

SECRETARIA DE EDUCACION, CULTURA Y SALUD

Instituto de Ciencias y Artes de Chiapas

CENTRO DE ESTUDIOS SUPERIORES

ESCUELA DE BIOLOGIA

INIS-mi--13395

T E S I S

*DETERMINAR EL EFECTO DEL PRETRATAMIENTO DEL METIL
METANOSULFONATO EN LARVAS DE *Drosophila melanogaster*
SOBRE LOS MECANISMOS DE REPARACION EN
CELULAS SOMATICAS.*

PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

PRESENTA:

Maximiano Hernández Paz

SECRETARIA DE EDUCACION, CULTURA Y SALUD

Instituto de Ciencias y Artes de Chiapas

CENTRO DE ESTUDIOS SUPERIORES

ESCUELA DE BIOLOGIA

T E S I S

*DETERMINAR EL EFECTO DEL PRETRATAMIENTO DEL METIL
METANOSULFONATO EN LARVAS DE *Drosophila melanogaster*
SOBRE LOS MECANISMOS DE REPARACION EN
CELULAS SOMATICAS.*

PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

PRESENTA:

Maximiano Hernández Paz



INSTITUTO DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

2a NORTE ESQ. 3a ORIENTE A P. 782 TELEFONOS 2-58-92 2-04-77 2-37-82 2-93-92
TUXTLA GUTIERREZ, CHIAPAS

PODER EJECUTIVO DEL
ESTADO DE CHIAPAS

ENERO 8 DE 1991.

Sec. COORD. D. DE TITULACION.

Of. Núm. _____

Exp. _____

C. MAXIMIANO HERNANDEZ PAZ

Pasante de la carrera de Licenciado en Biología

En contestación a su solicitud, comunico a usted que el tema para su documento recepcional DETERMINAR EL EFECTO DEL PRETRATAMIENTO DEL METIL

METANOSULFONATO EN LARVAS DE *Drosophila melanogaster* SOBRE LOS MECANISMOS DE REPLICACION EN CELULAS SOMATICAS.

ha sido aprobado por la Coordinación de esta escuela; con vigencia de un año.

En la modalidad de Tesis

A T E N T A M E N T E
"POR LA CULTURA DE MI RAZA"

José Álvarez
ING. JOSE GPE. ALVAREZ MOCTEZUMA.
Coordinación de Titulación

I^o C. A. CH.



Dirección de
Asuntos Académicos

(F2) (Autorización de tema)

C.c.p. Dirección de Control Escolar.

A MI MADRE ZOILA PAZ CHACON.

POE DARME LA VIDA, SU AMOR, APOYO, Y
COMPRENSION EN LOS MOMENTOS MÁS
DIFICILES DE MI EXISTENCIA.

A MIS HERMANAS LUCIA GUADALUPE Y ZOILA NATIVIDAD.

POR LA AYUDA QUE SIEMPRE ME HAN BRINDADO Y SU
CARIÑO.

A MIS TIOS: SALVADOR, AMPARO, LETICIA, MA. ELENA.

A MIS PRIMOS, SOBRINOS Y CUÑADO.

A MIS AMIGOS POR LOS RATOS DE ALEGRIA QUE
SIEMPRE ME HAN BRINDARON. GRACIAS.

GRACIAS A DORIS, MARTHA, CAROLINA, HILDA
EMILIO, VIDAL Y A LOS DOCTORAS MS. ESTHER, JUDITH, OLGA, Y
ESPECIALMENTE AL DR. VICTOR MANUEL SALCEDA POR LOS CONSEJO Y
AYUDA QUE SIEMPRE ME BRINDARON, EN EL TRABAJO Y EN LO
PERSONAL.

AL DEPARTAMENTO DE RADIOBIOLOGIA EN

AL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES POR LA AYUDA
QUE ME BRINDO, ASI TAMBIEN A TODOS AQUELLOS QUE EN FORMA
DESINTERESADA HICIERON POSIBLE LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

C O N T E N I D O .

R E S U M E N .

I.-	I N T R O D U C C I O N	1
	Ia. REPARACION.....	5
	Ib. MARCO TEORICO.....	9
II.-	O B J E T I V O S P A R T I C U L A R E S .	18
III.-	H I P O T E S I S	19
IV.-	J U S T I F I C A C I O N	21
V.-	M A T E R I A L E S	23
VI.-	M E T O D O	26
VII.-	R E S U L T A D O S	42
VIII.-	D I S C U S I O N	48
IX.-	C O N C L U S I O N E S	59
X.-	L I T E R A T U R A C I T A D A	60
XI.-	G L O S A R I O	67
XII.-	G R A F I C A S	73

R E S U M E N .

Para poder evidenciar si existe un mecanismo de reparación SOS en células-somáticas se utilizaron larvas de Drosophila melanogaster. Se dió un pretratamiento con un mutágeno químico (metil metanosulfonato, MMS) que en organismos procariontes activa el sistema SOS. Posteriormente se aplicó un agente físico (rayos gamma) a larvas con y sin pretratamiento, los daños - analizados fueron mutaciones puntuales, de lesiones y recombinaciones que se evaluaron en las células del ala de las moscas, mediante el bioensayo - SMART.

Los resultados se evaluaron en forma de manchas las cuales fueron chicas - (1-2 células, mwh ó flr), grandes (3 ó más células) y gemelas (las que presentaron ambos tipos de células adyacentes). El análisis estadístico se realizó mediante el programa SMART desarrollado por Würgler y Frei. Se - evaluaron tres grupos de pretratamientos; un testigo y dos alimentados con solución MMS a concentraciones de 0.0007% y 0.0014%, que posteriormente se irradiaron a las siguientes dosis de cero, 250, 500, 750 y 1000 rads. de - rayos gamma.

Se observaron manchas chicas las cuales pueden tener dos orígenes, el primero sería daño a finales del tercer estadio, en el cual las células estan en las últimas divisiones y el segundo sería daño a larvas de estadios tempranos en los que el pretratamiento con MMS, que ocasiona lesiones que impiden a las células reproducirse. Así mismo se observaron manchas grandes, éstas se forman cuando el pretratamiento se da a las larvas que se encuen-
tran en el primer, segundo o principio del tercer estadio, también se pudieron observar manchas gemelas, que se forman por recombinación entre el centrómero y el locus flr.

Se pudo detectar que a mayor concentración de MMS y dosis de radiación gamma se indujo mayor daño. En algunos grupos esto no se observó debido posiblemente, a que se presentaron problemas de tipo técnico tales como la humedad relativa, desfasando el crecimiento de las larvas originando que los tratamientos se dieran a poblaciones que presentaban los tres estadios. Otra posibilidad es que el MMS no haya sido estable durante las 24 horas que duró el tratamiento modificando los resultados esperados. Por estos motivos no fué posible discriminar si el MMS es capaz de inducir un mecanismo de reparación en Drosophila melanogaster o no.

I.= INTRODUCCION.

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es una molécula - muy larga y compuesta de un gran número de subunidades, llamadas nucleótidos los que al enlazarse forman una larga cadena de polinucleótidos. Cada nucleótido, a su vez, está formado por tres componentes: una molécula de azúcar (La desoxi - rribosa), un grupo fosfato, y una base nitrogenada, la cual puede ser una purina (Adenina o guanina) o una pirimidina (citocina o timina). (Smith-Keary, 1974).

Aunque el ADN fué descubierto en los núcleos celulares -- por F. Miescher, en el año 1869; no se le identificó como portador directo de información genética sino hasta el año 1944. (Lehninger, 1982).

Normalmente el ADN es la forma primaria de almacenamiento de información genética pasando de una célula madre a las células hijas por el proceso de duplicación, sin embargo, se sabe actualmente que en algunos virus, el ácido ribonucleico (ARN) puede almacenar información genética, es más, en ocasiones, la información genética puede ser transferida del ARN al ADN mediante un proceso de transcripción inversa.

La cantidad de ADN en una especie, organismo o célula, es notablemente constante y no puede ser alterado por circunstancias ambientales, ni por mutaciones o por el metabolismo celular.

En casi todos los ADN's examinados el número de restos de timina, es igual al número de restos de adenina es decir $A=T$, y el número de restos de guanina es siempre igual al resto de citocina $G=C$, queda claro que la suma de restos de purinas es igual a la suma de restos primidínicos, es decir, que $A+G = C+T$.

El modelo estructural para el ADN de Watson y Crick proponía que dos cadenas polinucleótidas dextrógiras se encontraban enrolladas en forma de doble hélice alrededor de su mismo eje. Ambas cadenas o hebras son anti-paralelas, es decir, sus puentes fosfodiester $3'$, $5'$ internucleotídicos van en direcciones opuestas. (Lehninger 1982).

Debido a su organización genética, los seres vivos se dividen en dos grandes grupos: Los procariontes y los eucariontes.

En el grupo de los procariontes, el ADN es desnudo y está incluido en el citoplasma de las células, en el grupo de los eucariontes los cromosomas son complejos nucleoproteicos, o sea, polímeros de ácidos nucleicos y proteínas. Un análisis químico minucioso de los cromosomas de los eucariontes demostró que además de ADN e histonas, los cromosomas contienen moléculas de ARN, proteínas residuales, ácidos complejos, lípidos, calcio, magnesio y posiblemente contengan también hierro. (Dubinin, 1981).

El ADN determina las características de las células y las transmite de una generación a la siguiente. El ADN generalmente es estable, pero puede sufrir daños que cambien la morfología o fisiología de la célula, - estos daños se conocen como mutaciones.

Las mutaciones son procesos que modifican la información genética de las poblaciones tanto vegetales como animales, por lo tanto el hombre no escapa a dichos procesos.

Las mutaciones pueden ser causadas por agentes físicos, químicos y/o biológicos conocidos como mutágenos. Entre los mutágenos de tipo físico producidos en forma natural tenemos las radiaciones cósmicas provenientes de estrellas, como los rayos ultra violeta (U.V.) que proceden del sol, y las emanadas en forma natural de sustancias o elementos radioactivos que se encuentran en el subsuelo en forma de rocas o gases. Por otra parte el hombre ha manipulado para su beneficio las diferentes fuentes de radiación aumentando la exposición individual a este tipo de mutágenos producidos en forma artificial, como ejemplo tenemos a los rayos X utilizados en medicina, las explosiones nucleares controladas, y los reactores utilizados para producir electricidad.

Los mutagénos químicos son agentes que por su afinidad con el ADN dañan a células somáticas o germinales. Por su efecto han resultado ser potentes agentes que provocan mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas. Sin embargo, su efecto se diferencia mucho de la acción de la radiación, estos agentes pueden ayudar a controlar o promover cierto tipo de enfermedades, entre ellas el cáncer.

Las mutaciones de tipo biológico son causadas principalmente por errores metabólicos durante la duplicación del ADN de las células o por la acción de algunos virus.

Muchos mutágenos químicos encuentran las regiones débiles de los cromosomas atacando principalmente a estas, en muchos casos estos efectos se detectan en la heterocromatina. Para algunos mutágenos se ha demostrado que las rupturas cromosómicas que surgen bajo su acción no se distribuyen de una manera aleatoria mostrando una respuesta diferente a la radiación ionizante.

Ia. R E P A R A C I O N.

Las células al presentar lesiones en su ADN activan mecanismos enzimáticos de reparación. Hoy en día se estudian los siguientes tipos de reparación del ADN: Fotoreactivación, Excisión, Recombinación, Reparación SOS y Respuesta Adaptativa.

La fotorreactivación se ha detectado tanto en organismos procariontes como eucariontes, este proceso sirve para reparar las lesiones que son producidas por los rayos U.V. y requiere de una enzima fotorreactivante llamada fotoliasa.

La excisión o reparación oscura requiere de la activación de varias enzimas, la distorsión de la molécula de ADN es reconocida por la endonucleasa la cual cataliza el rompimiento de los enlaces fosfodiéster cerca del extremo 5'. La segunda enzima que funciona como catalizador es la ADN polimerasa la cual tiene una actividad exonucleasa en dirección 3' a 5'; así la parte dañada se separa con otros nucleótidos y el hueco es resintetizado. La tercera enzima de este tipo de reparación es la polinucleótido ligasa que une enlaces fosfodiéster abiertos.

Sin embargo no todas las lesiones en el ADN son reparadas mediante estos mecanismos, la Recombinación es el intercambio de bandas homólogas del ADN, en donde los segmentos sanos pueden servir de modelo para que los segmentos dañados sean copiados correctamente, permitiendo así la duplicación de la molécula de ADN.

Existen tipos de lesiones en la molécula de ADN causadas por agentes físicos o químicos, que a su vez activan una serie de manifestaciones genéticas conocidas - en su conjunto como sistema o funciones SOS (Radman - 1980). Este sistema está controlado por genes, como rec A que codifica para el represor del sistema y lex A que codifica para la proteína que destruye al represor.

Este mecanismo de reparación llamado por M. Radman - "mecanismo de reparación SOS" permite la prosecución de la duplicación sin discontinuidad en la molécula del ADN -- puesto que inserta nucleótidos sin importar la secuencia de la cadena original. (Sarasin, 1981).

Este proceso por lo tanto permite seguir la duplicación del ADN, pero acumula mutaciones causadas por el - remplazamiento de una base por otra.

Este mecanismo ha sido ampliamente estudiado en procariontes, sin embargo, en eucariontes existen evidencias de fenómenos semejantes, como en los hongos Neurospora crassa (Stadler y Moyer, 1981; Baker, 1983), - Ustilago Maydis (Leaper et al, 1980).

En *Drosophila melanogaster*, utilizando radiación ionizante se han detectado respuestas que podrían coincidir con un mecanismo inducible de reparación (Guzmán et al 1988). La importancia de la existencia de un mecanismo de reparación mutagénica como el SOS en eucariontes radica en su relación con procesos carcinogénicos

En procariontes, se ha demostrado que mutágenos químicos también son capaces de inducir el mecanismo de reparación SOS.

Entre los metanosulfonatos probados en cepas como AB 2463, AQ 5931, C 600, SR 321, PQ 30 de Escherichia coli, el METIL METANOSULFONATO (MMS) cuya fórmula es $C_2H_6O_3S$, induce una mayor reparación SOS. En cepas TA 98 y TA 100 de Salmonella typhimurium se ha observado que el MMS presenta una clara actividad mutagénica e induce genotoxicidad en cromotest o cromoensayo SOS. (Eder et al, 1989a).

En *Drosophila melanogaster*, Guzmán et al, (1990) encontraron una posible inducción de reparación mediante tratamientos con MMS.

El MMS es un agente alquilante monofuncional que provoca daño al ADN, por metilación del nitrógeno en los anillos de purina, principalmente en N7 de guanina, produciéndose lesiones primarias, tales lesiones por metilación pueden ser retiradas por enzimas de reparación por excisión, los espacios pueden ser llenados incorrectamente por la enzima ADN polimerasa en el triplete dañado así las lesiones premutacionales del ADN son estables en más de una división celular, apareciendo rompimientos pequeños en la siguiente ronda de replicación como espacios postreplicativos opuestos a las bases metiladas o sitios apúricos.

I.b. MARCO TEORICO.

Drosophila melanogaster (Fig. 1) es un sistema adecuado para estudios de Genética, ya que presenta un período de vida corto y se reproduce rápidamente, cada hembra fecundada puede producir más de 400 ó 500 descendientes obteniéndose una población numerosa en corto tiempo, es fácil de cultivar en laboratorio en espacios-pequeños, no necesita un manejo sofisticado.

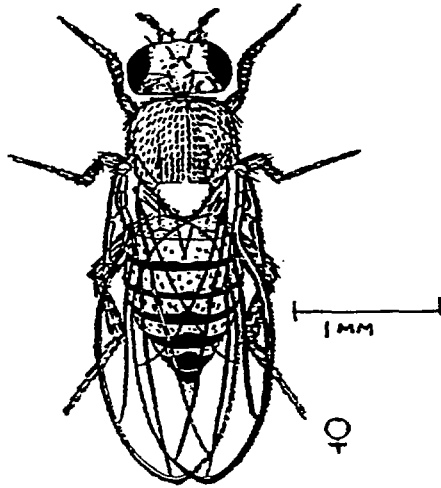


Fig. 1. Mosca de la fruta "*Drosophila melanogaster*."
(De T.H. Morgan)

Una de las principales ventajas es que tiene solamente cuatro pares de cromosomas que están casi totalmente mapeados y en glándulas salivales se presentan como cromosomas politénicos gigantes (fig. 2) por lo que es posible correlacionar los estudios Genéticos y Citológicos. (Smith-Keary, 1974).

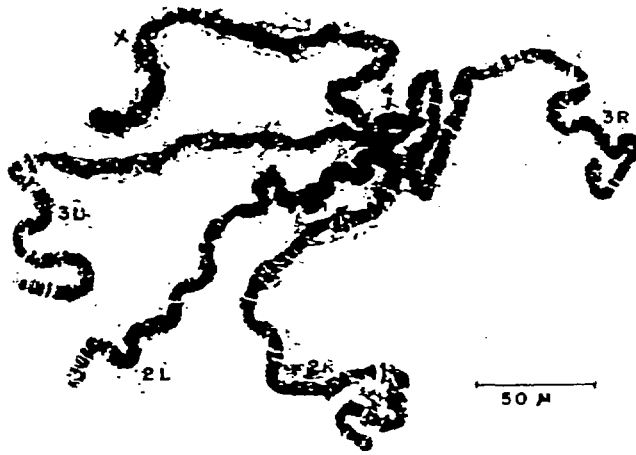


Fig. 2 Cromosomas de las glándulas salivales de "Drosophila melanogaster". (De B.P. Kaufmann)

" Drosophila melanogaster" es un insecto holometábolo, és to es, sufre metamorfosis completa, pasando por los estadios - de huevo, larva, pupa e imago.

El huevo mide aproximadamente medio milímetro de longitud , el lado dorsal es más aplanado que la superficie ventral, lige ramente curva. La membrana externa o cori^on es opaca y tiene hexágonos dibujados en su superficie. El par de fila lmentos que se extienden de la región anterodorsal, evi itan que se hundán en la superficie blanda del alimento. (Demerec y Kaufmann, 1962).

Las células del blastodermo se diferencian en dos direcciones, algunas darán lugar a parte del cuerpo de la larva, - mientras que otras al final del tercer estadio tendrán una función específica en la mosca adulta (constituirá a las patas etc.).

Durante el desarrollo embrionario algunas células se separan en forma de paquetes discretos de células esenciales indiferenciadas, denominadas cada una de estas regiones "Discos imagales". (fig. 3.). Existe un disco para cada una de las patas, para cada una de las alas, para las estructuras genitales, etc.

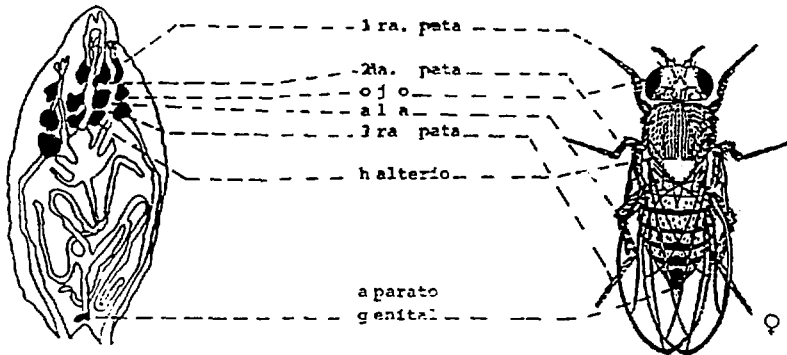


Fig. 3 Discos Imagales y su correspondencia con la estructura que van a dar origen en el adulto de *D. melanogaster*.

(De Wilkins)

Los " discos imagales " son invaginaciones modificadas de la epidermis que forman sacos esencialmente vacíos compuestos de una capa simple de epitelio más otras células asociadas, un lado es un pliegue de epitelio columnar, el otro lado - del saco es una capa transparente escamosa llamada membrana peripodal.

El disco entero está rodeado por una membrana basal la cual es continua con la membrana de la epidermis larval. Las células del epitelio de los discos poseen una polaridad. Las células se dividen en un plano normal del epitelio. Los diferentes discos se derivan de pocas células (6-40), - para los discos del ala son 38 células. La proliferación celular del disco es generalmente logarítmica.

Las células de los " Discos imagales " conservan su morfología indiferenciada hasta el momento en que se exponen a la acción de la hormona ecdisona que determina la formación del tejido adulto. (Goodenough, 1981).

Después de eclosionar la larva sufre dos mudas, de modo que el período larvario consta de tres estadios. En el último o tercer estadio, alcanza una longitud de 45 mm. -- Cuando la larva se está preparando para pupar, se retira del medio de cultivo fijándose en una superficie relativamente seca, pupa dentro de la última exuvia, llamada pupario, al principio es suave y planquecina, pero lentamente se hace dura y se oscurece (Fig. 4).

De acuerdo con Würgler y Vogel (1986) bajo condiciones normales de cultivo (25°C, 70-75% de humedad relativa), la sucesión y duración aproximada de los estadios en el ciclo de vida son los siguientes:

Desarrollo embrionario (huevo)	24 horas.
Primer estadio larval (L1)	24 horas.
Segundo estadio larval (L2)	24 horas.
Tercer estadio larval (L3)	48 horas.
Prepupa	4 horas.
Pupa	108 horas.
Adulto o imago	más de 40 días.

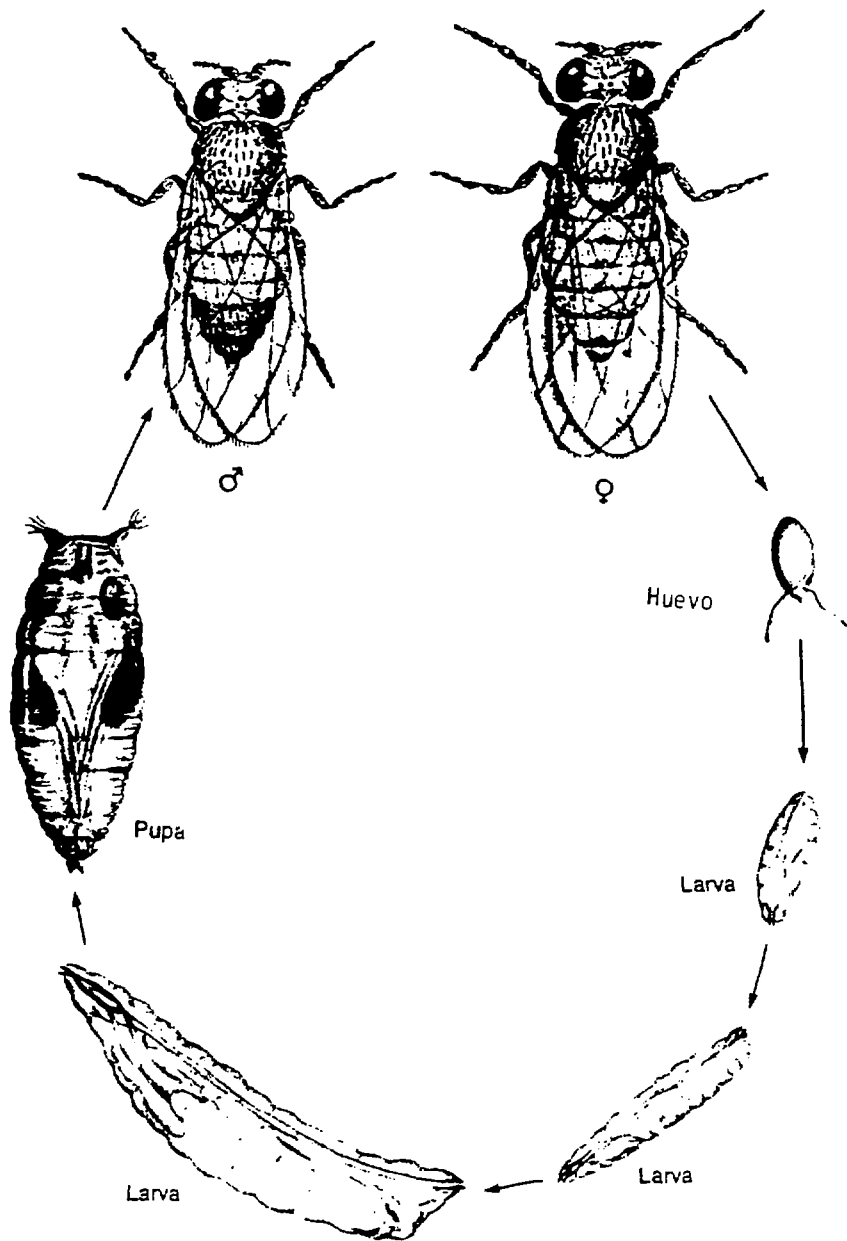


Fig. 4 Ciclo de v.da de *Drosophila melanogaster*.

Los adultos presentan diferenciación sexual, observándose principalmente en el abdomen y en las patas anteriores; en el abdomen de la hembra se aprecian del macho solo 5, el extremo del abdomen es alargado en la hembra y un poco redondeado en el macho. A medida que la hembra madura, el abdomen aumenta de volumen debido a la maduración de los huevecillos. Los machos tienen un peine sexual que consiste en una fila de aproximadamente 10 --cerdas gruesas en la extremo distal del segundo tarsal basal de la pata anterior, en la hembra faltan tales --cerdas. Estas características permiten separar fácilmente los sexos (fig. 5.)

De acuerdo con Dubinin (1981) el ala de "Drosophila es muy característica ya que contiene cinco venas transversales y dos longitudinales. (fig. 11).

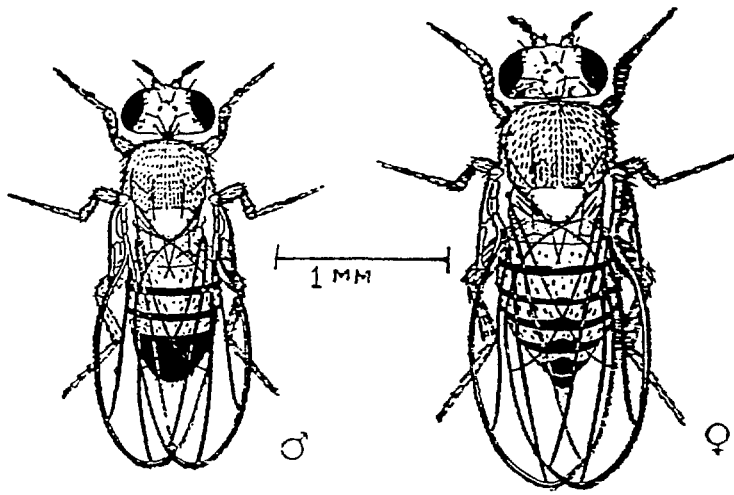


Fig. 5 Moscas adultas de *Drosophila melanogaster*: macho a la izquierda, hembra a la derecha. (De T.H. Morgan).

II.- OBJETIVO.

Determinar el efecto del pretratamiento del Metil - Metanosulfonato en larvas de " Drosophila melanogaster ", sobre los mecanismos de reparación en células somáticas.

OBJETIVOS PARTICULARES.

Determinar si las células somáticas de D. melanogaster modifican su frecuencia de mutación y recombinación-somática al administrarles diferentes dosis de Metil Me tanosulfonato.

Determinar el efecto del pretratamiento con Metil Me tanosulfonato sobre la frecuencia de mutación y recombi nación somática en larvas tratadas con diferentes dosis de radiación gamma (x).

III.- HIPOTESIS.

La hipótesis planteada en el presente trabajo fué, si el Metil Metanosulfonato activa mecanismos de reparación propensos a error en sistemas procariontes como lo es el sistema SOS, podría esperarse una respuesta similar en eucariontes.

Si el Metil Metanosulfonato (MMS) tuviera este efecto en " *Drosophila melanogaster* ", al aplicar un -- tratamiento a larvas de 72 horas podríamos observar que las células de los discos imagales manifestarían un daño debido al efecto directo del MMS. Sin embargo, al inducir un mecanismo de reparación, esperaríamos que si se presenta algún otro tratamiento (rayos gamma) que produzca daño al ADN, el efecto de este segundo tratamiento se vería disminuido debido a que los mecanismos-- están activos y hay tolerancia al efecto de radiación.

Pero, sí los mecanismos de reparación inducidos no lo-- gran reparar rápidamente el daño, las células expresarían - el efecto ocasionado por el MMS y al aplicar la radiación se esperaría que su efecto fuera el mismo con o sin pretrata-- miento de MMS.

Si el MMS en vez de activar los mecanismos de reparación, sensibilizó a las células tratadas, al aplicar la dosis de radiación se esperaba un daño mayor.

IV.- JUSTIFICACION.

El metil Metanosulfonato (MMS) es un agente alquilante monofuncional muy usado en estudios de genotoxicidad puesto que muestra una gran actividad mutagénica. (Eder et al., 1989). Al igual que muchos otros agentes ocasionan lesiones en la molécula del ADN.

Por otra parte, las lesiones ocasionadas por el MMS inducen una serie de manifestaciones genéticas, que son producidas por la acción de genes que desencadenan mecanismos de reparación y de tolerancia al daño en el material genético. (Breña, et. al., 1989).

En cepas de Escherichia coli y Salmonella typhimurium, el MMS induce reparación SOS. Este sistema está controlado por genes, como " lex A ", cuyo producto reprime a todo el sistema "rec A. ". El producto de "rec A " destruye al primero activando a los genes responsables de la reparación SOS. Esto ha sido ampliamente estudiado en procariontes. (Eder et al., 1988).

Debido a la naturaleza del mecanismo SOS es importante demostrar si se presenta también en eucariontes y en su caso caracterizarlo. Por ello y en virtud de que Drosophila melanogaster es un organismo eucarionte, es susceptible a pruebas de mutagenicidad, ya que presenta una capacidad metabólica similar a al de los mamíferos, por ésto se decidió utilizar este sistema de prueba en los experimentos realizados en esta tesis.

En el presente trabajo se planteó evaluar la interacción del MMS con los mecanismos de reparación en células somáticas de D. melanogaster, mediante el ensayo del ala, el cual no necesita un manejo sofisticado, es barato y permite obtener información estadísticamente -- confiable.

V.- MATERIALES.

El material Biológico para realizar el presente estudio fue obtenido del Laboratorio de Radiobiología, específicamente se trabajó con dos cepas las cuales se caracterizan por presentar los marcadores mwh/mwh -- (hembras) y flr³ TM3,Ser (Machos). Este trabajo se desarrolló en el ININ y las irradiaciones fueron provocadas por la unidad de irradiación de rayos gamma con Co⁶⁰ llamada Vick Rad 2000 de la marca Vickers Radiation División, Swindon, England; A continuación se proporciona una lista del equipo y reactivos, para ilustrar con más claridad lo que en Método se detalla:

- 1.- Frascos lecheros de 1/4 de litro.
- 2.- Frascos homeopáticos de 2 cm. de diámetro y 9 cm. de altura.
- 3.- Eterizador.
- 4.- Algodón.
- 5.- Pinceles.
- 6.- Tapones de poliuretano de 4 cm. de diámetro.
- 7.- Marcador de tinta indeleble.
- 8.- Morge.
- 9.- Platina esmerilada.
- 10.- Embudos.

- 11.- Gasa.
- 12.- Soporte universal.
- 13.- Embudo de separación.
- 14.- Piceta.
- 15.- Matraz erlenmeyer de 500 ml.
- 16.- Cajas petri de 5 cm.
- 17.- Papel filtro.
- 18.- Ligas.
- 19.- Pinzas de relojero del No. 5.
- 20.- Agujas de Disección.
- 21.- Cubre objetos.
- 22.- Porta objetos.
- 23.- Microscopio de disección.
- 24.- Microscopio óptico.
- 25.- Estufa.
- 26.- Batidora.
- 27.- Alcohol etílico al 70%.
- 28.- Solución de sacarosa al 5% y 20%.
- 29.- Solución de Metil Metanosulfonato a 0.0007% y a 0.0014%.

MEDIO NUTRITIVO (Para 7 Lt.).

Agar.	119 grs.
Harina de maíz.	421 grs.
Sacarosa.	256 grs.
Dextrosa.	196 grs.
Levadura.	226 grs.
Agua para disolver la levadura.	1200 ml.
Alcohol.	30 ml.
Ac. Propiónico.	30 ml.

SOLUCION DE FAURE'S.

Goma Arábica.	30 grs.
Hidrato Cloral.	50 grs.
Glicerol.	20 ml.
Agua destilada.	285 ml.

VI.- METODO.

Para la realización del trabajo se utilizaron cepas de Drosophila melanogaster que presentaron marcadores de determinados fenotipos expresados sobre las alas de las moscas.

La primera cepa presentaba el marcador, MULTIPLES PELOS EN EL ALA (mwh). Este marcador es recesivo homócigo viable y se conserva en la cepa como constituyente genético mwh/mwh. (Fig. 6) El gene multiple pelos en el ala está localizado cerca del extremo del brazo izquierdo del cromosoma 3 (mwh 3 0.0) y determina que las células de las alas que porten este marcador presenten tres o más cerdas en lugar de una como lo hace el alelo silvestre -- (fig. 7).

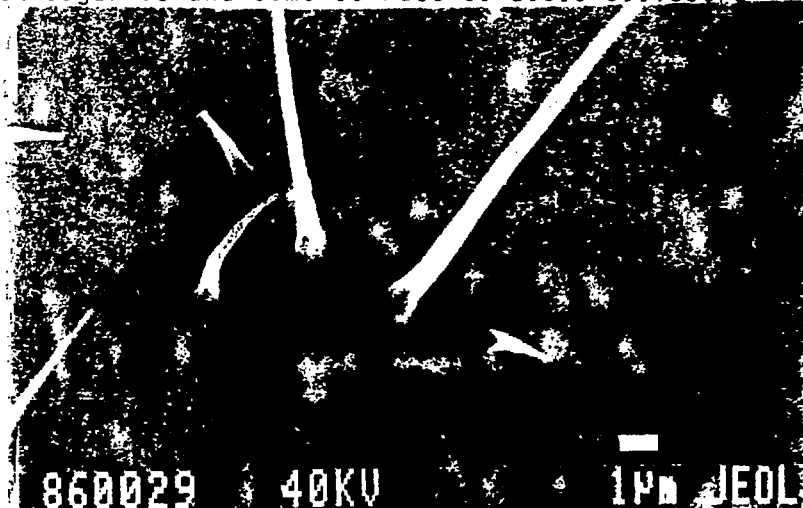


Fig. 6. Fenotipo mwh, a escala de .1 μ m. (De Würgler y Graf.).

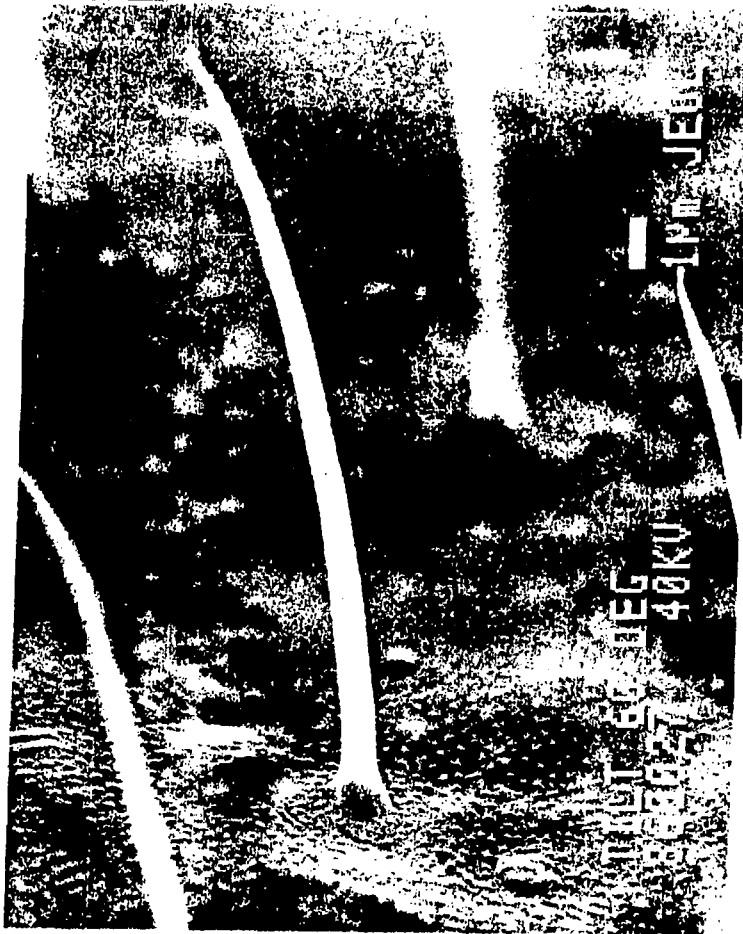


Fig. 7. Fenotipo silvestre, a escala de 1 um.

(De Würgler y Graf.).

La segunda cepa presentaba el marcador FLAMA (flr) que es recesivo y afecta los pelos de las alas al igual que mwh, presentando tricomas anormales que se arreglan en forma de flamas o rosetas, cada roseta corresponde a una célula epidérmica (fig. 8).



Fig. 8. Fenotipo flr, a escala de 1 um. (De Würgler y Graf)

Este marcador está localizado en el brazo izquierdo del cromosoma 3 pero más proximal cerca del centrómero (flr 3-39.0). El alelo mutante en este locus fué inducido y aislado por Garcia-Bellido y Dapena (1974). - Desafortunadamente todos los alelos flr son letales en condición homocigota (flr/flr) y bajo esta presencia no son capaces de desarrollar cepas.

Debido a la letalidad homociga de flr , los alcos tienen que ser mantenidos en línea con un cromosoma balanceador, en este caso con $TM3$ que es portador de inversiones múltiples y un marcador dominante que es letal en condición homocigota, $serrata$ (Ser). El marcador Ser . modifica los bordes de las alas haciéndolas discontinuas.

Para la prueba se utilizaron hembras vírgenes mwh/mwh y machos $flr^3 TM3, Ser$. La progenie consistió de larvas heterocigotas $mwh + flr^3$, y heterocigota $mwh + / + TM3, Ser$, que al desarrollarse dan lugar a dos tipos de adultos los que tienen las alas normales y los que tienen las alas discontinuas. De estos dos tipos de moscas adulta normalmente solo las alas normales son analizadas.

La cruce $mwh + ! + flr^3$, presenta una baja espontaneidad en cuanto la frecuencia de manchas simples pequeñas y de células con dos pelos. Esta cruce es ligeramente sensible a cambios drásticos de temperatura (Würgler y Vogel, 1986).

Para coleccionar los huevos se colocaron parejas de adultos en frascos lecheros limpios, tapados con cajas petri con medio nutritivo, se dejaron ovipositar durante 6 horas a una temperatura de 25 °C. (fig. 9.)

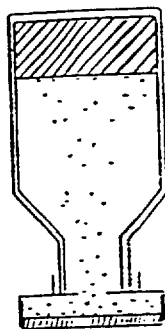


Fig. 9. Colecta de Huevos.

Una vez que se coleccionaron los huevos se incubaron hasta que las larvas alcanzaron la edad de tercer estadio. Para coleccionar las larvas se agregó solución de sacarosa al 20% para separarlas del medio nutritivo, se vertió la solución con las larvas en un embudo de separación, y se dejaron pasar a través de una gasa para aislar las larvas, ya separadas del medio se pasaron a cajas petri con papel filtro, en cada caja se colocaron 150 larvas de 72 ± 4 hrs. (fig. 10).

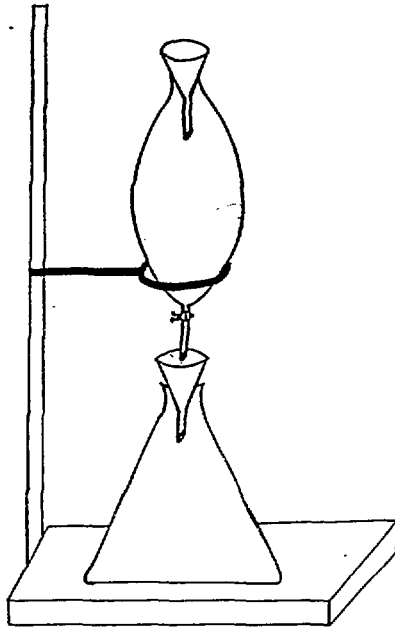


Fig. 10. Colecta de Larvas.

Para conocer la toxicidad de una sustancia, la forma para administrarla es por vía oral, en larvas de tercer estadio la cual es una forma rutinaria de evaluar un químico. Dependiendo de la duración del período de alimentación el tratamiento puede ser agudo o crónico. En este caso el tratamiento fué -- crónico.

Para preparar las soluciones, el MMS fué diluido en una solución de sacarosa al 5% y se obtuvieron las concentraciones de cero % (testigo) 0.0007% y 0.0014%. Los tratamientos se aplicaron durante 24 horas en cajas de petri, colocándose 150 larvas por caja.

Después del tratamiento se aplicaron diferentes dosis de radiación bajo el siguiente esquema:

- 1). Larvas pretratadas con sacarosa sin irradiar.
- 2). Larvas pretratadas con sacarosa e irradiadas a 250 rads.
- 3). Larvas pretratadas con sacarosa e irradiadas a 500 rads.
- 4). Larvas pretratadas con sacarosa e irradiadas a 750 rads.
- 5). Larvas pretratadas con sacarosa e irradiadas a 1000- rads.
- 6). Larvas con MMS a 0.0007% sin irradiar.
- 7). Larvas con MMS a 0.0007% e irradiadas a 250 -- rads.
- 8). Larvas con MMS a 0.0007% e irradiadas a 500 -- rads.

- 9). Larvas con MMS a 0.0007% e irradiadas a 750 - rads.
- 10). Larvas con MMS a 0.0007% e irradiadas a 1000 - rads.
- 11). Larvas con MMS a 0.0014% sin irradiar.
- 12). Larvas con MMS a 0.0014% e irradiadas a 250 rads.
- 13). Larvas con MMS a 0.0014% e irradiadas a 500 rads.
- 14). Larvas con MMS a 0.0014% e irradiadas a 750 rads.
- 15). Larvas con MMS a 0.0014% e irradiadas a 1000 - rads.

Las larvas tratadas fueron transferidas a frascos homeopáticos ("Vials") con medio nutritivo y se dejaron in cubar a temperatura de 25 °C hasta su emergencia.

Una vez emergidas las moscas se colocaron en alcohol etílico al 70%, se les desprendieron las alas con la ayuda de una pinza de relojero y una aguja de disección y se proce dio a montarlas en portaobjetos. Para la preparación permanen te de las alas se utilizó la solución de Faure. Las preparaciones se dejaron secar en una atmósfera libre de polvo

durante 24 horas, posteriormente se les agregó una gota de la solución de faure, y se colocó el cubre objetos de jándose secar por 24 horas más.

La observación de las alas se realizó al microscopio óptico a un aumento de 400 X recorriendo el ala de la región A a la región E. (Graf et al., 1983). - (fig. 11.)

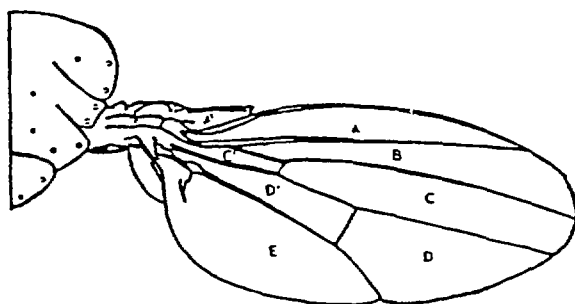


Fig. 11. Diferentes Regiones de A - E en la superficie del

Ala de Drosophila melanogaster.

(De Würgler y Graf)

Su análisis se basó en el hecho de que las alas en esta cruzada tienen tricomas que presentan una sola cerda normal, sin embargo, en ocasiones se observaron zonas de tricomas que presentaron tres o más cerdas (mwh). Por otra parte, es posible encontrar tricomas que tengan cerdas en forma de rosetas (flr) o incluso zonas donde se encuentran ambos tipos de tricomas. A estas regiones se les denomina manchas.

Para su análisis las manchas se clasificaron en sencillas y gemelas, considerándose sencillas a aquellas que constaron de un solo tipo de cerdas (mwh o flr) (fig. 12 a y b.) y gemelas a aquellas que presentan los dos tipos de cerdas (mwh y flr). (fig. 12 c.)

Las manchas sencillas a su vez pueden ser pequeñas -- cuando constan de una o dos células, o grandes cuando presentan tres o más células.

Los daños genéticos que pueden ser detectados mediante la prueba de ala son recombinación, delección, mutación -- puntual, aunque no es posible discriminar entre delección, y mutación puntual. (fig. 13. a y b)

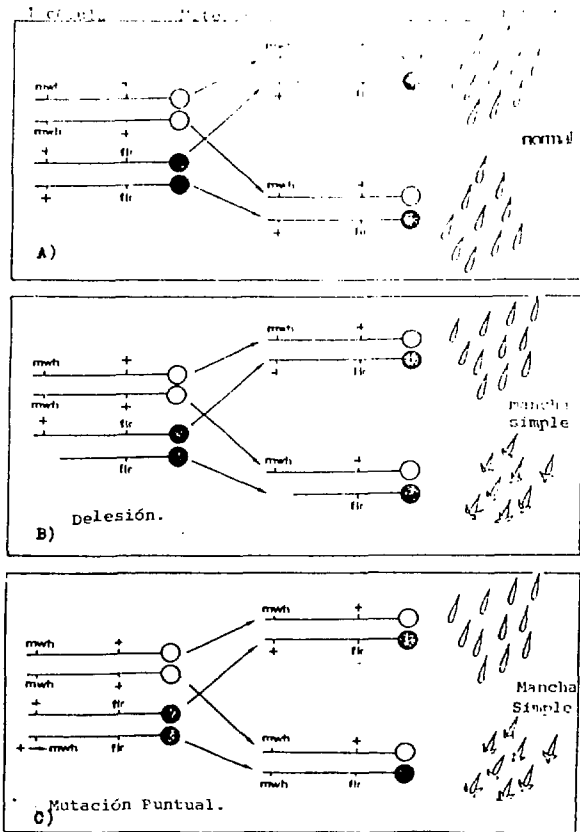


Fig. 13 A. Daño Genético. Ilustración de la forma de la mancha en la prueba de recombinación y mutación somática, con los marcadores en las células del ala, multiple wing hair - (mwh) y flere (flr) A) Normal. B) Mancha simple obtenida por delección en un cromosoma.

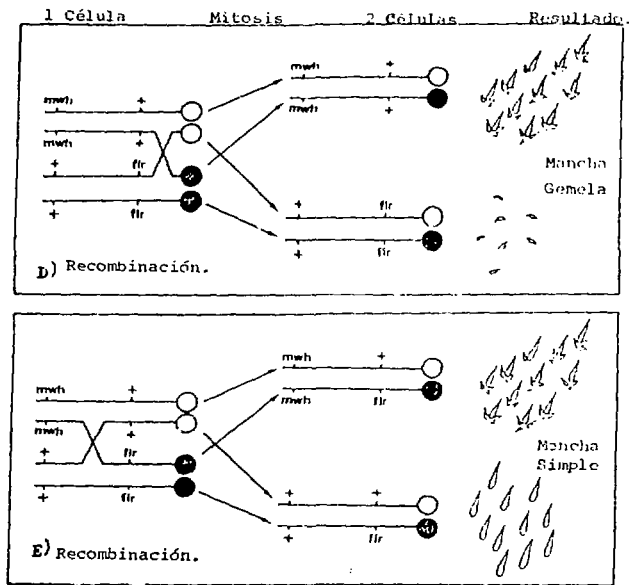


Fig.13 B. Daño Genético. C) mutación Puntual el cual produce manchas simples por cambio de el marcador en cierto lugar de un cromosoma. D) Obtención de una gemela por recombinación proximal del marcador flr. E) Recombinación más distal produciendo solo mancha simple.

El análisis de los datos se corrieron con el programa de computación SMART (somatic mutación and Recombinación Test resultados por F & Würgler) para este tipo de prueba.

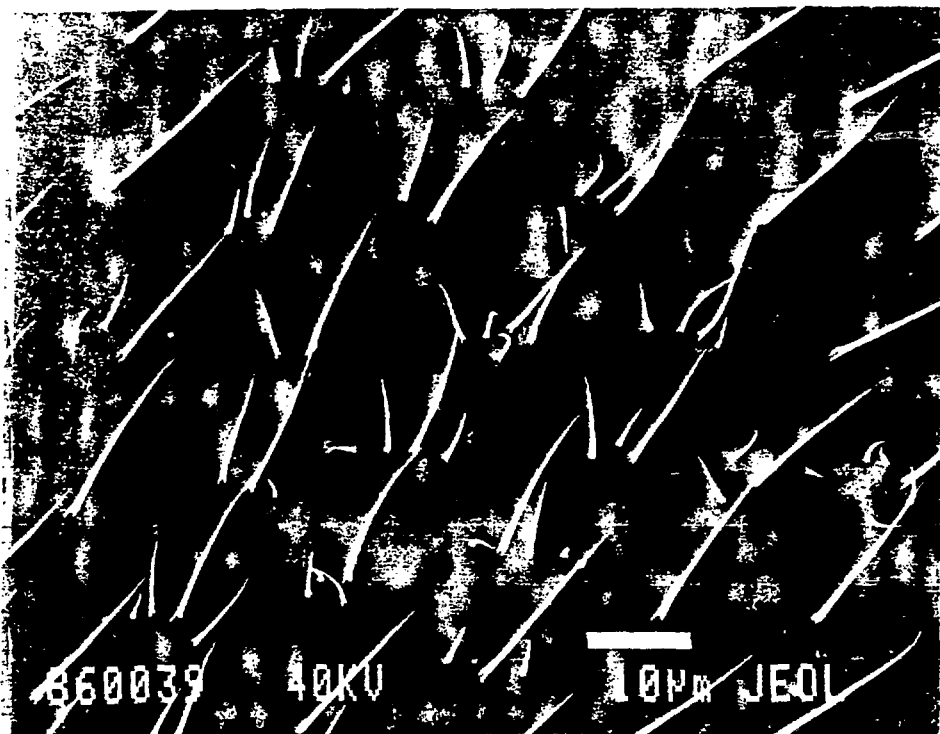


Fig. 12.a. Mancha sencilla mwh, a escala de 1 um

(De Würigler y Graf.)



Fig. 12.b. Mancha sencilla flr 3, a escala de 1 um
(De Würgler y Graf.)



Fig. 12 C. Mancha gemela (mwh-flr³)
a escala de 400X (De Cruces)

VII.- RESULTADOS.

27

En las tablas I y II, se puede observar que las diferencias en las frecuencias de las manchas chicas en general no fueron significativas. Unicamente dos grupos, los tratados con MMS a concentración de 0.0014% y dosis de radiación de 250 y 750 rads fueron significativas.

En la tabla I se agruparon los datos de manera tal que se puede comparar el efecto del MMS y diferenciar entre una concentración baja y una alta. Para manchas chicas, unicamente dos grupos presentaron diferencias significativas, éstos fueron los pretratamientos a concentración de 0.014%, el primero irradiado a 250 rads y el segundo irradiado a 750 rads, en los demás grupos las diferencias no fueron significativas presentándose in conclusas o negativas.

En la tabla II se comparan los diferentes grupos de tal manera que se puede observar el efecto de la radiación gamma, al analizar los datos no se puede detectar una respuesta lineal como se esperaba.

Para las manchas chicas los grupos tratados con sacarosa y dosis de 250 y 1000 rads presentaron diferencias significativas así como los grupos con pretratamiento con MMS a concentración de 0.0014% e irradiados con 250, 500 y 750 rads, en los demás grupos el efecto no fué significativo.

Las manchas grandes presentaron frecuencias significativas al comparar los diferentes grupos tratados con MMS, con excepción de dos grupos, el primero a concentración de 0.0007% e irradiado a 500 rads, el cual presentó una frecuencia negativa y el segundo grupo a la misma concentración de MMS y con dosis de radiación de 1000 rads, presentó una frecuencia débilmente positiva. (tabla I).

Al comparar las manchas grandes con relación a la dosis de radiación recibida (tabla II), se puede observar que las diferencias no son significativas exceptuando el grupo tratado con una concentración de 0.0014% de MMS e irradiado a 750 rads.

Para las manchas gemelas en general ninguno de los dos contrastes (radiación o MMS) algunos grupos presentaron diferencias significativas.

En la tabla I solo tres grupos de manchas gemelas presentaron una frecuencia positiva, el tratamiento de 0.0007% de MMS a dosis de 250 rads y los tratamientos a 0.0014% a dosis de 250 y 750, rads y los demás tratamientos presentaron una frecuencia inconcluyente.

Los grupos pretratados con MMS a concentración de 0.0014% presentaron un efecto significativo, en dos dosis de radiación, 250 y 750 rads y en las dosis de 500 y 1000 rads el efecto no fué significativo. (tabla I).

En la tabla II en donde se relaciona el efecto de radiación solo dos grupos presentaron diferencias significativas, éstos fueron los grupos pretratados con MMS a concentración de 0.0014% y con una dosis de 250 y 750 rads, los demás grupos a la misma concentración fueron inconcluyentes.

En la tabla I, los grupos tratados con sacarosa presentaron frecuencias que no fueron significativas, tampoco los grupos con pretratamiento de 0.0007% de MMS presentaron efecto significativo, tres grupos presentaron una frecuencia negativa y sólo a dosis de 250 rads fueron inconcluyentes.

Para las manchas totales en ambas tablas el efecto de los mutágenos fué significativo en casi todos los tratamientos. En la tabla I donde se discrimina el efecto del MMS, todos los grupos exceptuando el pretratamiento con MMS a una concentración de 0.0007% e irradiado con 500 rads presentaron frecuencias significativas.

En la tabla II, donde se correlaciona el efecto de la radiación, para el total de manchas, en el grupo de sacarosa, con dosis de 250 rads, la frecuencia fué inconcluyente, los siguientes tres grupos fueron significativos, para el tratamiento con 0.0007% de MMS, el grupo de 250 rads presentó una frecuencia significativa y en los demás grupos las frecuencias fueron inconcluyentes.

Por último los grupos correspondientes al pretratamiento con MMS a una concentración de 0.0014% presentaron diferencias significativas en todos los casos, exceptuando la dosis de 1000 rads. (tabla II).

TABLA 1.

FRECUENCIAS INDUCIDAS POR (MMS) EN LARVAS DE

Drosophila melanogaster.

TRATAMIENTOS	No. ALAS	MANCHAS CHICAS	MANCHAS GRANDES	MANCHAS GEMELAS	TOTAL
SACAROSA S/I	80	0.12(10)	0.05(4)	0.01(1)	0.19(15)
MMS .0007% S/I	68	0.22(15) ⁺	0.16(11) ⁺	0.04(3) ⁺	0.43(29) ⁺
MMS .0014% S/I	46	0.15(7) ⁺	0.57(26) ⁺	0.02(1) ⁺	0.73(34) ⁺
SACAROSA 250 R	80	0.21(16)	0.11(9)	0.00(0)	0.32(26)
MMS .0007% 250 R	54	0.28(15) ⁺	0.30(16) ⁺	0.13(7) ⁺	0.70(38) ⁺
MMS .0014% 250 R	30	0.53(16) ⁺	0.73(22) ⁺	0.43(13) ⁺	1.70(51) ⁺
SACAROSA 500 R	68	0.38(26)	0.12(8)	0.01(1)	0.51(35)
MMS .0007% 500 R	62	0.39(24) ⁻	0.16(10) ⁻	0.02(1) ⁺	0.56(35) ⁻
MMS .0014% 500 R	58	0.36(21) ⁻	0.66(38) ⁺	0.05(3) ⁺	1.07(62) ⁺
SACAROSA 750 R	74	0.24(18)	0.09(7)	0.03(2)	0.36(27)
MMS .0007% 750 R	76	0.31(24) ⁺	0.29(22) ⁺	0.03(2) ⁺	0.63(48) ⁺
MMS .0014% 750 R	54	0.48(26) ⁺	1.03(56) ⁺	0.20(11) ⁺	1.72(93) ⁺
SACAROSA 1000 R	78	0.26(20)	0.12(9)	0.01(1)	0.38(30)
MMS .0007% 1000 R	80	0.36(29) ⁺	0.24(19) ⁺	0.03(2) ⁺	0.63(50) ⁺
MMS .0014% 1000 R	60	0.26(21) ⁻	0.46(37) ⁺	0.04(3) ⁺	0.76(61) ⁺

+ POSITIVAS.

- NEGATIVAS.

v DEBILMENTE POSITIVAS.

l INCONCLUSAS.

TABLE II.

FRECUENCIAS INDUCIDAS POR RANGOS CATEGÓRICOS DE LAS MANCHAS DE

Protophaga coarctata.

TRATAMIENTOS	Nº. ALA	MANCHAS CHICAS	MANCHAS GRANDES	MANCHAS GEMELAS	TOTAL
SACAROSA S/I	80	0.12(10)	0.05(4)	0.01(1)	0.19(15)
SACAROSA 250 R	80	0.21(16)	0.11(9)	0.00(0)	0.32(26)
SACAROSA 500 R	68	0.98(26)+	0.12(8)	0.01(1)	0.51(35)+
SACAROSA 750 R	74	0.24(18)	0.09(7)	0.03(2)	0.36(27)
SACAROSA 1000R	78	0.26(20)+	0.12(9)	0.01(1)	0.38(30)+
MMS.0007% S/I	68	0.22(15)	0.16(11)	0.04(3)	0.43(29)
MMS.0007% 250 R	54	0.28(15)	0.30(16)-	0.19(7)	0.70(38)+
MMS.0007% 500 R	62	0.39(24)	0.16(10)-	0.02(1)-	0.56(35)
MMS.0007% 750 R	76	0.31(24)	0.29(22)-	0.03(2)-	0.63(48)
MMS.0007% 1000R	80	0.36(29)	0.24(19)-	0.03(2)-	0.63(50)
MMS.0014% S/I	46	0.15(7)	0.57(26)	0.02(1)	0.73(34)
MMS.0014% 250 R	30	0.53(16)+	0.73(22)-	0.43(13)+	1.70(51)+
MMS.0014% 500 R	58	0.36(21)+	0.66(38)-	0.05(3)	1.07(62)+
MMS.0014% 750 R	54	0.48(26)	1.03(56)	0.20(11)+	1.72(93)+
MMS.0014% 1000R	80	0.26(21)	0.46(37)-	0.04(3)	0.76(61)-

+ POSITIVAS. - NEGATIVAS. v DEBILMENTE POSITIVAS.

(INCONCLUSAS.

VIII.- DISCUSION.

El trabajo realizado consistió en exponer a un grupo de células, los discos imagales de larvas de Drosophila melanogaster, a un mutágeno químico (Metil Metano sulfonato) por 24 horas y posteriormente a un mutágeno físico (rayso gamma), a diferentes dosis. Los efectos que produjeron estos dos tipos de mutágenos se observaron en las células de las alas de las moscas -- adultas (prueba de ala).

Al exponer a las células de los discos imagales que forman los tricomas del ala, a un mutágeno, se inducen cambios que se expresan en forma de una mancha, - chica, grande o gemela, dependiendo del tiempo y dosis en que ocurrió el daño y del tipo de lesión que se produjo.

Las manchas chicas se forman en un período en el cual las células de los discos imagales están en las últimas divisiones, esto es cuando las larvas están a finales del tercer estadio.

También se pueden formar manchas chicas cuando los -- tratamientos con mutágenos ocasionan lesiones que impiden a las células reproducirse. En este caso, no importa la edad de las larvas, la mancha será pequeña.

Las manchas grandes se forman cuando el tratamiento - se da en edad temprana de las larvas esto es en primero, -segundo o principios del tercer estadio.

Las manchas gemelas se forman por recombinación entre-cromátidas homólogas, en la región entre el locus flr y el centrómero, dando dos células hijas, una célula con el fenotipo de flr (pelos en forma de flama o roseta), y la otra célula con el fenotipo de mwh (múltiples pelos del ala), adyacentes una de otra.

Al comparar los diferentes tratamientos de MMS con el testigo de sacarosa, (tabla) se pudo notar un efecto -- significativo dependiente de la dosis cuando analizamos man--chas grandes.

Este efecto no es claro al analizar manchas chicas, esto - es congruente con lo que se esperaba, pues ha sido demostrado que el MMS es un agente alquilante que al aplicarse-

a larvas de 72 horas induce manchas grandes y gemelas- esto indica que el MMS tiene actividad mutagénica y re combinogénica (Clements et al.,1989).

Por lo tanto al aplicar un tratamiento con dicho mutágeno a larvas de 72 horas, las células de los discos-imagales de las alas aún pasarán por varias divisiones, y esperaríamos que al producir daño en alguna célula, esta célula continua dividiéndose generando una mancha grande (más de dos células).

Al analizar las manchas chicas bajo las mismas condiciones, no hubo una tendencia en la respuesta, es decir, la frecuencia de manchas chicas no mostró ninguna relación con el tratamiento de MMS.

Esto puede explicarse mediante el hecho de que el MMS se aplicó en una etapa temprana y después fué eliminado o degradado antes de que las células de los discos imagales llegaran a sus últimas divisiones, de manera que su efecto inicialmente se manifestó produciendo manchas grandes.

Al respecto se sabe que el MMS puede ser inestable ya que la vida media es de aproximadamente 40 horas a -

pH 7 y 25 °C (Malling y Deserres, 1973), y quizá el pH no -- fue el adecuado para mantener la actividad del compuesto, durante el período de tratamiento.

Por otra parte, al analizar la tabla II en la cual se pretende comparar el efecto de la radiación sobre los diferentes eventos registrados, se puede observar que aunque en general el número de manchas grandes se incrementa al aplicar las diferentes dosis de radiación, esta respuesta no fué dependiente de la dosis, ni se pudo encontrar una respuesta lineal.

Es muy probable que las poblaciones de larvas expuestas no hayan sido homogéneas, y que el tratamiento, por lo tanto incidiera en diferentes estadios larvarios, mezclando así una respuesta que la hace más difícil de interpretar.

Al respecto, podemos comentar que aunque el período de colecta de huevos fué de 4 horas y la incubación previa al tratamiento con MMS duró 72 horas, se podía observar -- que las larvas mostraban diferencias en el tamaño, lo que probablemente indique diferencias en las edades fisiológicas que darían por resultado esta respuesta poco clara.

Esto se ve reforzado al analizar las clases de manchas, al revisar los datos podemos ver manchas excesivamente grandes que corresponden inclusive a las producidas en larvas de primer estadio, sugiriendo que la población tratada con MMS fue una mezcla de larvas de primer, segundo y tercer estadio.

En el laboratorio se trataron de mantener las condiciones óptimas para que el desarrollo larvario fuera homogéneo, se controló el tiempo de colecta de huevos, la temperatura, los fotoperiodos, la alimentación y el tamaño de las poblaciones, sin embargo, es probable que la humedad relativa de los cultivos haya sido demasiado baja y esto provocara un desfasamiento en el crecimiento de las larvas así como una disminución en el número de adultos obtenidos.

Al comparar las manchas pequeñas, en relación con las diferentes dosis de radiación, en general, se pudo observar un claro efecto de la radiación sobre la frecuencia de manchas, aunque esta respuesta no parece responder a la dosis aplicada.

Esto puede ser explicado también en base a las diferencias de edades entre las larvas tratadas, puesto que si algunas larvas recibieron el tratamiento de irradiación en un estadio más temprano, se representaron manchas grandes, que se sumaron a las inducidas por el MMS y esto hace que las frecuencias para manchas grandes en algunos casos se vea incrementada con el tratamiento de irradiación (histograma para manchas grandes), al mismo tiempo, el número de manchas chicas disminuye, al no producirse ningún daño en estadios larvarios tardios.

Con respecto a manchas gemelas se pudo observar que el MMS indujó muy poca recombinación entre el centrómero y el locus flr, ya que el número de manchas fué baja, - esto puede ser debido a que las larvas eran de estadios tempranos y las células de los discos imagales - recibieron el tratamiento en sus primeras divisiones, estas no prosiguieron dividiéndose dando manchas grandes.

Este efecto se ve claramente en el histograma para manchas gemelas, con el grupo de sacarosa donde el número de manchas es baja.

Para manchas totales en la tabla I en donde correlacionamos el efecto del MMS, todos los grupos presentaron un efecto significativo con respecto al testigo de sacarosa. Esto nos sugiere que el químico probado -- provocó mutación y recombinación en las células de los discos imagales de Drosophila melanogaster.

Respecto a la radiación (tabla II), para manchas totales sólo algunos grupos presentaron un efecto realmente significativo, esto puede ser debido a que como se expuso a larvas de estadios tempranos al químico y a la radiación, estos incrementaron las manchas, dando como resultado un efecto mezclado.

Rasmuson 1984 con la prueba del color de ojos de Drosophila melanogaster tratadas con MMS, encontró que el número total de mutaciones inducidas decrece con la edad de la larva.

Estudios del desarrollo de los discos imagales del ala con rayos X muestran una relación entre el tamaño y la frecuencia de los clones con el tiempo de inducción durante el desarrollo. Con una inducción temprana,

los clones son relativamente grandes porque las células pasan por varios ciclos de división entre el período de inducción y la metamorfosis. (Würgler, F.E. Vogel, -- E.W., 1986).

La muerte celular parece un rasgo normal del desarrollo de los discos imagales. Con ciertos mutágenos la muerte celular ocurre en los discos del ala desde el principio del estadio larval, si se sigue un tratamiento mutagénico, solo parte de las células de los discos son destruidas, los discos pueden sobrevivir y restaurar el número celular normal, pero si el daño no es restituido la muerte larval sobreviene. (Würgler F.E. Vogel, - E.W., 1986).

Cuando se dieron los tratamientos se produjo muerte larval ya que hubo reducción de más del 50% en las poblaciones que se expusieron al Metil Metanosulfonato y rayos gamma, en algunos tratamientos.

En estudios con E. coli, Breña, et al., 1989 observó que a mayor dosis de radiación ionizante, hay mayor inducción del sistema SOS.

Con agentes alkilantes, como el MMS las bases dañadas por alquilación deberían ser continuas, (Shooter,-- 1972. Shooter et al 1974) es posible por lo tanto, - que las alquilaciones de N-1 de adenina y N-3 de citosina podrían contribuir a la inactivación del templete de ADN.

La evidencia disponible sugiere que la metilación de la pirimidina en ADN en vivo estimula la misma res- - puesta de reparación que las estimuladas por otras bases metiladas o fosfodiésteres (Lawley, P.D., 1974).

En células de ovario de hamster el MMS provoca rompimientos de 1000 o más nucleótidos la duplicación del ADN, estos rompimientos son debidos al MMS, que están- probablemente asociados a la alquilación (Rosemary, et - al, 1981).

Con la prueba realizada con D. melanogaste, en el presente trabajo, se produjo daño en el ADN ya que se encontraron diferentes tipos de manchas, debido a dife-- rentes eventos como pueden ser la pérdida de segmentos de la cadena de ADN, mutaciones, recombinaciones, etc.).

La interrupción de la síntesis de ADN por el bloqueo de la ADN polimerasa a la altura de una lesión es un suceso dramático para la supervivencia de la célula. En bacterias, el bloqueo de la horquilla de replicación da lugar a una señal de alarma que induce a la reparación SOS, y la cual tiene como consecuencia corregir el daño sin importar que el remplazamiento de las bases sea fiel, permitiendo a la célula proseguir con el ciclo celular, pero heredándole a las células hijas una mutación. (Sarasin, A., 1981).

La radiación ionizante produce varios tipos de daños al ADN como son dobles rompimientos y daños en los nucleótidos asociados con los rompimientos, etc. (Mukhopadhyay, R., 1981).

Malling H.V. y De Serres F.J., (1973) en estudios con conidias de Neurospora crassa y MMS observaron que, la frecuencia de mutación se incrementó en proporción a la concentración y tiempo de tratamiento, las frecuencias reportadas en este trabajo se incrementaron conforme se aumentó la concentración de MMS.

Clemens, J. et al., (1987) utilizando la prueba -- del ala en Drosophila melanogaster suministraron MMS, y MTX e indujeron manchas chicas y gemelas en hembras de dos cruzas, indicando actividad mutagénica y recombinogénica de los químicos probados, así mismo en el presente trabajo en el cual se utilizó MMS se observó -- también una actividad mutagénica importante que es evidente al analizar la frecuencia de manchas grandes, -- sin embargo no podemos decir lo mismo de la actividad recombinogénica.

IX.- CONCLUSIONES.

Al administrar las diferentes concentraciones de Metil Metanosulfonato las diferencias en las frecuencias de manchas grandes fueron significativas.

El pretratamiento con MMS a las células irradiadas con diferentes dosis de radiación no modificó la frecuencia de mutación y recombinación somática.

Con respecto al mecanismo de reparación SOS no se pudo evidenciar, posiblemente debido a los problemas técnicos como fueron la sincronía en la edad de las larvas y la humedad relativa de los cultivos. Por lo que en estudios posteriores se pretende poner especial interés en controlarlos.

LITERATURA CITADA.

- BAKER, T. I., (1983) " Inducible Nucleotide excisión in Neurospora " Mol. Gen. Genet. 190: 285 - 299.
- BREÑA, M., ALCANTARA, D., Y ROJAS V., (1989) " Inducción por Radiación Gamma del Sistema SOS en -- E. Coli " Informe Técnico Científico Radiobiol. ININ. México. 1-7.
- CLEMENTS, J. HOWE, D., PHILLIPS, M., Y TODD, N. K., (1989) " The Drosophila wing Test: A comparison of the sensitivity of diferent strains." Mut. Res. 203: 117-123.
- DEMEREK, M. Y KAUFMANN, B., (1962) " Introducción a la Genética y Citología de Drosophila melanogaster" Ed. Comisión Nacional de Energía Nuclear. México D.F. pp 4-56.
- DUBININ, N. P., (1981) " Genética General " Ed. Mir - Moscú, U.R.R.S. pp. 9- 480.

- EDER, E., DEININGER, CH., Y KUTT, W., (1988) " Genotoxicity of Monofunctional Methanesulphonate in the SOS Cromotest as a Function of Alkylation Mechanism. " Mut. Res. 211: 51 - 64.
- EDER, E., DEININGER, CH., Y WIEDENMANN, M., (1989 a). - " Methyl Metanesulphonate (MMS) is Clearly Mutagenic in S. typhimurium strain TA 1535 a - comparison with strain TA 100" Mut. Res. 226: 145 - 149.
- EDER, E., FAVRE, V., DEININGER, CH., HAHN. H., Y KUTT, W., (1989 b). " Induction of SOS repair by - Monofunctional Metanesulphonate in various Esche richia coli strains. Structure activity relationships in comparison with mutagenicity in Salmonella typhimurium " Mutagénesis. Vol. 4 -- No. 3: 179-186.
- GARCIA BELLIDO, A., Y DAPENA, J., (1974) " Induction - Deletion and Characterizati6n of cell Differen--tiation Mutants in Drosophila " Mol. Gen. Ge--net. 128: 117 - 130.

- GOODENOUGH, U., (1981) " Genética " Ed. Omega. Barcelona, España. 459 p.
- GRAF, U., JOUN, H., KATZ, A., J., FREI, H. J. Y WURGLER, F.E., (1983) " A pilot Study on a New Drosophila Spot test. " Mut Res. 120: 233-239.
- GRAF, U., WURGLER, F. E., KATZ, A.J., FREI, H., JUON, = H., HALL, C. B., Y KALE, P. G., (1984). " Somatic Mutation and Recombiantion Test in Drosophila melanogaster. " Eviromental Mutagenesis. 6: 153 - 188.
- GUZMAN J. CORTINAS, C., DE LA ROSA. M., OLVERA, O., y CRUCES, M., (1988) " Efecto de la Radiación ionizante sobre la Reparación de ADN de Drosophila melanogaster " Informe Técnico Científico. Radiobiol. ININ 88-04: 1 - 20.

- GUZMAN J., ARCEO, C., CORTINAS C., DE LA ROSA, M., OL-
VERA. O., CRUCES, M., y PIMENTEL, E., (1990)-
" Mecanismos de Reparación Inducible del ADN en
Sistemas Biológicos l. M.M.S. " Informe Técnico -
Científico Radiobiol. ININ 90-03: 1-17.
- LAWLEY, P. D., (1974) " Some Chemical Aspects of --
DOSE-RESPONSE Relationships in alkylation Muta-
genesis. " Mut. Res. 23: 283 - 295.
- LEHNIGER, A. L., (1982) " Bioquímica " Ed. Omega. --
Barcelona, España, 3a. Ed. 1095 p.
- MALLING, H. V., y DE SERRES, F. J., (1973). " Genetic
Analysis of purple Adenine (ad- 3) Mutants in
duce by Methyl Metanesulphoante in Neurospora -
crassa " Mut. Res. 18: 1 - 14.

LEAPER, S., RESNICK, M. A., HOLIDAY, R., (1980) " Repair of Double Strand Breaks and Letal Damage in DNA of Ustilago Maydis. " Genet. Res. 35: 291 - 307.

MUKHOPADHYAY, R., y MOOKERJEE, A., (1981) " Effect of-- Gamma irradiation on Dye- DNH Binding ". Int.- J. Radiat. Biol., 39 (2): 143 - 155.

RADMAN, M., (1980) " Is there SOS Induction in Mamma-- lian Cell. " Photochem Photobiol. 32: 823.

ROSEMARY - WONG, S. L. R., y DEWEY, E. W., (1981) "Studies on the Amount of Single-Stranded DNA Present in Chinese Hamster Ovary Cell During the Repair of Damage Induced by X Rays or Methyl Metanesulphonate. " Mut. Res. 87: 689 - 709.

RASMUSON, A., (1985). " Comparative Studies of the Induction of Somatic eye- color Mutation in an - Unstable Strain of Drosophila Melanogaster by- MMS and X rays at Diferent Developmental Sta-- ges. " Mut. Res. 148: 65 - 70.

SARASIN, A., (1981) " El Cáncer y la Reparación del ADN" Mundo Científico., 1 (7): 724 - 737.

SMITH-KEARY, P. F., (1974). Genética Estructura y Función". Ed. Publicaciones Culturales. S. A. México, D.F. - 360. p.

SHOOTER, K. V., (1972). " Some aspects of the Interaction of Carcinogenic and Mutagenic Agents with Nu-- cleic Acid Purines; In: The Purines, Theory and Experiment. " Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry and Biochemistry, Academic Press, New - York. pp. 509 - 518.

- SHOOTER, K.V., HOWSE, R., SHAH, S.A. y LAWLEY, P. D., (1974).
" Molecular Basis for Biological inactivation -
of Nucleic Acid: Action of Methylating Agents-
on the RNA-containing Bacteriophage R₁₇. " Bio-
chem. J. 137: 303 - 313.
- STADLER, D. y MOYER, R., (1981). " Induced Repair Ge-
netic Damage in Neurospora. " Genetics. 98: 763
- 774.
- WURGLER, F. E. y VOGEL, E. W., (1986) " In vivo Mutage-
nicity Testing Using Somatic Cell of Drosophi-
la melanogaster. " Chemical Mutación. 10: 1-72.

XI.- G L O S A R I O .

Acido Ribonucleico (ARN) Polinucleótido en el que el residuo de azúcar es ribosa a diferencia del ADN que contiene desoxirribosa, además contiene uracilo en lugar de la timina hallada en el ADN.

Alelo: Forma alternativa del mismo gene.

Blastodermo: Etapa embrionaria multinuclear que resulta de divisiones nucleares sin aumento del citoplasma de la célula zigótica, aumentando en número, pero con células más pequeñas. La etapa de blástula precede a la gastrulación.

Centrómero: Región cromosómica que se asocia con las fibras del huso durante la mitosis y la meiosis.

Cromátida: Cada una de las bandas idénticas que se producen cuando se duplica el cromosoma; una vez que se separan los centrómeros cada cromátida llega a ser un cromosoma.

Cromosoma: Estructura filiforme, hallada en el núcleo de las células, que contienen los genes en una secuencia lineal; molécula completa de ADN en complejo con histonas y otras proteínas en las células eucarióticas.

Cromosomas Politécnicos: Cromosoma interfásico que ha sufrido varias veces la replicación del ADN sin ir acompañado de división nuclear, y en el --que los filamentos cromosómicos resultantes estan apareados longitudinalmente y forman un cromosoma gigante con aspecto de sogá, cuya cromátida muestra un modelo específico de bandas.

Endonucleasa: Enzima que produce rupturas en el es--queleto azúcar-fosfato de una molécula de ácido nucleico.

Eucarionte: Organismo (Uni o pluricelular) cuyas células poseen membrana nuclear y ciertos orga-nelos como las mitocondrias.

Exonucleasa: Enzima que digiere una molécula de ácido nucleico a partir de un extremo.

Fenotipo: Apariencia o propiedades observables de un organismo.

flr: Representación del marcador recesivo que afecta los tricomas en las alas de D. melanogaster en forma de flama o roseta, se encuentra lo calizado en el brazo izquierdo del cromosoma-3 en posición 3-39.0, y en condición homóciga. (flr/flr) es letal.

Gene: Unidad de función genética; puede especificar un polipéptido, una molécula de ARN o puede jugar un papel en la regulación de la actividad génica.

Heterocigoto: Célula u organismo que tiene dos alelos diferentes en un locus dado en cromosomas homólogos.

Homocigo: Célula u organismo que tiene el mismo alelo en un locus dado de los cromosomas homólogos.

Locus: Lugar en un mapa genético en el que reside una mutación o un gen particular; a menudo se usa en un lugar de mutación o gen.

Marcador: Alelo cuya herencia está en observación en un cruzamiento.

Mutágeno o mutagénico: Agente que induce mutación.

Mutación: Cambio en la estructura o en el número de los cromosomas; también llamado aberración cromosómica o anomalía cromosómica.

mwh: Representación del marcador, multiples pelos en el ala, por sus siglas en inglés marcador recesivo homócigo viable el cual se encuentra localizado en el brazo izquierdo del cromosoma 3 -

(3-0.0) y determina que los tricomas en la ala se presenten con tres o más cerdas.

Procarionte: Organismo que carece de membrana nuclear y de ciertos organelos.

Recombianción: La forma de una nueva asociación de la molécula de ADN (cromosomas) o partes de la molécula de ADN (cromosomas).

Serratia: (Ser.) alas con típicas muescas, en los bordes, homocigamente es letal se encuentra localizado en posición 3-92.5

TM3: Se encuentra insertado con Ser o Sb. Es balanceador efectivo en el cromosoma 3, como normal en X y 2, con la presencia de FM6 y SM 5. Dobles sobrecruzamientos que separan a Sb o Ser para inversiones múltiples, igual en presencia de FM6 y SM5.

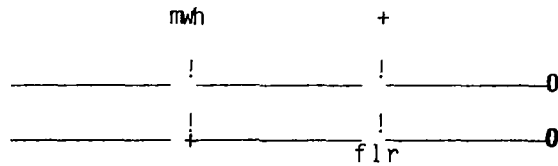
mwh + / + flr.

mwh.- marcador recesivo.

flr.- marcador recesivo.

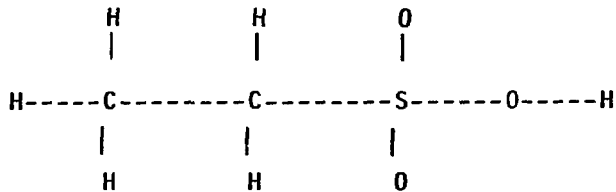
+ .- alelo silvestre.

/ .- separa los cromosomas.



El alelo silvestre se va expresar por ser dominante, por lo tanto las alas van a presentar los tricomas normales.

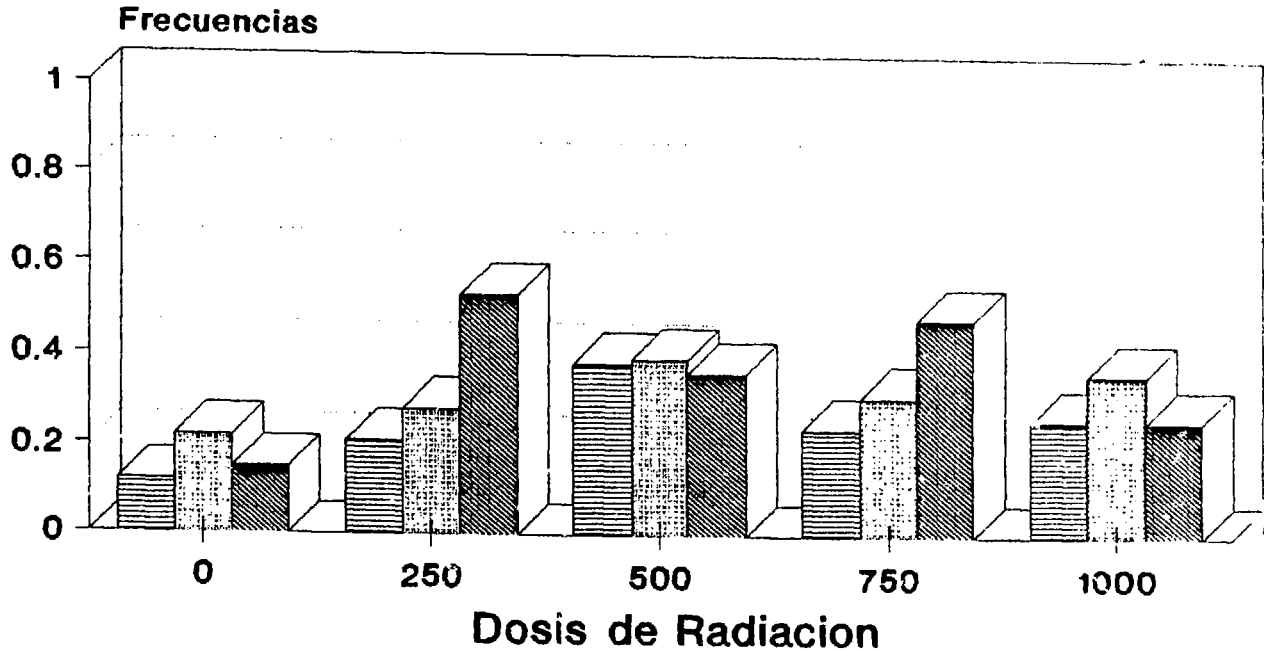
FORMULA DEL METIL METANOSULFONATO.



MANCHAS CHICAS

Frecuencias Inducidas

■ Sacarosa. ■ 0.0007% ■ 0.0014%

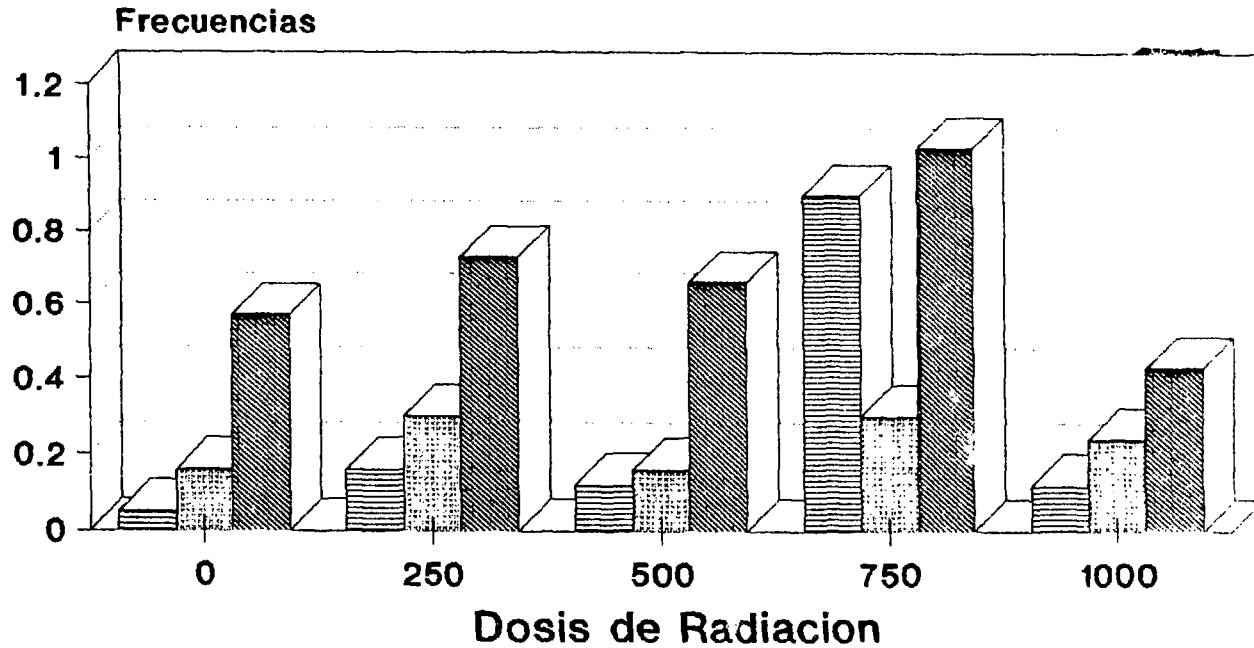


Frecuencias Inducidas por MMS. y Radiación Gamma.

MANCHAS GRANDES

Frecuencias Inducidas

■ Sacarosa. ■ 0.0007% ■ 0.0014%

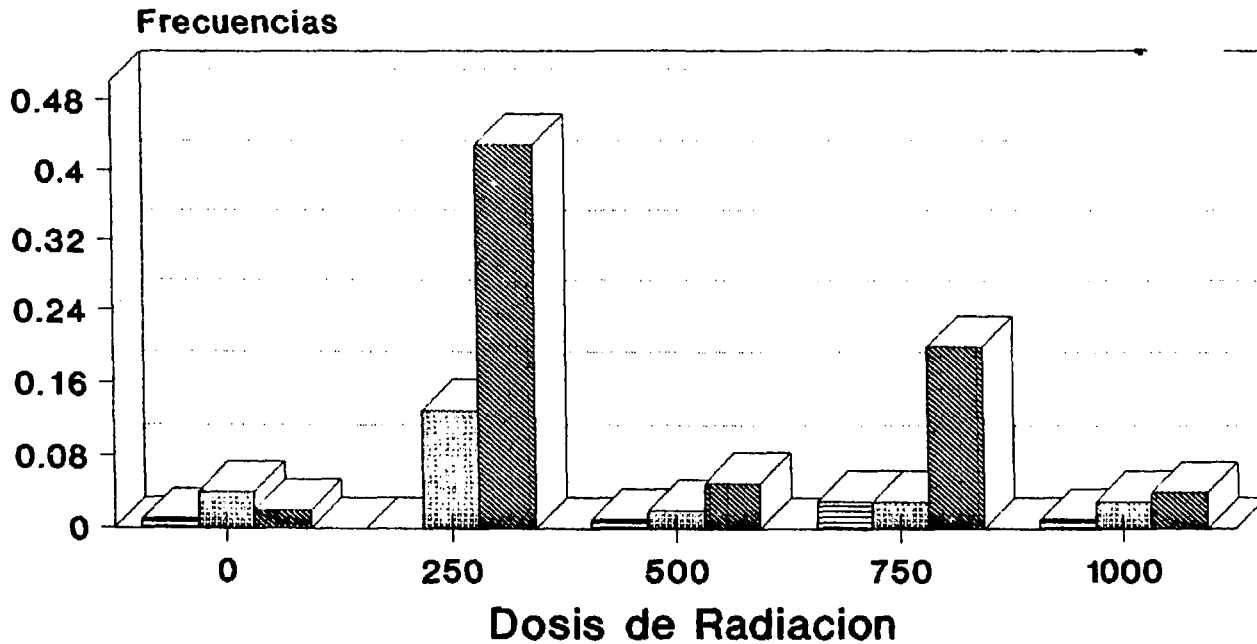


Frecuencias Inducidas por MMS. y Radiación Gamma.

MANCHAS GEMELAS

Frecuencias Inducidas

▨ Sacarosa. ▨ 0.0007% ▨ 0.0014%

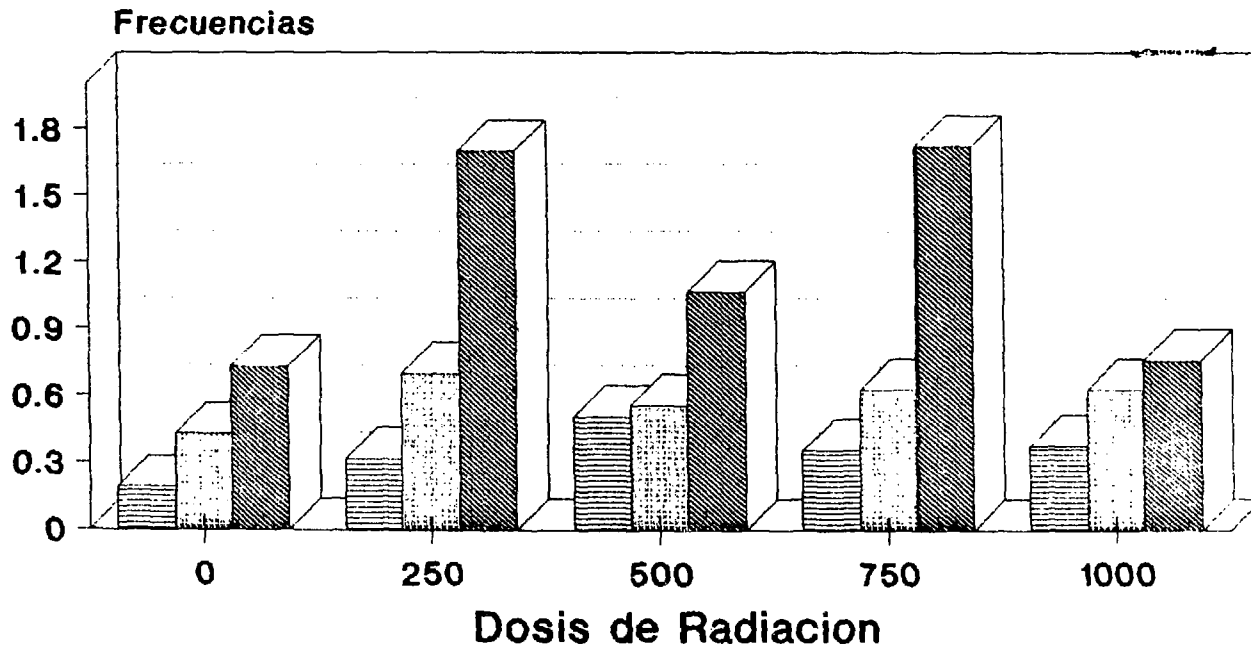


Frecuencias Inducidas por MMS. y Radiación Gamma.

MANCHAS TOTALES

Frecuencias Inducidas

■ Sacarosa. ■ 0.0007% ■ 0.0014%



Frecuencias Inducidas por MMS. y Radiación Gamma.