Press, London-New York-San Francisco. Vol. 1c., pp. 1083-1250.
- Sram, R. J., 1972. *Folio Biol. (Prague)*, 18:139-148.
- Stadler, D., y Moyer, R., 1981. Induced repair genetic damage in Neurospora. *Genetics*, 98:763-774.
- Traut, H., y Scheid, W., 1970. Cytological analysis of partial and total X-chromosome loss induced by X-rays in oocytes of Drosophila melanogaster. *Mutation Res.*, 10:583-589.
- Upton, A. C., 1982. Radiaciones ionizantes de bajo nivel y su efecto biológico. *Inv. y Ciencia.*, 67:6-15.

Würgler, F. E., y Maier, P., 1972. Genetic control of mutation induction in Drosophila melanogaster. Mutation Res., 15: 41-53.

Würgler, F. E., Maier, P., y Kalin, M., 1972. Maternal effects on sex-chromosome loss in X rayed mature sperma of Drosophila melanogaster. Arch. Genet., 45: 53-59.

Würgler, F. E., y H. Ulrich. In: 1976. In: m. Ashburner and E. Novitski (Eds.). The Genetics and Biology of Drosophila. Vol. 1c. Academic Press, New York, pp. 1269-1298.

Zimmering, S., 1983. The mei-9<sup>o</sup> test for chromosome loss in Drosophila: A review of assays of 21 chemicals for chromosome breakage. Environmental Mutagenesis 5: 907-921.



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente .....  
1029/88  
Número .....

SRITA. CAROLINA ARCEO MALDONADO  
P R E S E N T E . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido -  
aprobado el tema de Tesis "EFECTO DE LA RADIACION IONIZAN\_  
TE SOBRE EL GENOMA DE Drosophila melanogaster" para obte\_  
ner la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido ---  
aceptado como Director de dicha Tesis al Dr. Guillermo Pé\_  
rez García.

A T E N T A M E N T E  
"AÑO ENRIQUE DÍAZ DE LEÓN"  
"PIENSA Y TRABAJA"  
Guadalajara, Jal., Septiembre 8 de 1988  
El Director



Dr. Carlos Astengo Osuna

FACULTAD DE CIENCIAS

El Secretario

Ing. Adolfo Espinoza de los Monteros Cárdenas,

c.c.p. El Dr. Guillermo Pérez García, Director de Tesis, -Pte.  
c.c.p. El expediente de la alumna,

'mjsd

Al contestar este oficio citese fecha y número

Guadalajara, Jal., Octubre 25, 1989.

DR. ROBERTO ESPINOSA DE LOS MONTEROS CORDERAS,  
Director de la Facultad de Ciencias  
Universidad de Guadalajara.  
M A D R I D E N T E :

Por medio de la presente, comunico a usted, que, la  
C. Carolina Arceo Maldonado, pasante de la Carrera de Lic. en Biología,  
con número de registro 75013293, ha concluido satisfactoriamente el  
trabajo de tesis titulado **EL EFECTO DE LA RADIACION IONIZANTE SOBRE EL  
GENOMA DE Drosophila melanogaster.**

Así mismo informo que he revisado el manuscrito de  
la Tesis y considero que cumple con los requisitos establecidos por la  
Facultad a su digno cargo y no encuentro inconveniente para que se  
realicen los trámites necesarios para su examen correspondiente.

Sin más por el momento, quedo de usted

ATENTAMENTE

  
Dr. Guillermo Pérez García  
DIRECTOR DE TESIS