

00346¹²

24/



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

INTERACCION ENTRE LA TEMPERATURA Y LA GENOTOXICIDAD DE ALGUNOS XENOBIOTICOS EN CELULAS SOMATICAS DE LAS ALAS DE *Drosophila melanogaster*.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR) PRESENTA: BIOL. YOLANDA PAEZ SERNA

MEXICO, D. F.
TESIS CON FALLA DE ORIGEN

258430

1996



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACION
DISCONTINUA

PAGINACIÓN
DISCONTINUA



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Interacción entre la temperatura y la genotoxicidad
de algunos xenobióticos en células somáticas de
las alas de *Drosophila melanogaster*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

(BIOLOGÍA CELULAR)

P R E S E N T A :

BIOL. YOLANDA PÁEZ SERNA .

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA RAMOS MORALES.

MEXICO, D.F.

1998

Este trabajo fue realizado en su totalidad en el
Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la
Universidad Nacional Autónoma de México.



Con el apoyo otorgado por:
La Dirección General de Asuntos del Personal Académico
(DGAPA)

DEDICATORIAS

A mis padres :

Faustino C. Páez A y Ma. Abilania Serna N., con especial cariño les dedico este trabajo ya que han sido en mi vida el apoyo incondicional, siempre cuidandome con amor y ternura. Por ser fuente inagotable de fortaleza y esperanza. Por que siempre han dado todo sin pedir nada a cambio. Por ser fuente inspiradora en mi existencia.

A mis hermanos :

Noé y Xochitl., por todos los momentos especiales que han constituido mi vida , ya que siempre han tenido el amor y la comprensión requerida, y por ser el apoyo incondicional.

A mi esposo :

Héctor, te dedicó este trabajo ya que ha constituido una parte muy especial de nuestras vidas, ya que ha sido uno de nuestros logros. Por que representas en mi vida todo lo que una mujer espera de un hombre. Ya que ha tu lado he aprendido ha comprender la magnitud del amor.

Recuerda siempre que los tiempos son relativos y que las conquistas son permanentes. Y cada meta alcanzada resulta una conquista.

A mis suegros :

Por su apoyo y comprensión, por formar parte de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Dra. Patricia Ramos Morales mi más sincero agradecimiento y admiración., ya que representas mi guía académica. Gracias por compartir tus conocimientos y tus esperanzas con migo., por tener siempre una sonrisa y metas compartidas.

A los sinodales :

Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte
Dra. Ma. Del Carmen Gómez Eichelmann
M en C. Víctor M. Valdés López
Dra. Regina D. Montero Montoya
Dra. Rocio Vargas Sanders
Dr. Rene de Jesús Cárdenas Vázquez

Por sus valiosos comentarios y por todas sus atenciones.

A mis amigos Luz María, Josmar, Gerardo, Juan Castillo, Alma, Edna , Lupita, MaJu e Irma por su presencia y ayuda en todos los momentos de mi vida.

A los compañeros del laboratorio : Juan C., Paty O., Blanca, Paty A., Moisés., Yadira, Hugo, Judith, Liliana y Omar por su amistad, enseñanza y colaboración en la realización de este trabajo. **Y muy especialmente a Julian, Héctor y Armando,** por su paciente e insustituible asesoramiento a lo largo de este trabajo.

INDICE

RESUMEN	i
INTRODUCCIÓN	1
Factores genotóxicos	1
Efectos genotóxicos del arsénico	7
Mecanismos moleculares de respuesta al estrés	13
<i>Drosophila melanogaster</i> como sistema de prueba ...	35
JUSTIFICACIÓN	43
OBJETIVOS	44
MATERIAL Y METODOS	44
Compuestos químicos	44
Cruza y marcadores	44
Sincronización	45
Tratamientos	47
Registro de las manchas	50
Análisis Estadístico	54
RESULTADOS	58
DISCUSIÓN	87
CONCLUSIONES	103
REFERENCIAS	104

INTERACCIÓN ENTRE LA TEMPERATURA Y LA GENOTOXICIDAD DE ALGUNOS XENOBIÓTICOS EN LA INDUCCIÓN DE DAÑO A CÉLULAS SOMÁTICAS EN *Drosophila melanogaster*.

RESUMEN

Aunque no hay fuertes evidencias a cerca de la producción de tumores en animales experimentales por arsénico, en estudios epidemiológicos se asocia a compuestos del arsénico con ciertos tipos de cáncer y procesos pre-cancerosos, sin embargo en diversos estudios experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*, estos compuestos muestran un potencial co-carcinogénico, pero no mutagénico. En *Drosophila melanogaster*, el arsenito y el arsenato de sodio inducen mutaciones letales recesivas ligadas al sexo y ninguno induce rompimiento de cromosomas sexuales en células germinales. En células somáticas de las alas, sólo el arsenito de sodio incrementa la frecuencia basal de mutación y ambos compuestos incrementaron la frecuencia de mutaciones en células de los ojos. En general el arsenito de sodio resulta un orden de magnitud más potente que el arsenato de sodio.

Además de la importancia inherente al tipo de compuestos involucrados, es también necesario considerar la participación de otros factores ambientales como la temperatura en la inducción de daño.

Ante incrementos repentinos de la temperatura, o la exposición a metales tóxicos, alcoholes y muchos venenos metabólicos; todas las células desde bacterias hasta neuronas, responden aumentando la producción de ciertas moléculas que participan en la regulación de la respuesta celular ante el estado de alerta. A estas proteínas se les ha denominado proteínas de estrés térmico (HSP). En condiciones normales muchas de ellas intervienen en procesos metabólicos esenciales, síntesis y ensamblaje de otras proteínas, algunas más regulan el crecimiento y la diferenciación celular.

Estudios sobre la expresión de las proteínas de estrés térmico durante el desarrollo en *Drosophila* muestran la expresión individual de estas proteínas y su acumulación en los tejidos en estados específicos del desarrollo. Sin embargo durante la respuesta al estrés la expresión de muchas de ellas se da de manera coordinada.

En 1940 se reportó que diversos factores ambientales como la temperatura, producen en *Drosophila* fenotipos anormales que recuerdan mutaciones conocidas (fenocopias). Estos cambios ocurren en períodos fenocríticos en los que la mosca es sensible a procesos no genéticos promotores de anomalías (efectos teratogénicos). Se ha asumido que las alteraciones inducidas no implican modificación en el ADN, y se explican, como en el caso de la temperatura, por interrupción en la expresión génica normal, la mitosis y la síntesis del ADN, alteración de los microfilamentos y de los componentes ribonucleoprotéicos del nucléolo, y la producción de ciertas moléculas que participan en el estado de alerta (respuesta al estrés), entre otros cambios. En *D.*

melanogaster, una temperatura de 29°C durante el desarrollo larvario induce la formación de manchas sobre las alas, un resultado similar se ha reportado al modificar por 1, 2, 3, ó 6 hr la temperatura del cultivo (de 29°C hasta 45°C).

En el presente trabajo se analizó la interacción entre la temperatura y la genotoxicidad de algunos xenobióticos en la inducción de daño a células somáticas en *Drosophila melanogaster*, mediante la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) en células de las alas.

Se trataron de manera agudo; larvas *flr*³/*mwh*, de 72 ± 4 hr de edad, las cuales se sometieron, mediante baño María, a diferentes combinaciones de temperatura, con intervalos de 1 hr entre cada cambio, en los que se mantenían a 25°C.

Larvas *flr*³/*mwh* de *Drosophila* se expusieron a 29°C con y sin arsenato y arsenito de sodio durante diferentes etapas del desarrollo postembrionario: 24-120 h (temprano), 120-240 h (tardío) y 24-240 h (total).

Se montaron laminillas con las alas de los organismos adultos transheterocigóticos y portadores del balanceador para el protocolo número dos, las cuales se revisaron a 40 X. Para cada exposición se registró el número, tamaño y tipo de manchas inducidas. Comparando las frecuencias obtenidas mediante X². El análisis estadístico se realizó con el programa de computo SMART a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Se comparó la distribución del número de manchas por mosca y número de células por mancha con la prueba de U de Mann-Whitney-Wilcoxon.

El efecto localizado en manchas grandes indica que parte del daño inducido es multiplicado por mitosis sucesivas posteriores a la inducción de daño, es decir se altera la información genética de las células (por modificación del ADN ó por los mecanismos de regulación que permiten la transferencia de información de una célula a otra). Se requieren más estudios para determinar la forma de potenciación que ocurre entre la temperatura y el arsénico.

En este estudio se encontró que la temperatura per se induce mutación y recombinación somática en células de las alas de *Drosophila melanogaster*, y estas alteraciones son de naturaleza heredable.

En exposiciones crónicas a 25°C el arsenato de sodio es más genotóxico que el arsenito de sodio. Mientras que en células termotolerantes el efecto genotóxico del arsenato y del arsenito de sodio se reduce.

El presente trabajo muestra que la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en células de alas de *Drosophila melanogaster* es una metodología sensible, versátil, económica y confiable para estudiar las interacciones entre varios compuestos.

INTRODUCCIÓN

Factores genotóxicos

La toxicología estudia los efectos de sustancias nocivas (compuestos tóxicos) para los sistemas biológicos, además de intentar establecer la magnitud del daño inducido en función de la exposición a dichas sustancias.

Se puede definir como tóxico ambiental a toda aquella sustancia potencialmente nociva que se encuentra diseminada en los diversos ecosistemas . Mientras que los **xenobióticos** son sustancias extrañas que no son utilizables en los ciclos generadores de energía ni en las reacciones de síntesis del organismo (Vega, 1985).

La exposición de los seres vivos a agentes químicos ambientales potencialmente peligrosos es frecuente. Se calcula que más de 100,000 productos químicos han sido elaborados para uso comercial e industrial, por ejemplo: aditivos de alimentos, cosméticos, medicamentos, plaguicidas y otros más (De Serres, 1979) (Cuadro I).

De acuerdo con Timbrell (1989), alrededor de 65,000 compuestos químicos se producen cada año en los Estados Unidos, y a éstos se suman anualmente entre 500 y 1000 sustancias nuevas. La presencia de estos compuestos en el ambiente es importante en la medida en que se desconoce el riesgo genético que representan para los seres vivos.

El impacto de los contaminantes en la función genética de los organismos será diferente dependiendo del tipo de células

Cuadro I . Clasificación de mutágenos ambientales (Modificado de Moutschen, 1965).

Sustancias mutagénicas sintetizadas por el hombre y usadas directamente en condiciones específicas.				
A. Farmacéuticos	B. Plaguicidas	C. Aditivos		
a. agentes antitumorales	a. insecticidas	a. alimentos		
b. antibióticos	b. raticidas	b. otros		
c. narcóticos	c. herbicidas	(cosméticos)		
d. anticonceptivos	d. fungicidas			
e. excipientes	e. nematocidas			
f. anestésicos				
Sustancias mutagénicas en la industria o que se encuentran en el ambiente como productos industriales.				
A. Agentes alquilantes	B. Solventes orgánicos compuestos organo-metálicos	C. Contaminantes del agua	D. Contaminantes del aire	E. Metales pesados
Sustancias mutagénicas naturales.				
A. Alcaloides	B. Productos del metabolismo microbiano			

afectadas. Cuando el efecto se localiza en células germinales, el daño se manifestará en las siguientes generaciones de organismos (Loprieno, 1980); mientras que la inducción de mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas en células somáticas se ha asociado con el desarrollo de procesos cancerosos (Loprieno, 1980; De Flora y Ramel, 1988).

El aumento en la frecuencia de enfermedades y malformaciones congénitas ha impulsado el estudio de posibles factores ambientales asociados a la etiología de dichas alteraciones. El continuo incremento en las tasas de morbilidad y mortalidad por cáncer ha intensificado la búsqueda de alternativas terapéuticas enfocadas a identificar sustancias con propiedades específicas que puedan combatirlo, retrasar su desarrollo o prevenir su aparición. Así, se trabaja con gran variedad de sustancias, entre las que se incluyen de manera predominante productos naturales derivados de plantas y animales y otros compuestos que se han sintetizado con esta finalidad (Muñoz, 1994).

La investigación de la actividad genotóxica de los compuestos que representan un riesgo mutagénico y/o carcinogénico para los seres humanos se ha multiplicado en los últimos años (Ames et al., 1973; Clayson, 1980; Graf et al., 1984), resaltando dos aspectos que han resultado reiterativos en diferentes estudios experimentales: existe una clara asociación entre la actividad recombinogénica y la carcinogénesis y, el inicio de un proceso canceroso frecuentemente está relacionado con cambios en la información genética de las células, es decir, tiene una base

mutacional (Ames et al., 1973; Vogel et al., 1980; Cairns, 1981).

Para detectar y cuantificar cantidades mínimas de compuestos ambientales potencialmente tóxicos se han desarrollado métodos analíticos de alta sensibilidad. La información así obtenida ha contribuido a determinar el significado toxicológico de la exposición a bajas concentraciones de contaminantes (Vega, 1985).

Los compuestos ambientales de mayor interés en la toxicología genética, una rama interdisciplinaria en la que confluyen áreas del conocimiento como toxicología, genética, química y medicina entre otras, son aquellos con capacidad mutagénica, carcinogénica y teratogénica; además de otros cuya acción tóxica se manifiesta como infertilidad, aborto espontáneo y/o muerte fetal. A este último tipo de manifestaciones en forma genérica se le denomina daño reproductivo.

Así, un compuesto es considerado genotóxico si se ajusta a la definición propuesta por el comité de trabajo de la ICPEMC (International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens): "...un agente que produce una respuesta positiva en cualquier bioensayo que mida cualquier evento genético terminal...". Por lo anterior, para que un compuesto químico sea considerado no genotóxico se requiere su inactividad en las pruebas que miden los siguientes tipos de efectos: modificación de la secuencia de bases del ADN, rearrreglos del ADN, alteraciones de la segregación de cromosomas y daño a la integridad cromosómica, entre otros (Brusick, 1987).

Uno de los objetivos principales de la toxicología genética

consiste en detectar y comprender las propiedades de un pequeño grupo de compuestos químicos altamente específicos para los ácidos nucleicos, y en particular para el ADN, que pueden producir cambios en el material genético (Vogel, 1992). Para lograr lo anterior los esfuerzos en esta área se han centrado en:

1) Implementar pruebas y métodos para evaluar el riesgo y definir el impacto de los agentes genotóxicos ambientales cuya presencia puede alterar la integridad del acervo genético humano (efectos en células germinales); 2) elucidar las relaciones entre genotoxicidad y la iniciación de neoplasias (Vogel, 1992).

Muchos carcinógenos químicos muestran su actividad iniciadora a través de interacciones con el ADN nuclear que se pueden manifestar como daño genético permanente del tipo de mutaciones y aberraciones cromosómicas. El rango de compuestos químicos potencialmente peligrosos va desde metales y compuestos inorgánicos hasta moléculas orgánicas muy complejas (Timbrell, 1989).

La iniciación de daño genético en células somáticas (carcinogénesis), o en células germinales (mutagénesis) está determinada por diferentes factores:

- A. La ruta de administración, forma de aplicación, tasa de absorción, adsorción, distribución y eliminación de los compuestos.
- B. La capacidad de biotransformación del organismo afectado (activación metabólica y desactivación).
- C. La tasa de reacción con el ADN y otras biomoléculas.
- D. El tipo y distribución de aductos en el ADN.

- E. La participación de daño secundario al ADN (ligamentos cruzados, sitios apurínicos y otros).
- F. Reparación del daño al ADN (sujeta o libre de error, o la ausencia de reparación).
- G. Tasa de división celular.
- H. Expresión del daño genético.
- I. Tiempo transcurrido entre el tratamiento o la exposición y el efecto genético.

A su vez, estos eventos son modulados por una variedad de parámetros químicos asociados a los compuestos: solubilidad en lípidos, factores estéricos, interacción con enzimas, reactividad absoluta y relativa, actividad óptica, mono y multifuncionalidad (Zijlstra, 1987; Waters et al., 1990).

Los compuestos tóxicos pueden dividirse en: **directos** (compuestos genotóxicos terminales), ya que reaccionan con el ADN o las proteínas sin requerir biotransformación; e **indirectos**, que requieren de activación metabólica (compuestos precursores o promutágenos), los cuales pueden no tener propiedades genotóxicas *per se*, pero se convierten en especies genotóxicas al ser biotransformados (Vogel, 1991).

Otro tipo de compuestos potencialmente peligrosos son los **comutágenos** y/o **cocarcinógenos**, los cuales si bien no tienen un potencial genotóxico definido, actúan facilitando la acción de otros compuestos genotóxicos para la inducción final de daño heredable. Este tipo de sustancias han sido menos estudiadas desde un enfoque genético ambiental, sin embargo, es evidente que la

obtención de información acerca de estas interacciones conducirá a definir mejor los riesgos de exposición a genotóxicos. Entre los compuestos que han sido considerados comutagénicos están el arsénico (As), el cadmio, el níquel y el litio, entre otros.

Efectos genotóxicos del arsénico (As)

El arsénico (As), ha sido descrito como un metaloide; pero con la finalidad de comprender su comportamiento en los suelos, es conveniente considerarlo un elemento no metálico que forma compuestos covalentes, o que se encuentra en especies aniónicas. Pertenece al grupo V de la tabla periódica y es similar químicamente al fósforo (P) ya que en el estado de oxidación +5 forma oxianiones (arsenato y fosfato) en el suelo. El As se encuentra también en los suelos en estado de oxidación +3, con otros ligandos además del oxígeno; y forma especies estables que no se encuentran con el fósforo (P) (Alloway, 1990).

En el estado sólido, existe en cuatro formas alotrópicas: amarillo [As (I)], amorfo [As (II)], ortorrómbico [As (III)] y romboédrico [As (IV)]; la energía libre contenida es menor en la forma romboédrica y las otras, son metaestables. La forma amarilla es la menos estable, y existe sólo a bajas temperaturas y en la oscuridad (Rodionov et al., 1979).

Aunque el arsénico no es un metal, tiene muchas de las propiedades de un metal pesado, y su efecto tóxico es similar al del mercurio y el plomo. Las formas de As(III) o arsenitos, son de las más tóxicas (Manahan, 1984). Difiere del resto de los metales

pesados comunes, en que la mayoría de sus compuestos orgánicos son menos tóxicos que los inorgánicos (Alloway,1990 y Koren,1991).

Las fuentes naturales de As en el suelo son principalmente oxisales y minerales. Por su capacidad para unirse a ligandos de azufre es frecuente que se le encuentre asociado con depósitos minerales que tienen sulfuros, siempre y cuando el potencial redox sea suficientemente bajo; o bien se le encuentra como constituyente menor de otros minerales azufrados. Las condiciones de oxidación normales en la superficie terrestre, en las que tiene lugar el desgaste, llevan a la formación de oxianiones basados en el estado de oxidación +5. El pH, Eh, la presencia de minerales arcillosos, materia orgánica, óxidos de fierro y aluminio, pueden influir en la solubilidad y la tasa de oxidación del arsénico (Alloway,1990).

De los más de 200 minerales que lo contienen, el 60 % son arsenatos, el 20 % sulfuros y sales de azufre, y el 20 % restante incluye arsenitos, óxidos y As elemental. El arsénico se encuentra en la corteza terrestre en una concentración promedio de 2-5 ppm (Stokinger, 1981 y Alloway,1990).

La combustión de materiales fósiles particularmente carbón, introduce grandes cantidades de arsénico en el ambiente, y una gran parte alcanza los mantos acuíferos (Manahan, 1991). La acción volcánica es la siguiente fuente natural de As en importancia; después de la volatilización a bajas temperaturas, y en un ámbito local, puede ser la fuente atmosférica dominante (Fishbein,1981 y Alloway,1990).

En relación con las fuentes antropogénicas, actualmente la

mayoría del As se genera como subproducto de la extracción de Cu, Pb, Au y Ag, a partir de sus precursores. Las emisiones antropogénicas varían considerablemente de un país a otro, debido a que las cifras dependen de la industrialización y el grado de control de la contaminación de éstos (Ramos, 1994).

El arsénico se relaciona dentro del ambiente a través de los procesos industriales y a través de la generación del carbón. Este es ampliamente usado en la agricultura y fue formal y extensivamente usado en la medicina. Por lo general la exposición de la población a arsénico ocurre principalmente a través de la ingestión de comestibles que contienen arsenicales orgánicos o inorgánicos.

El arsénico es usado como: desecante para facilitar la cosecha del algodón, desfoliador, descortezador de árboles y para obtener la pulpa de la madera y conservarla; también como conservador en la tenería y la taxidermia, y mordente en la peletería. En la rama pecuaria se emplea en la crianza de ganado, es un ingrediente en los promotores del crecimiento. El trióxido de arsénico (As_2O_3) es materia prima de productos farmacéuticos arsenílicos y de los cacodilatos; también es un aleador de metales, principalmente de materiales a base de plomo; se emplea en el endurecimiento en la fabricación de pilas, conductores y cables de electricidad (Stokinger, 1981) y para mejorar la resistencia del cobre a la corrosión (Koren, 1991).

Los principales productores de arsénico son México, Suecia, Francia y la antigua Unión Soviética (Stokinger, 1981). En la

actualidad, el uso de muchos arsenicales está prohibido: pesticidas, fertilizantes y pigmentos, entre otros (Ramos, 1994).

En la figura 1 se muestra el ingreso y redistribución atmosférica del arsénico en ecosistemas terrestres. Para el ciclo del arsénico en ecosistemas terrestres se consideran doce posibles transferencias de un área a otra, por herbicidas organoarsenicales. La transferencia incluye reducción a metilarsinas, erosión del suelo e incorporación por cultivos, como mecanismos de redistribución primaria (Ramos, 1994).

Los niveles de arsénico en la superficie y aguas subterráneas es, por lo general, baja (2-3 $\mu\text{g}/\text{l}$); aunque suele incrementarse significativamente si se asocia con actividad térmica (a más de 35 $\mu\text{g}/\text{l}$) (Alloway, 1990).

Los compuestos del arsénico alteran fuertemente la actividad de diversas enzimas. Los organoarsenicales y los compuestos inorgánicos (formas trivalentes) del As se consideran reactantes primarios de sulfhidrilos por lo que inhiben sistemas enzimáticos dependientes del grupo tiol en varios tipos de tejidos.

Aunque no hay fuertes evidencias de que el arsénico produce tumores en animales experimentales, en estudios epidemiológicos se asocia a los compuestos del arsénico con ciertos tipos de cáncer y procesos pre-cancerosos, y se reporta que en humanos la ocurrencia de éstos es incrementada significativamente cuando hay exposición crónica a compuestos de arsénico por vía respiratoria u oral. Sin embargo, en diversos estudios experimentales tanto *in vitro* como en sistemas *in vivo* (Leonard et al., 1980); estos

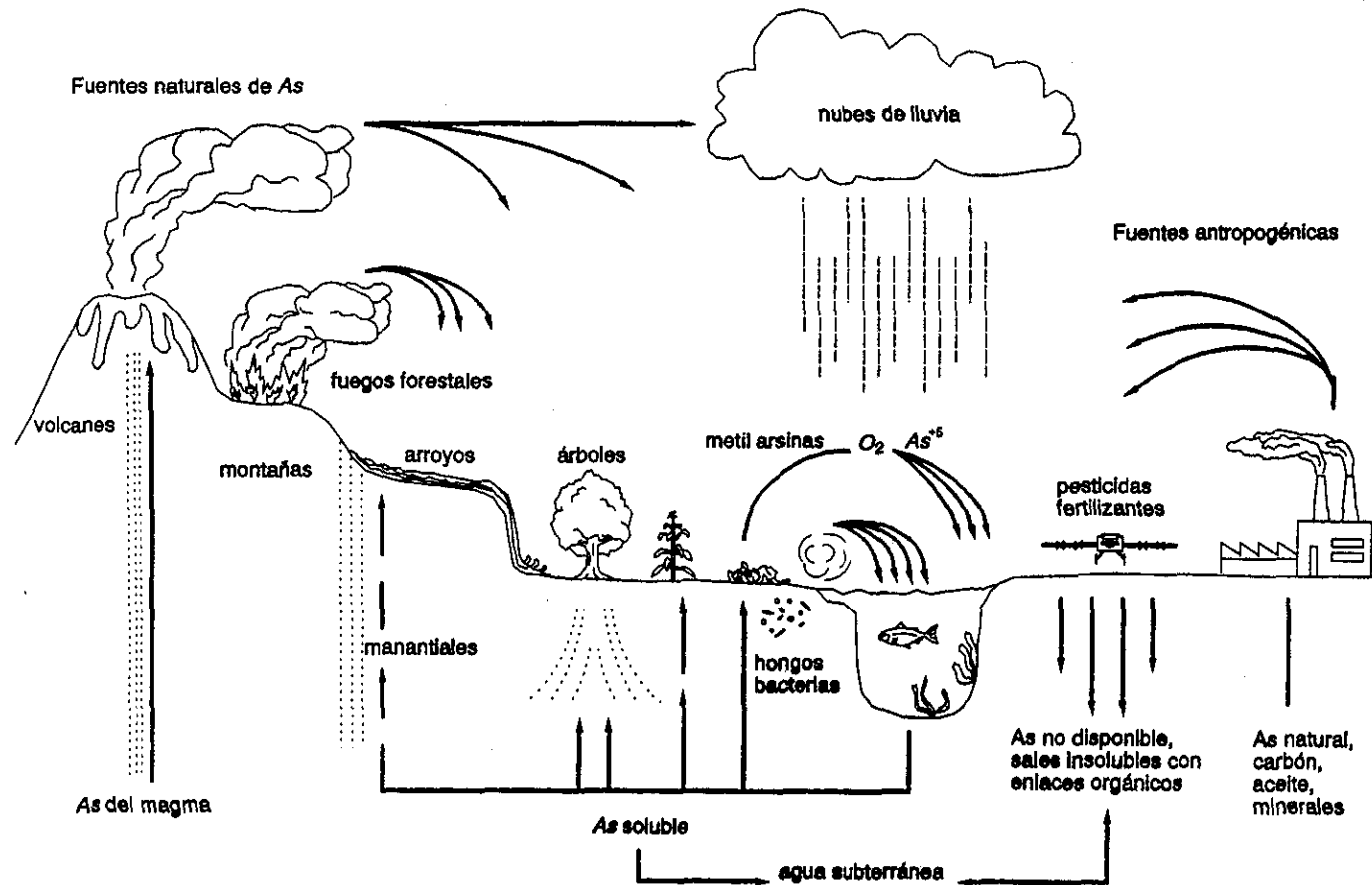


Fig. 2 Ciclo del arsénico, en la naturaleza. (Fishbein, 1981).

compuestos muestran un potencial co-carcinogénico, pero no mutagénico.

En *Drosophila melanogaster*, el arsenito y arsenato de sodio inducen mutaciones letales recesivas ligadas al sexo pero ninguno induce rompimiento de cromosomas sexuales en células germinales. En células somáticas de las alas, sólo el arsenito de sodio incrementa la frecuencia basal de mutación y ambos compuestos incrementan la frecuencia de mutaciones en células de los ojos. En general, el arsenito de sodio resulta un orden de magnitud más potente que el arsenato de sodio (Ramos-Morales y Rodríguez, 1995).

Algunos estudios apoyan la actividad mutagénica del arsénico proporcionando resultados positivos. Estos experimentos involucran microorganismos, plantas y *Drosophila*; no obstante, la capacidad de inducción de este metal, tanto *in vitro* como *in vivo* se cuestiona todavía. Leonard *et al.* (1980) proponen que el arsenito afecta la síntesis y reparación del ADN.

Además de la importancia inherente al tipo de compuestos involucrados, es también necesario considerar la participación de otros factores en el ambiente para la inducción de daño. Entre éstos se tiene a la temperatura que puede modificar la estabilidad y la persistencia de un compuesto químico (el tiempo en el cual el compuesto permanece en el ambiente sin sufrir cambio en su composición y/o estructura), otros factores son la composición del suelo (de acuerdo con el tipo de roca del cual deriva), la permeabilidad del terreno, el grado de humedad (que puede modificar la persistencia y concentración de un compuesto), y otras más.

El efecto del tratamiento producido por estrés térmico o químico con arsenito, sobre la metilación y/o acetilación del centro de las histonas se ha investigado ampliamente en *Drosophila melanogaster*. Desrosiers et al., 1985, proponen que en organismos expuestos a estrés térmico o químico con arsenito, la metilación de todas las formas de histona 3 (H3) se reduce, mientras que varias formas de H2B se incrementa, estas condiciones de estrés inducen una disminución generalizada en la acetilación de todas las formas del centro de las histonas. En el curso del estrés térmico, la síntesis de H2B se incrementa y los desechos de histonas no-acetilados son nuevamente sintetizados durante el estrés. Estos cambios en los patrones de metilación y acetilación del centro de las histonas se ha relacionado con la actividad de los genes de estrés térmico, estimulada por el estrés.

Mecanismos moleculares de respuesta al estrés

I. Definición de la respuesta a estrés y función de las proteínas.

Ante incrementos repentinos de la temperatura o la exposición a metales tóxicos, alcoholes y muchos venenos metabólicos; todas las células desde bacterias hasta neuronas, responden aumentando la producción de ciertas moléculas que participan en la regulación de la respuesta celular ante el estado de alerta (Kelly y Schlessinger, 1978; Miller et al., 1979; Tanguay, 1983; Lindquist, 1986). A estas proteínas se les ha denominado proteínas de estrés térmico, proteínas anti-estrés o "heat shock protein" HSP y a los

genes responsables de su síntesis, hsp. En condiciones normales muchas de ellas intervienen en procesos metabólicos esenciales, síntesis y ensamblaje de otras proteínas; algunas más regulan el crecimiento y/o la diferenciación celular (Kelly y Schlessinger, 1978; Miller et al., 1979; Tanguay, 1983; Nover, 1984; Arrigo y Tanguay, 1991; William, 1993).

La mayoría de los agentes que pueden inducir una respuesta al estrés son desnaturalizantes proteicos. Hightower (1980) sugirió que la acumulación intracelular de proteínas desnaturalizadas, o plegadas de una manera anormal, desencadenaba la respuesta anti-estrés y que las proteínas producidas facilitan la identificación y eliminación de las proteínas desnaturalizadas.

Hace 30 años se observó la llamada "respuesta al estrés térmico". Se detectó luego la misma respuesta en células sometidas a otros tipos de agresiones ambientales por ejemplo, la exposición a metales tóxicos, alcoholes y muchos otros venenos metabólicos. La respuesta se produce en células cultivadas en los tejidos de niños aquejados de fiebre, en órganos de las víctimas de un ataque al corazón y en pacientes cancerosos con un régimen de quimioterapia. Como son muchos los estímulos que pueden producir el mismo mecanismo de defensa celular, se ha convenido en darle el nombre de **respuesta al estrés**; y proteínas anti-estrés serán las moléculas que participan en ella (Tanguay, 1983; Findly y Pederson, 1981).

Los organismos vivos responden a nivel celular a las condiciones desfavorables tales como el estrés térmico, o a otras situaciones estresantes de diferentes orígenes, con una rápida y

acelerada expresión de un pequeño número de genes específicos; los genes **hsp**s (Arrigo et al., 1980; Findly y Pederson, 1981; Tanguay, 1983). Es importante enfatizar que los productos de estos genes, las proteínas anti-estrés, están presentes en condiciones normales, pero en menores cantidades; el incremento y acumulación en las células alcanza, en algunos casos, grandes concentraciones. La activación de la expresión de los genes de estrés térmico por situaciones extremas se lleva al cabo en todas las células de los organismos con sólo unas cuantas excepciones, como en el desarrollo embrionario temprano (Schlesinger et al., 1982; Tanguay, 1983; Nover, 1984; Neidhardt et al., 1984; Linquist, 1986).

Las proteínas anti-estrés se agrupan en dos clases: **constitutivas**, aquellas cuya expresión acontece en condiciones de crecimiento normal, y en condiciones de estrés incrementan su producción e; **inducibles**, aquellas que se inducen sólo en células sometidas a estrés. Algunas proteínas anti-estrés comparten su gran afinidad por el ATP y participan en procesos de maduración de otras proteínas celulares.

Existen abundantes evidencias que apoyan la idea de que la función de las proteínas anti-estrés es proteger a las células de los efectos dañinos del estrés, permitiendo su recuperación y permanencia. Además de la activación de los genes "heat shock" como resultado del estrés se inhibe al mismo tiempo la expresión de otros genes (Munro et al., 1984; Lindquist, 1986; Jedlicka et al., 1997).

Del análisis de la estructura y función de las proteínas anti-

estrés, se desprende que son algo más que simples moléculas de defensa. Durante la vida de una célula, muchas proteínas de éstas intervienen en procesos metabólicos esenciales, incluidos la síntesis y el ensamblaje de otras proteínas celulares. Algunas parecen dirigir las actividades de moléculas que regulan el crecimiento y la diferenciación celular (Tanguay, 1983; Nover, 1984; Arrigo y Tanguay, 1991; Salomón et al., 1991; William, 1993).

Tras el incremento repentino de la temperatura, en *Drosophila* se produce un aumento en la expresión de proteínas de tamaños similares a las de estrés térmico de bacterias, levaduras, plantas y células animales cultivadas. Más aún, las células sintetizan una o más proteínas de estrés térmico cuando son expuestas a metales pesados, alcoholes y otros venenos metabólicos (Arrigo et al., 1980; Findly y Pederson, 1981; Tanguay, 1983; Linqvist, 1986). Por lo anterior se acumularon evidencias de que esta reacción universal a la adversidad ambiental representa un mecanismo celular básico de defensa y las proteínas anti-estrés, que parecen incrementar su expresión sólo en momentos difíciles, forman parte de la respuesta. Una gran cantidad de los genes responsables de estas proteínas han sido identificados y aislados (Lewis et al., 1975; Findly y Pederson, 1981; Schliesinger et al., 1982; Camato y Tanguay, 1982; Tanguay, 1982).

La respuesta al estrés desempeña también un papel importante en la resistencia de las células animales a breves exposiciones a temperaturas altas. Las células que sufren un estrés térmico suficiente para aumentar los niveles de proteínas anti-estrés,

soportan mejor un segundo tratamiento térmico, letal en otras condiciones. Estas células termotolerantes son menos susceptibles a otros agentes tóxicos, por lo que se asume que la respuesta al estrés protege a las células contra diversas agresiones ambientales (Mitchell y Lipps, 1975; Arrigo et al., 1980; Lindquist, 1986).

El aislamiento y caracterización de genes de estas proteínas a partir de diferentes organismos reveló que muchos de ellos guardan estrecho parecido, lo que indica que estas proteínas se han conservado a lo largo de la evolución y cumplen una misma e importante función en todos los organismos, pero además se ha mostrado que las mismas proteínas se expresan en células normales, no sometidas a estrés (Mitchell y Lipps, 1975; Arrigo et al., 1980; Schlesinger et al., 1982; Neidhart et al., 1984; Tanguay, 1983; Nover, 1984; Lindquist, 1986).

Estudios sobre la expresión de las proteínas de estrés térmico durante el desarrollo en *Drosophila* muestran la expresión individual de éstas proteínas y su acumulación en los tejidos en estados específicos del desarrollo. Sin embargo, durante la respuesta al estrés la expresión de muchas proteínas se da de manera coordinada. Por lo que las Hsps (genes) están implicadas en al menos dos funciones: una de ellas durante el desarrollo y/o la diferenciación y la segunda en el restablecimiento de la función celular después de un período de estrés (Tanguay, 1983; Nover, 1984; Salomón et al., 1991; Arrigo et al., 1980; William, 1993).

De acuerdo con su peso molecular estas proteínas se han clasificado en cuatro familias de proteínas:

- I. Las HSP de alto peso molecular de 83-100 KD.
- II. La familia HSP70, que va de 66 a 78 KD aproximadamente.
- III. La familia HSP60 presente en bacterias mitocondrias y cloroplastos, denominadas también "chaperoninas".
- IV. Las proteínas de bajo peso molecular que van de 15 a más de 30 KD.

HSPs pequeñas: Son muy conspicuas en plantas (Linguist, 1986). El estrés térmico en *D. melanogaster* activa un pequeño número de genes específicos que no son necesariamente genes pequeños (Ritossa 1962; Ritossa 1964); dentro de estas se caracterizaron por su peso molecular las de 22, 23, 26, 27 KD. Los genes de estrés térmico en *Drosophila* que codifican para las pequeñas proteínas anti-estrés, hsp27, hsp26, hsp23 y hsp22, presentan una familia de genes particularmente interesante, ya que el complejo de activación de estos involucra mecanismos reguladores (Kelly y Schlessinger, 1978; Miller et al., 1979).

Arrigo y Zadeh (1981) mostraron por inmunofluorescencia en cultivo de células de *Drosophila* la presencia de las HSP23 preferencialmente en el núcleo después de un estrés térmico, y su migración al citoplasma cuando las células eran cultivadas de nuevo a la temperatura normal, 25°C. Este mismo comportamiento se ha propuesto para las pequeñas HSPs, desde el HSP 22 a la HSP27 (Mitchell y Lipps, 1975; Arrigo et al., 1980).

La síntesis de las pequeñas HSPs es inducida por estrés ambiental, y en células S3 en cultivo cuando se les agrega hormona α -ecdisona, así como durante el desarrollo normal de la mosca

(Ireland et al., 1982; Sirotkin y Davidson, 1982).

El estrés térmico y la α -ecdisona disparan la transcripción en cuatro pequeños hsps que tienen un control diferencial dependiente del desarrollo y en ciertos estados sólo un tipo de producto de los genes de estrés térmico (pequeños) está presente. En las células nodrizas, desarrolladas en los ovarios; los genes hsp27 y hsp26 son expresados selectivamente y sus transcritos son almacenados en los ovocitos (Zimmerman et al., 1983; Ayme y Tissières, 1985).

Glaser et al. (1986), demostraron que los hsp26 siguen un patrón de expresión tejido-específico. Además en estado de embrión solo los hsp27 y hsp26 son sintetizadas, mientras que la expresión de los hsp23 y hsp22 no se detecta (Arrigo y Pauli, 1988) y la activación de los pequeños hsps persiste en bajos niveles en el adulto (Arrigo, 1987; Mason et al., 1984). No se conocen más evidencias acerca de su sitio de acción, así como la función de los genes hsps pequeños durante el desarrollo normal de la mosca. Haass et al. (1990), mostraron por inmunolocalización *in situ* que los genes hsps pequeños en *Drosophila* presentan patrones de expresión dependientes del desarrollo, específicos de cada célula; manifestando diferentes patrones de expresión durante la embriogénesis e incluso los hsps se expresan en células no neuronales del sistema nervioso central (SNC) de los embriones y de la mosca adulta.

Se ha propuesto que los genes hsps pequeños en *Drosophila* forman un complejo globular de un tamaño aproximado 16S; y que la formación y el desarrollo de este complejo, es independiente del

modo de inducción de los hsp's pequeños (Arrigo y Pauli, 1988; Haass et al., 1990).

HSPs 40: La síntesis de proteínas HSP40 persiste en niveles altos después de la liberación de un estrés térmico, en contraste con la producción de las proteínas HSP70, que es rápidamente reprimida. Los análisis de la transcripción del gen hsp40 indicaron que su ARNm, a diferencia del ARNm de los hsp70, no fue activamente degradado después de un retorno a la temperatura normal, permitiendo una prolongada producción de la proteína (Simcox et al., 1985).

HSPs 70 : La familia HSP70 presenta algunas propiedades, como por ejemplo su gran afinidad por el ATP y su participación en el proceso de maduración de otras proteínas celulares. En células no sometidas a estrés la interacción entre miembros de la familia HSP70 con proteínas inmaduras es transitoria y dependiente de ATP, en cambio en condiciones de estrés las proteínas recién sintetizadas no maduran normalmente y permanecen unidas a una HSP70 acompañante (Schlesinger et al., 1982; Tanguay, 1983; Munro et al., 1984).

Después de un estrés térmico se acumulan una gran cantidad de HSP70 en el interior del nucléolo (Arrigo et al., 1980; Findly y Pederson, 1981; Tanguay, 1983; William, 1993).

Munro et al. (1984), sugirió que las HSP70 tienen dos dominios distintos. Ambos son capaces de acumularse en el núcleo, pero sólo el dominio altamente conservado N-terminal se une al nucléolo después del estrés térmico. Esto implica que la unión nucleolar y

la migración nuclear ofrece distintas propiedades a la proteína y es de importancia funcional.

HSPs 60: Los trabajos de Georgopoulos y col. en 1972 mostraron que mutaciones en dos genes de dos proteínas anti-estrés *GroE* y *GroES* daban resistencia a las bacterias contra virus que dependían de su maquinaria celular. Estas proteínas llamadas HSP10 y HSP60, (encontradas sólo en cloroplastos, mitocondrias, bacterias y cianobacterias) son necesarias para el ensamblaje y plegamiento de las proteínas

Las HSP10 y HSP60 participan en el ensamblaje y plegamiento de las proteínas (Arrigo et al., 1980; Findly y Pederson, 1981; Tanguay, 1983; William, 1993).

Las HSPs60 constan de dos anillos superpuestos, de siete subunidades cada uno, esta estructura parece servir de "banco" en el que se ubican las proteínas que aún no se han plegado y allí adquieren su estructura tridimensional final. Se asume que las familias HSP60 y HSP70 trabajan coordinadamente para facilitar la maduración de las proteínas. A los nuevos polipéptidos que salen de los ribosomas se les une la HSP70, esta unión impide quizás que la cadena se pliegue prematuramente; una vez unido a la HSP70 acompañante (chaperona) se transfiere a una HSP60, donde se produce el plegado y ensamblaje con otros componentes proteínicos (Mason et al, 1984; Vogel 1995).

También se les ha asociado con oncovirus. En el caso del virus del sarcoma de Rous se localizó un gen responsable del desarrollo de propiedades malignas; la enzima que se producía, pp60src,

actuaba sobre otra proteína implicada en la regulación del crecimiento celular. Después de sintetizarse, la pp60src se asocia rápidamente con dos proteínas la HSP50 y la HSP90 (Arcos *et al.*, 1995).

II. Termotolerancia

Cuando los organismos o las células en cultivo se exponen a temperaturas fuera de su rango de crecimiento normal, la respuesta al cambio es modulada por muchos factores ambientales, además de la historia termal del organismo (Ritossa, 1962; Tissières *et al.*, 1974; McKenzie *et al.*, 1975; Spradling *et al.*, 1977).

A partir de la experiencia se sabe que para cambiar a una planta de un ambiente a otro debe llevarse al cabo gradualmente para permitirle que se adapte a los cambios de temperatura, adquiriendo de esta manera una resistencia térmica; este fenómeno también se presenta en bacterias, células de mamífero y roedores.

El estrés térmico induce en las células el desarrollo de un estado transitorio de termotolerancia a través de la inducción de las proteínas de estrés térmico. Se ha propuesto que la sobreexpresión de estas proteínas (HSP) y en particular de la HSP27 contribuye al incremento de la resistencia a nivel celular. La acumulación de HSP27 en criceto chino está acompañada por un progresivo desarrollo de termorresistencia que se acerca al nivel de termotolerancia inducido por estrés térmico. La expresión de HSP27 está acompañada por un incremento en la estabilidad de las fibras de actina durante la hipertermia (Landry *et al.*, 1991;

Lavoie et al., 1993).

Landry et al. (1989), propusieron que la función de las HSPs, especialmente la HSP27 es ser una molécula protectora durante el estrés térmico que se relaciona directamente con la resistencia durante la hipertermia en células de criceto chino y que elevados niveles de HSP27 son suficientes para conferir protección de un estrés térmico intenso. Por lo cual la función de las HSP27 es incrementar la resistencia térmica adquirida por las células después de la exposición a inductores de HSP.

El decaimiento de la termotolerancia transitoria se explica con base en los cambios en las concentraciones celulares de HSP27. Las HSP70 siguen un cinética de acumulación lenta y decaen mucho más rápido ($t^{1/2}=4h$) que las HSP27 ($t^{1/2}=13h$). Las HSP27 tienen tres variantes isoeléctricas A, B y C. En las células crecidas a una temperatura normal las HSP27A representan más del 90% de toda las HSP27. Existe una relación estrecha entre el efecto del estrés térmico sobre la fosforilación de las HSP27 y la sobrevivencia de las células (Landry et al 1991; Lavoie et al 1993).

Los organismos inician la acumulación de proteínas anti-estrés después (o durante) la presencia de otros tipos de estrés. Así, se ha definido a la **termotolerancia** como una resistencia transitoria adquirida. La inducción y decaimiento de la termotolerancia son de gran interés en la terapia contra el cáncer (Vogel, 1995).

La inducción máxima de síntesis de proteínas (con peso molecular 107, 89, 70, 68 y 27 KD) ocurre concomitantemente con un máximo incremento de termotolerancia celular y cuando ésta retorna

a un estado basal, desaparece también la termotolerancia. Esto sugiere que la acumulación de estas proteínas en las células funciona en el proceso principal de la adquisición de un estado de termotolerancia (Landry et al 1982).

La familia HSP30 es menos conservada que la familia HSP70, pero ambas familias se relacionan con la habilidad de los organismos para resistir normalmente temperaturas letales, cuando están sujetos a incrementos graduales de temperatura (White et al., 1994)

Se ha reportado que el estrés térmico incrementa los niveles intracelulares de calcio. Y que la termotolerancia está influenciada por quelantes de calcio; ionóforos y drogas anti-cadmodulina; los cambios en fosforilación de hsp25 inducidos por estrés térmico resultan en una alteración a la termorresistencia; esto puede explicarse por una desfosforilación parcial de la cadmodulina dependiente de calcio a través de una fosfatasa 2B (Van-Dongen et al., 1986; Gaestel et al., 1992).

Las HSP26 son una de las más abundantes proteínas de estrés térmico en las células eucariontes. Tienen también una marcada expresión en algunas etapas particulares del desarrollo a temperaturas normales. En levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, son las responsables de la termorresistencia durante la esporulación y durante la germinación de las esporas (Petko y Lindquist, 1986).

Otros aspectos importantes en el estudio de la respuesta al estrés es conocer de qué manera afectará a las células una

posterior exposición: ¿cómo se afecta su historia térmica?, ¿cómo sobreviven las células a exposiciones combinadas de calor y radiación u otros factores inductores de estrés?.

Otro término de gran importancia es el de **termorresistencia** que a diferencia de la termotolerancia es la resistencia que tiene el organismo, cuya información está contenida en el genoma y es específica de la especie (Landry et al., 1982; Petko y Lindquist 1986).

Se ha propuesto que la termorresistencia en células sometidas a estrés térmico requiere de algunos procesos. La adquisición de la resistencia involucra al menos dos pasos distintos: una señal inicial o disparo, y el procesamiento subsecuente de la señal iniciadora. La sobrevivencia se modifica por la lenta desaparición de la termotolerancia o decaimiento en ausencia de un estrés continuo (Landry et al., 1982; Van-Dongen et al., 1986; Landry et al., 1989).

Según Solomon et al. (1991) las proteínas de estrés térmico HSP70 tienen un relevante papel en la inducción de termotolerancia y en la regulación de la respuesta de estrés térmico. La sobre-expresión del gen hsp70 afecta la termotolerancia más que la regulación; la baja-expresión afecta la regulación más que la termotolerancia (Jack, 1991; Angelidis et al., 1991).

Las células animales que sufren un estrés térmico suave, suficiente para aumentar los niveles de proteínas anti-estrés, soportan mejor un segundo tratamiento térmico, letal en otras condiciones. Además las células termotolerantes son menos

susceptibles a otros agentes tóxicos (Munro et al 1984; Lindquist 1986; Jedlicka et al 1997).

III. Regulación de la respuesta al estrés térmico

Por mucho tiempo la investigación acerca del estrés térmico se hizo principalmente en *Drosophila*, aunque es un fenómeno universal de amplia variedad en la naturaleza.

Procariontes.- En algunos casos poseen una sola copia de cada gen de los cuales algunos son de expresión constitutiva y otros más son inducibles. En *E. coli* los principales genes de proteínas de estrés térmico están bajo el control del gen *rpoH* el cual codifica el factor sigma 32. Un incremento en la temperatura afecta los niveles de sigma 32 de varias formas, y se ha observado que el gen *rpoH* se expresa al menos por 4 promotores diferentes, dos de ellos son regulados negativamente por la proteína DnaA. Al parecer en *E. coli* hay dos sistemas de estrés térmico, uno regulado por sigma-32 y otro por sigma-24 (Georgopoulos et al., 1979; Vogel, 1995).

Eucariontes.- Todos los genes de los eucariontes son transcritos normalmente e inducidos después de una exposición a estrés térmico, contienen una secuencia localizada en el extremo 5' conocida como elemento de estrés térmico (Heat Shock Element, HSE). El HSE corresponde a múltiplos invertidos de la secuencia NGAAN y se une al factor de transcripción de estrés térmico (HSF) obtenido de diferentes organismos (Pelham, 1982; Amin et al., 1988; Xiao y Lis, 1988; Wu et al., 1990 Sorger, 1989).

Jedlicka et al. (1997), proponen que los factores de transcripción de estrés térmico (HSF) tienen un papel esencial en

la habilidad de los organismos para sobrevivir a un estrés térmico extremo. Estos factores pueden unirse en potenciadores (enhancer, HSP) como un potente elemento inducible (Asano et al., 1988).

IV. Respuesta al estrés oxidativo

El estrés oxidativo se presenta cuando los niveles de especies reactivas de oxígeno (tales como el superóxido (O^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ácido hipocloroso) se incrementan. Estas especies dañan al ADN, proteínas y membranas. Lo anterior ocurre, si los antioxidantes se agotan y/o si la formación de éstos se incrementa más allá de la capacidad de defensa (Vogel, 1995).

Las especies oxígeno reactivas pueden originarse a partir del metabolismo aerobio normal, por agentes ambientales o por el estallido de fagocitos. Para contrarrestar los daños producidos, los organismos han evolucionado diferentes sistemas de defensa:

- A. Los enzimáticos (superóxido desmutasa, catalasa, peroxidasa, glutatión peroxidasa).
- B. Los mecanismos no enzimáticos (vitamina A, B, C, tocoferol).
- C. Los sistemas de producción de proteínas.

En *E. coli* la resistencia adaptativa presenta dos estímulos; uno para H_2O_2 y otro para O_2^- . Cada uno dispara la producción de aproximadamente 40 proteínas, la mayoría de las cuales son de función y control desconocidas. El gen *oxyR* regula la producción de H_2O_2 por medio de 8 proteínas. El locus con dos genes, *soxRS*, controla la inducción de otras nueve proteínas en respuesta a los generadores de superóxido pero no de H_2O_2 . En diferentes estudios

se ha observado que la activación del sistema soxRS, incrementa la resistencia a muchos antibióticos no implicados con estrés reductor. Esta respuesta al estrés con superóxido se debe a la disminución de la síntesis de la proteína OmpF, pues esta reducción podría desestabilizar el mensaje de ompF por el ARN antisentido micF (Georgopoulos et al., 1977; Vogel, 1995).

Al parecer el estrés oxidativo es de suma importancia ya que está involucrado en procesos esenciales como el envejecimiento, la fertilización, la diferenciación, la proliferación, etc.

V. Respuesta al estrés inducido por etanol y otros agentes tóxicos

El alcohol ha sido una de las drogas de mayor consumo a lo largo de la historia de la humanidad, su abuso ocasiona directa o indirectamente gran variedad de enfermedades en diferentes regiones del cuerpo. En exposiciones agudas se puede tolerar en niveles más o menos altos, en cambio en exposiciones crónicas (años) puede provocar un cierto grado de adaptación, teniendo el individuo altas concentraciones de alcohol en la sangre. Esta tolerancia llega acompañada de daño en diferentes tejidos (hígado, páncreas, corazón, cerebro, etc.) (Vogel, 1995).

Los estudios realizados en ratas indican que concentraciones de 50-150 Mm de alcohol (concentración a la cual se efectúan desórdenes significativos en la membrana), tienen poco o ningún efecto en preparaciones de membranas provenientes de ratas alimentadas con alcohol. A este fenómeno se le ha llamado

"tolerancia de membrana", los cambios que se dan a nivel molecular aún no han sido identificados (Ashburner, 1970; Zimarino y Wu, 1987).

Existe evidencia que sugiere que la señal para inducir tal respuesta adaptativa se ejerce a nivel celular. En estudios con líneas celulares expuestas a etanol por períodos de varios días, se detectan cambios específicos y reversibles en las propiedades de las células que ayudan a la adaptación al etanol. Estos datos sugieren que el alcohol dispara directamente una señal en la célula que puede inducir una respuesta adaptativa (Vigue y Sofer, 1976; O'Donnell et al., 1975).

Existen numerosos compuestos que desencadenan la producción de proteínas de estrés, entre ellos se encuentran el arsénico (específicamente, arsenito y arsenato de sodio) y la azida de sodio.

VI. Proteínas de estrés y receptores de hormonas

Algunos estudios relacionan a la HSP90 con receptores de hormonas esteroides. Cuando un receptor de esteroides se une a su hormona específica, el receptor puede interaccionar con el ADN y activar o reprimir la expresión de ciertos genes. La caracterización de las formas activa e inactiva del receptor de la progesterona, mostró que en ausencia de la hormona, el receptor se asocia con varias proteínas celulares, entre ellas la HSP90, que lo mantiene inactivo. Cuando se une a la progesterona, el receptor se libera de la HSP90 y cambia a una forma capaz de unirse al ADN

(Vander et al., 1997).

VII. Proteínas de estrés y enfermedades infecciosas

El estado de estrés ocasionado por infecciones y enfermedades inmunitarias. Puede ocasionar que las bacterias o microorganismos parásitos sintetizen proteínas que puedan ser los principales antígenos, o proteínas diana, que el sistema inmunitario utiliza para reconocer y destruir al invasor. Aunque en algunos casos estos antígenos pueden ser similares o iguales a las proteínas del hombre (Vogel, 1995).

VIII. Proteínas de estrés y cáncer

El uso de la hipertermia, en combinación con la radiación, en el tratamiento de cánceres ha tenido buenos resultados. Sin embargo aún hay detalles que no se han definido y que obstaculizan su práctica. Entre ellos está el hecho de que las células se vuelven termotolerantes, ya sea de forma local y/o total; otro problema, es la falta de una unidad de dosis termal que evalúe cuantitativamente el efecto biológico (Arcos et al., 1995).

El uso de la hipertermia (en combinación con la radioterapia) en tumores superficiales, ha tenido éxito pues en algunos casos el tumor se reduce en más del 50%; un problema que presentan el tratamiento de tumores profundos es que la temperatura no puede ser constante. Algunos métodos por los que se da hipertermia son los siguientes:

A. Calentamiento externo.

B. Calentamiento intracavitoneal.

C. Calentamiento intersticial.

Se han reportado diferentes factores tanto endógenos como exógenos que influyen en la inducción y progresión de un tumor. Entre éstos se encuentra el estrés, del cual se ha reportado que modula la inducción y el crecimiento de los tumores. Por lo que se ha concluido que el estrés es un parámetro firmemente establecido en la carcinogénesis (Vogel, 1995).

También, el estrés se ha definido como cualquier cambio lejos de una regulación homeostática. Estos cambios pueden ser en la conducta o el comportamiento (miedo, tensión, ansiedad), fisiológicos (incremento de la actividad gastrointestinal, taquicardia e incremento en la presión sanguínea) y/o bioquímicos (cambio en el nivel de esteroides, incremento de catecolamina en el plasma).

En los seres humanos, las fuentes de estrés pueden ser eventos externos (presión en el trabajo, pérdida de un ser querido) o internos (dolor, enfermedad). Si el estrés es intenso o crónico, puede favorecer el desarrollo de enfermedades oportunistas asociadas con el estrés (depresión, hipertensión, úlcera, dolor de cabeza) (Vogel, 1995).

La exposición crónica a estrés puede conducir en algún tiempo a la adaptación, con una reducción gradual en la respuesta al estrés. En algunos casos el estrés crónico no produce cambios en la respuesta a éste. Contrariamente, el estrés crónico puede llevar a la sensibilización con un incremento en la respuesta al estrés por

un tiempo excesivo. La elevada variación entre los individuos, probablemente se refleja en la plasticidad encontrada en la evaluación del proceso así como en la habilidad de los mecanismos de respuesta.

El estrés no siempre está relacionado con deterioros en la salud, las consecuencias que este pueda ocasionar en un organismo se relacionan con la frecuencia con que se presenta el estrés. Además los efectos en la salud son altamente particulares. En algunos individuos no se muestra relación entre el estrés y la manifestación de alguna enfermedad, cuando el estímulo ha sido constante por un período intenso; otra experiencia relevante es cuando el estrés se relaciona con problemas y patologías; cuando el estrés ha sido extremo y constante (Vogel, 1995).

Los individuos usualmente expresan selectividad de respuesta con respecto al órgano afectado (dolor de cabeza, hipertensión, úlcera o depresión, pero no todos simultáneamente). Esta diferencia y selectividad se ha explicado con base en la vulnerabilidad del órgano. Si una persona no presenta vulnerabilidad en algún órgano en el momento del estrés entonces no causa problemas; no importa la reacción al estrés ya que no afectará severamente al organismo. Pero si existe vulnerabilidad en el órgano no importando el órgano que sea, éste responderá patológicamente al estrés.

La alta variabilidad de la respuesta al estrés y la vulnerabilidad del órgano, posiblemente requieren tiempos prolongados; y las respuestas en el detrimento de la salud son afectadas por el marco genético y por factores ambientales y/o

experimentales (Vogel, 1995).

IX. Proteínas de estrés como chaperonas moleculares

Las chaperonas moleculares son una familia de proteínas celulares, las cuales regulan el correcto plegado de otros polipéptidos y en algunos casos su ensamblado en estructuras oligoméricas (Ellis and Hemmingsen, 1989; Hartl, 1996; Lorimer, 1996).

Las chaperonas ejercen su función a través de la inhibición de vías improductivas de plegado, impidiendo interacciones incorrectas entre las partes de la cadena polipeptídica (Ellis, 1990; Hartl, 1996; Lorimer, 1996).

Las chaperonas funcionan no sólo durante los procesos celulares normales sino que además actúan ante la demanda causada por un estado de estrés como lo es el estrés térmico (Ellis, 1990).

La función de las chaperonas es de gran importancia ya que muchos procesos celulares que involucran el ensamblaje de proteínas presentan un riesgo propio, dependiendo del número y variedad de interacciones que se presenten en su conformación (Vogel, 1995).

X. Estrés térmico como inductor de fenocopias

La expresión fenotípica de rasgos genéticos es el resultado tanto de la dotación genética que los organismos reciben (genotipo) como del impacto del ambiente en la expresión de dicha información.

Los cambios en el ambiente en el que se lleva a cabo la ontogenia de un organismo puede llegar a alterar la expresión de la

información que contiene inicialmente. En la mayoría de los casos estos cambios en la expresión no implican modificación de la información genética, por lo que no son heredables y sólo se exhiben en los organismos que tienen este tipo de alteraciones se les conoce como fenocopias y su aspecto es muy similar a las modificaciones en el fenotipo debidas a mutaciones (Ramos et al., 1993).

Las fenocopias en *Drosophila* pueden ser producidas en diferentes etapas del desarrollo. Se pueden inducir ante la presencia de calor, eter, radiación, entre otros; estas fenocopias simulan fenotipos de mutantes conocidas, como lo es bitórax, vestigial, etc. (Gloor, 1947; Santamaria, 1979; Eberlein, 1986; Eberlein and Mitchell, 1987; Petersen and Mitchell, 1991).

En *Drosophila melanogaster* se ha reportado que incrementos ligeros (de 4 a más grados) sobre la temperatura habitual (25 ± 1 °C) durante el desarrollo larvario modifican la frecuencia de mutación somática en células de las alas de la mosca adulta (Mitchell and Lipps, 1978). También se ha reportado que el estrés térmico aplicado a embriones de *Drosophila* en estado de blastodermo induce fenocopias de algunas mutantes dominantes del complejo bitórax (Santamaria, 1979).

La producción de fenocopias se ha relacionado con efectos del estrés térmico sobre la síntesis directa del ARN a través de la retroalimentación de la transcripción por proteínas de estrés térmico (Mitchell y Lipps, 1978).

***Drosophila melanogaster* como sistema de prueba**

La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* es el eucarionte mejor conocido genéticamente, razón por la cual se le emplea en diversos tipos de investigaciones; ofrece numerosas ventajas que permiten utilizarla como un sistema de prueba animal rápido, versátil y eficiente, con el que puede analizarse un amplio espectro de alteraciones genéticas inducidas por agentes ambientales, tanto en células somáticas como en células germinales.

Se le puede mantener en espacios pequeños y el costo de su manutención es reducido, en comparación con los sistemas de mamíferos. Por la duración de su ciclo de vida, proporciona gran número de generaciones en corto tiempo, tiene un número cromosómico bajo ($2n=8$) y las larvas presentan cromosomas gigantes en sus glándulas salivales, los cuales se han utilizado en estudios citogenéticos para mutagénesis y evolución (Ramos et al., 1993).

Los compuestos se pueden administrar por diferentes rutas, además de que permite la detección de virtualmente todos los eventos genéticos: sustitución de pares de bases en el ADN, mutaciones génicas o puntuales con efecto deletéreo, deleciones pequeñas, rearrreglos cromosómicos como inversiones y translocaciones, no disyunción, recombinación en las células germinales y en las células somáticas, entre otras.

Desde que la hembra ovoposita el huevo, hasta que emerge el imago (adulto), el ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* es de 9.5 a 10 días, a 25 ± 1 °C y 60 % de humedad relativa. La larva pasa por tres estadios y dos mudas larvales; la primera de ellas

ocurre a las 25 h y la segunda, a las 48 h; el pupario se forma aproximadamente a las 96 h (Demerec, 1965; Roberts, 1986; Ramos et al., 1993) (Fig. 2).

Pasado el desarrollo embrionario, eclosiona del huevo una larva (primer estadio), la cual se encuentra formada por 12 segmentos no aparentes (Demerec, 1965). La larva presenta dos linajes celulares diferentes; las células larvarias y las imagales. Las células larvarias forman todo el cuerpo de la larva, han perdido su capacidad de división y sólo aumentan de volumen; en algunas se presentan cromosomas politénicos, son poliploides y están determinadas y diferenciadas genéticamente. Las células imagales se localizan en pequeñas estructuras denominadas discos imagales y no están involucradas de manera aparente con alguna función indispensable para la sobrevivencia de la larva, son distinguibles de las células larvales por su menor tamaño, su constitución diploide y la retención de la capacidad de división celular; están determinadas genéticamente, pero sólo alcanzan su diferenciación cuando entran a metamorfosis (Demerec, 1965; Wilkins, 1986; Würgler y Vogel, 1986; Pomerai, 1990; Ramos et al., 1993).

Durante la metamorfosis, la hormona ecdisona desencadena una serie de cambios en el organismo, los cuales involucran la destrucción de ciertos tejidos y órganos larvarios y la organización de las estructuras del adulto a partir de un complejo de células primitivas, los llamados discos imagales. La mayor parte de los órganos del adulto se forman a partir de éstos,

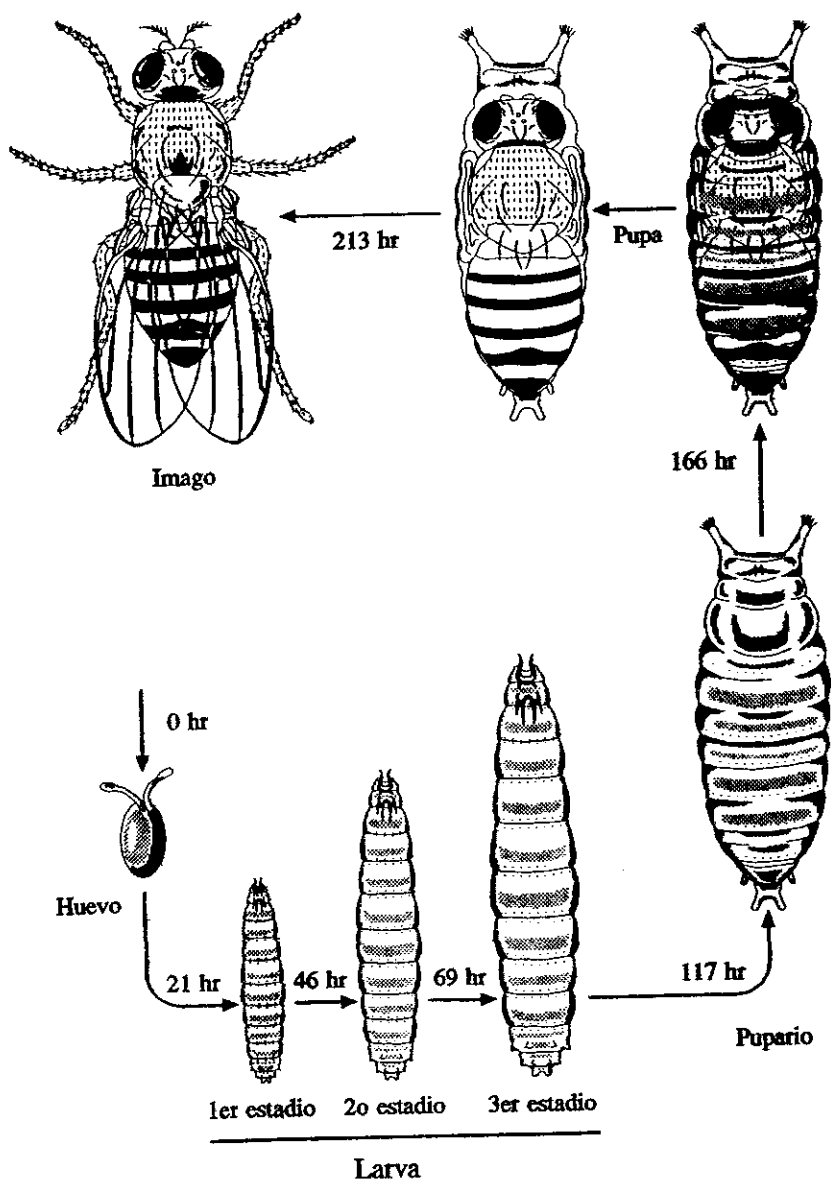


Fig. 2 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (25 °C).

o bien por células larvarias que se diferencian al ocurrir la reorganización del estado pupal. Las extremidades, ojos, antenas, alas y el aparato genital se diferencian a partir de su disco imagal respectivo, que sufre una histogénesis durante el desarrollo pupal dando origen a las distintas partes del cuerpo del adulto (Ramos et al., 1993) (Fig. 3).

Los análisis bioquímicos realizados tanto en las larvas como en los organismos adultos de *Drosophila*, indican que en ellos se detectan complejos enzimáticos semejantes a los de la fracción S9 del hígado de los mamíferos, razón por la cual *Drosophila* se ha empleado en mutagénesis como modelo experimental *in vivo*, ya que la capacidad de biotransformación de promutágenos de este sistema de prueba es similar a la detectada en los mamíferos (Vogel y Zijlstra, 1987).

Para realizar la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) en células de las alas de *Drosophila melanogaster* se utilizan larvas transheterocigóticas para dos marcadores fenotípicos recesivos localizados en el tercer cromosoma que controlan el aspecto de los tricomas, o procesos unicelulares que forman las células diferenciadas de la superficie de las alas: pelos múltiples en el ala (múltiple wing hair, *mwh*) y flama (flare, *flr³*), ubicados a 0.0 y 39.0 unidades de mapa sobre el cromosoma 3, respectivamente; de tal forma que si durante el desarrollo de las alas ocurren cambios en la información de las células, se originarán clones celulares que se harán evidentes como manchas fenotípicas mutantes que podrán distinguirse del resto de las

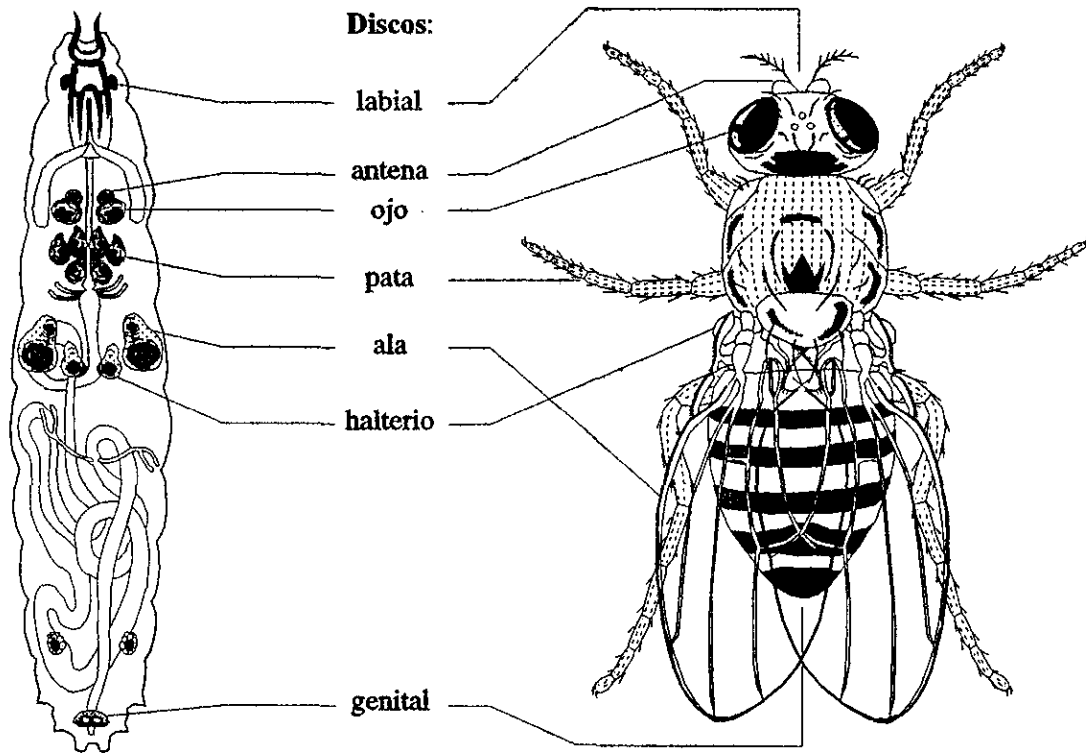


Fig. 3 Los discos imagales de *Drosophila melanogaster* originan diversas estructuras del adulto por una serie de divisiones mitóticas.

células -de tipo silvestre- a través de la expresión fenotípica de los tricomas en la mosca adulta (García-Bellido y Merriam, 1971) (Fig. 4). Esta prueba tiene valores más altos de sensibilidad (0.75-0.78) y especificidad (0.83-0.86) que la de letales recesivos ligados al sexo (SLRLT) (0.33-0.79 y 0.50-0.73, respectivamente) cuando se analizan compuestos no alquilantes (Vogel, 1987; Graf y Würgler, 1988; Vogel y Szakmary, 1990).

En la prueba de mutación y recombinación somáticas, aquellos eventos provenientes de mutación puntual, deleción, no disyunción y la recombinación entre los marcadores utilizados ($f1r^3$ y mwh), originarán una mancha simple en la que las células involucradas expresarán sólo uno de los marcadores mutantes (Fig. 5). Únicamente los eventos de recombinación que ocurren entre el marcador proximal ($f1r^3$) y el centrómero, darán origen a manchas gemelas, en las cuales las células expresarán los dos marcadores de manera independiente (Fig. 5). Por su origen, las manchas gemelas son indicadoras de recombinación, por lo que en la prueba SMART puede estimarse la capacidad inductora de recombinación de un compuesto en particular, al distinguirse entre estos eventos y otros (Vogel et al., 1980; Radman y Kinsella, 1980; Cairns, 1981).

Los tratamientos en la prueba SMART pueden abarcar toda la fase larvaria o sólo una parte de ésta. Los tratamientos agudos pueden seleccionarse para probar compuestos con vida media corta, para exposiciones a altas concentraciones, o cuando se desea localizar específicamente el efecto provocado. En adición a lo anterior, los tratamientos de mayor duración se utilizan para

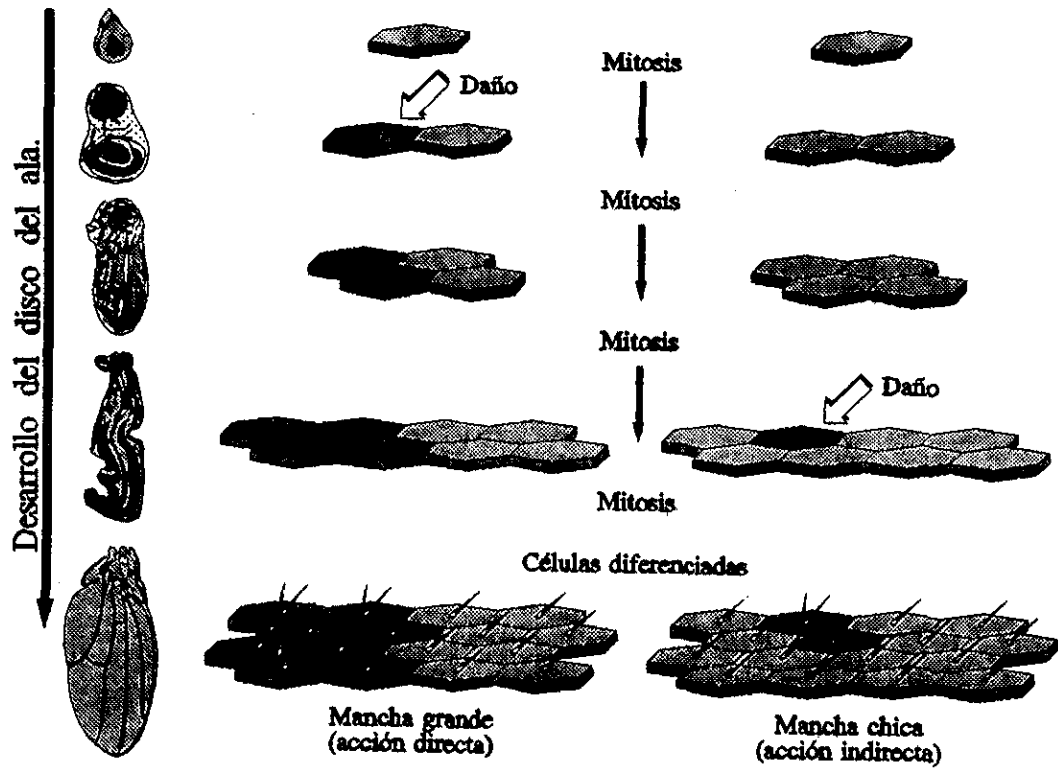


Fig. 4 Formación de clones mutantes.

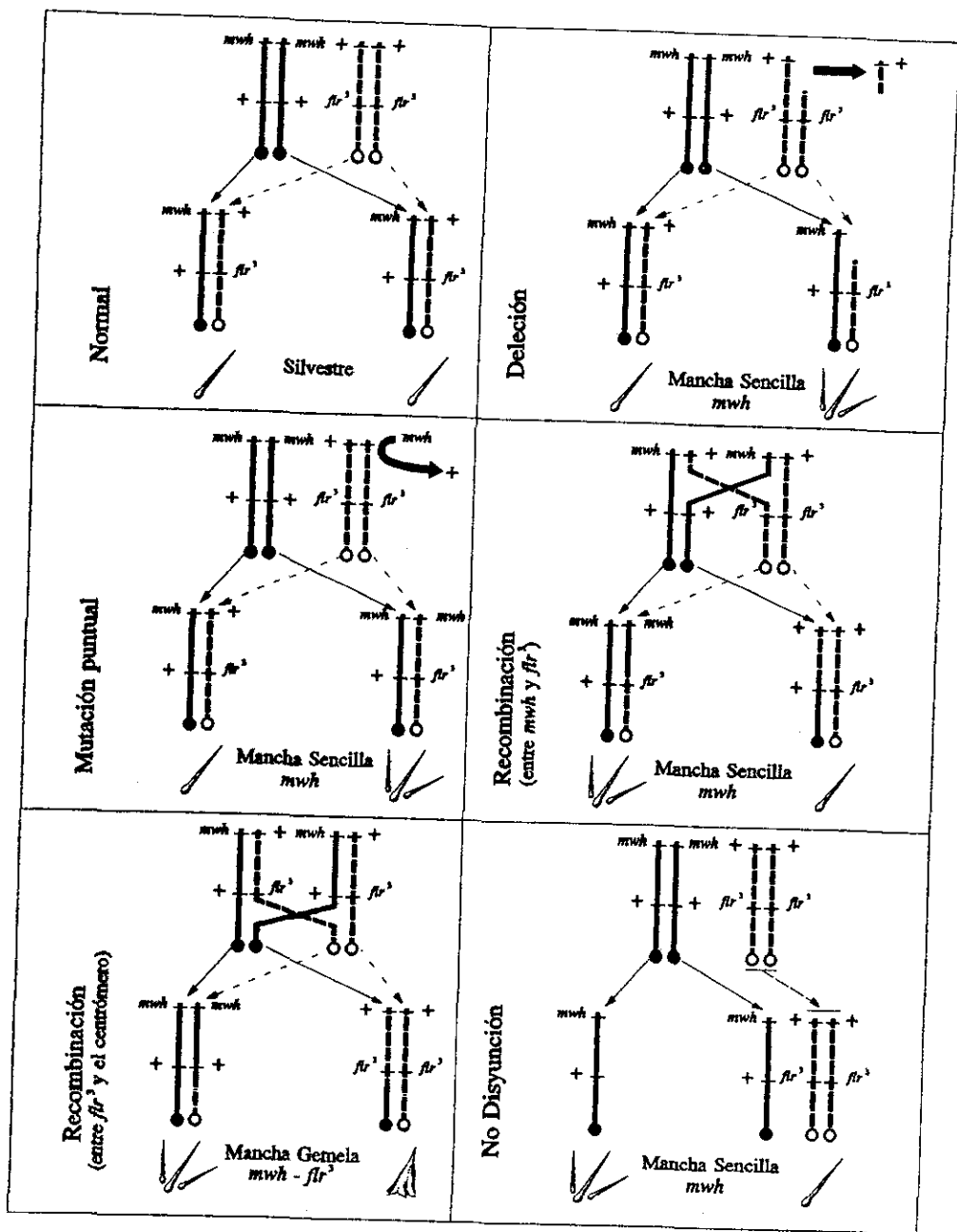


Fig. 5 Eventos genéticos y tipos de manchas detectados en la SMART (Modificado de Graf *et al.*, 1984).

compuestos químicamente estables y exposiciones a bajas concentraciones por períodos prolongados. Debido a la duración de la fase larvaria, es posible exponer a las larvas a más de un tratamiento, de manera que puede determinarse si el orden en que éstos son aplicados modifica su genotoxicidad; o bien, administrar simultáneamente ambos compuestos (co-tratamientos), con lo que es posible estimar si la interacción química entre ellos altera el efecto inducido.

Los tratamientos combinados pueden usarse, por ejemplo, en la determinación de la capacidad antimutagénica de algún compuesto, definida como la disminución del efecto inducido por otros mutágenos. Este protocolo se ha utilizado exitosamente para probar la combinación de más de un compuesto y para analizar la actividad antimutagénica de otros (Muñoz, 1994; Muñoz y Ramos, 1995). Es importante continuar con la evaluación de las ventajas de este tipo de protocolos para llegar a establecer su aplicabilidad y limitaciones en el estudio de más de un compuesto o factor genotóxico.

JUSTIFICACIÓN

La determinación de la interacción entre compuestos químicos potencialmente genotóxicos y los factores ambientales, es relevante para valorar el impacto genético que éstos pueden ejercer sobre los seres vivos. El estudio de las relaciones de sinergismo (potenciación, efecto aditivo y antagonismo, entre otras) que ocurren entre los diversos factores que participan en estos procesos incrementará la información sobre el potencial dañino de

compuestos químicamente estables y exposiciones a bajas concentraciones por períodos prolongados. Debido a la duración de la fase larvaria, es posible exponer a las larvas a más de un tratamiento, de manera que puede determinarse si el orden en que éstos son aplicados modifica su genotoxicidad; o bien, administrar simultáneamente ambos compuestos (co-tratamientos), con lo que es posible estimar si la interacción química entre ellos altera el efecto inducido.

Los tratamientos combinados pueden usarse, por ejemplo, en la determinación de la capacidad antimutagénica de algún compuesto, definida como la disminución del efecto inducido por otros mutágenos. Este protocolo se ha utilizado exitosamente para probar la combinación de más de un compuesto y para analizar la actividad antimutagénica de otros (Muñoz, 1994; Muñoz y Ramos, 1995). Es importante continuar con la evaluación de las ventajas de este tipo de protocolos para llegar a establecer su aplicabilidad y limitaciones en el estudio de más de un compuesto o factor genotóxico.

JUSTIFICACIÓN

La determinación de la interacción entre compuestos químicos potencialmente genotóxicos y los factores ambientales, es relevante para valorar el impacto genético que éstos pueden ejercer sobre los seres vivos. El estudio de las relaciones de sinergismo (potenciación, efecto aditivo y antagonismo, entre otras) que ocurren entre los diversos factores que participan en estos procesos incrementará la información sobre el potencial dañino de

los mismos, lo cual es de primordial importancia en la determinación de alteraciones en las células somáticas, como proceso fundamental que antecede el desarrollo de procesos malignos

OBJETIVO GENERAL:

Analizar la interacción entre la temperatura y la genotoxicidad de algunos xenobióticos en la inducción de daño a células somáticas en *Drosophila melanogaster*.

Objetivos particulares:

- 1) Determinar el efecto de la temperatura en la frecuencia de mutación y recombinación en las células somáticas de las alas.
- 2) Determinar la presencia de termotolerancia en células somáticas de *Drosophila*.
- 3) Analizar el efecto de la temperatura sobre la genotoxicidad del arsenato y arsenito de sodio en células somáticas.
- 4) Analizar el efecto del arsenato y arsenito de sodio en células somáticas termotolerantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Compuestos químicos : Arsenato de sodio $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, cristales dibásicos CAS-Núm. [10048-95-0] y arsenito de sodio NaAsO_2 , polvo CAS-Núm. [7784-46-5], ambos de Baker Analyzed Reactivo.

Cruza y marcadores

Se utilizaron larvas + *f1r³/mwh* + de 72 ± 4 h y 24 ± 4 h de edad; las cuales se obtuvieron de la crusa progenitora ♀♀

flr³/TM3, Ser X ♂♂ mwh/mwh (Fig. 6)

El marcador (*flr³/TM3, Ser*) "flare" se localiza a 39 unidades de mapa en el cromosoma 3; es letal en condición homocigótica en células germinales, pero puede expresarse en células somáticas produciendo tricomas en forma de flama (García Bellido y Dapena, 1974). Para el mantenimiento de esta línea se usa el cromosoma balanceador *TM3, Ser* (el cual presenta múltiples inversiones que abarcan gran parte del cromosoma 3 y que no permiten recobrar eventos de recombinación; para distinguir a las moscas portadoras del cromosoma balanceador se utiliza el marcador "Serrata" (*Ser*), un gen letal dominante que produce indentaciones en el borde distal de las alas, de esta manera, las únicas moscas que sobreviven son las heterocigóticas para *flr³* y para *Ser*, por lo que se tiene un sistema de letales balanceados (Russell, 1992). El marcador *mwh* (múltiples pelos en el ala) se encuentra en el cromosoma 3 a 0.0 unidades de mapa; y se manifiesta fenotípicamente porque altera el número de tricomas por célula; produciendo múltiples tricomas, en lugar de uno como en el fenotipo silvestre (Lindsley y Zimm, 1992).

Sincronización

Después de tres días de realizada la cruce, los progenitores fueron transferidos a frascos con medio de cultivo fresco en los que se colectaron huevos por un período de 8 hrs.

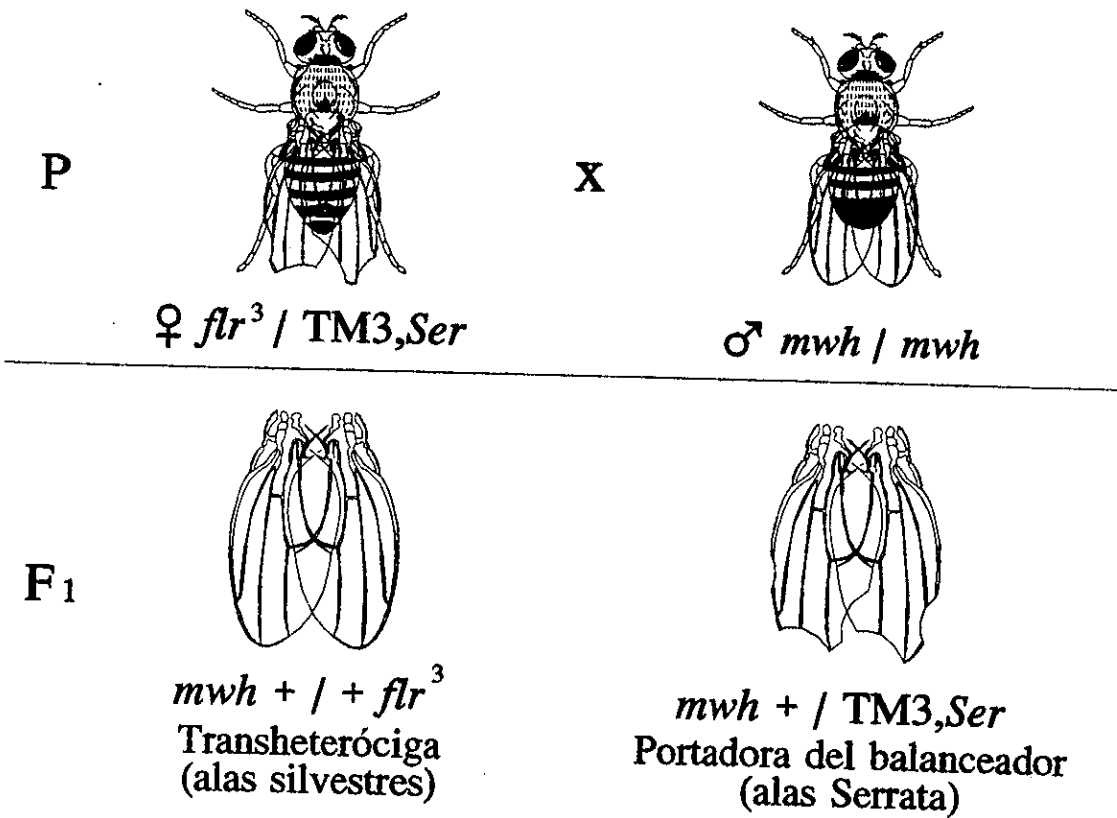


Fig. 6 Cruza utilizada en la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en alas de *Drosophila melanogaster*.

Tratamientos

Agudo:

Protocolo 1: Larvas *flr³/mwh*, de 72 ± 4 hrs de edad, se colocaron en tubos que contenían 60 mg de celulosa y 0.5 ml de sacarosa al 5%, los cuales se sometieron, mediante baño María a diferentes combinaciones de temperatura, con intervalos de 1 hr entre cada cambio, en los que se mantenían a 25°C.

Los tubos se cerraron con un tapón de poliuretano, restringiendo el espacio a las larvas, para asegurar que todas estuvieran expuestas a la misma temperatura (Fig. 7).

En la figura 8 se muestra un esquema del tratamiento seguido. Las temperaturas probadas fueron las siguientes:

29, 33, 38, 40 y 41°C. Las dos últimas temperaturas resultaron letales para las larvas de *Drosophila*, por lo que se eliminaron del resto de los tratamientos.

Se realizaron diferentes tratamientos, con uno, dos y tres estímulos a temperaturas diferentes, según las siguientes combinaciones:

25 °C (testigo negativo)

- Un pulso: 29, 33, 38 °C.
- Dos pulsos: 29-33, 33-38 y 29-38 °C.
- Tres pulsos: 29-33-38 °C.

Crónicos

Protocolo 2: Se colocaron los progenitores en frascos de vidrio para ovopositar sobre medio fresco durante 8 hora, se dejó

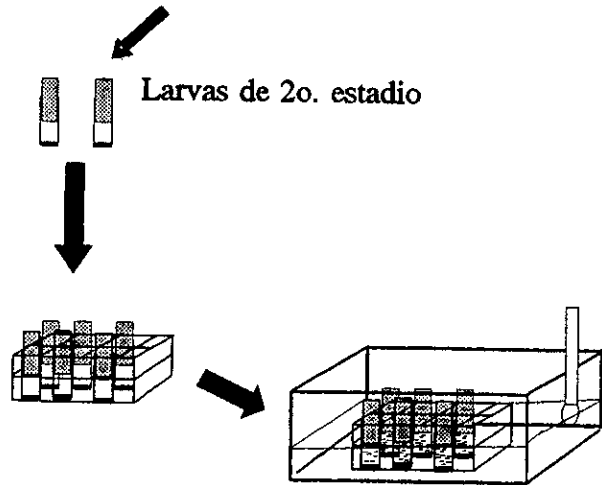
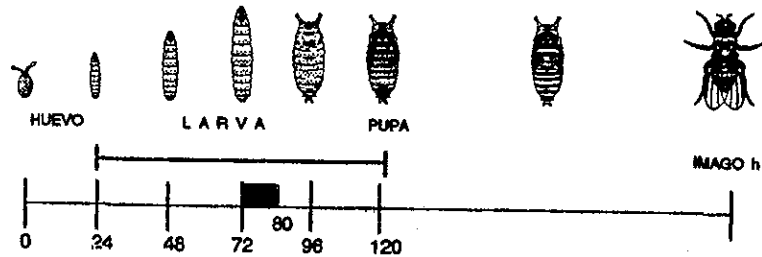
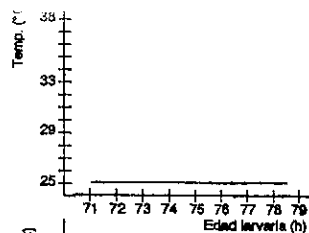
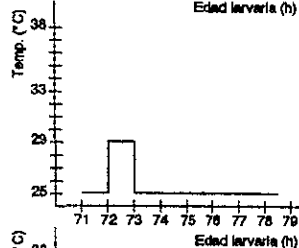


Fig. 7 Dispositivo diseñado, para tratar a larvas de segundo estadio de *Drosophila melanogaster* con diferentes pulsos de temperatura.

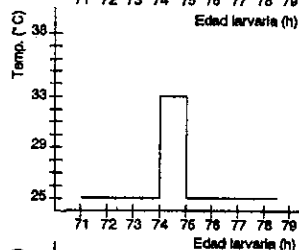
Testigo
negativo
(25 °C)



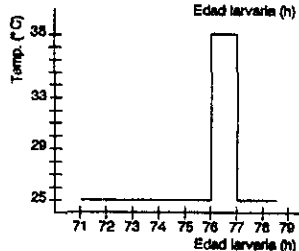
1 pulso
(29 °C)



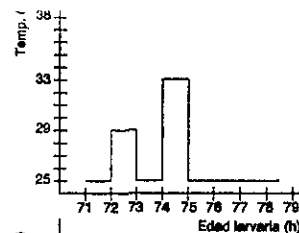
1 pulso
(33 °C)



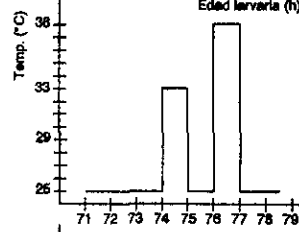
1 pulso
(38 °C)



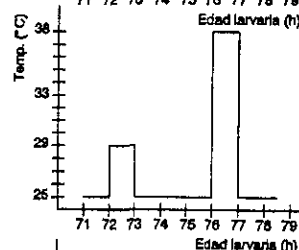
2 pulsos
(29-33 °C)



2 pulsos
(33-38 °C)



2 pulsos
(29-38 °C)



3 pulsos
(29-33-38 °C)

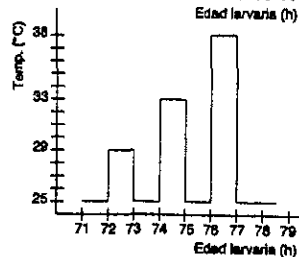


Fig. 8 Diseño experimental para el tratamiento con diferentes pulsos de temperatura en larvas de tercer estadio de *Drosophila melanogaster*.

que los huevos se desarrollaran en larvas de la edad requerida, y posteriormente se les colocó dentro de una estufa a 29.5°C durante 96 h, para el desarrollo temprano (24-120 h); 120 h para el desarrollo tardío (120-240 h); y 216 h para la exposición total (24-240 h). El testigo negativo se mantuvo a 25°C (Fig. 9).

Protocolo 3: En tubos homeopáticos que contenían medio de cultivo fresco en el que se incorporó el compuesto a probar se colectaron huevos de los progenitores por 8 hrs. Después de transcurridas las 24 h del desarrollo embrionario, los viales se mantuvieron en la estufa durante 96 h, a una temperatura de 29.5 °C hasta la pupación (24-120 h) (Fig. 10).

Los compuestos y las concentraciones fueron:

Arsenato de sodio 0.2, 0.4, 2 y 6 ppm

Arsenito de sodio 0.2, 0.4, 0.8 y 2 ppm

Registro de las manchas.

Las moscas adultas transheterocigóticas que se recuperaron de los frascos experimentales y sus testigos respectivos fueron sacrificadas por sobredosis de éter y se fijaron en alcohol al 70% (Fig. 11). Las alas fueron separadas del organismo con ayuda de pinzas de relojero y se montaron en portaobjetos empleando solución Faure (Graf et al., 1984). En cada laminilla se colocaron 10 pares de alas de hembras y 10 pares de alas de machos. Las alas se revisaron a 40X, cuantificando el número, tipo y tamaño de manchas. Se considera que dos manchas son independientes cuando se separan por más de 2 hileras de tricomas normales (García-Bellido y

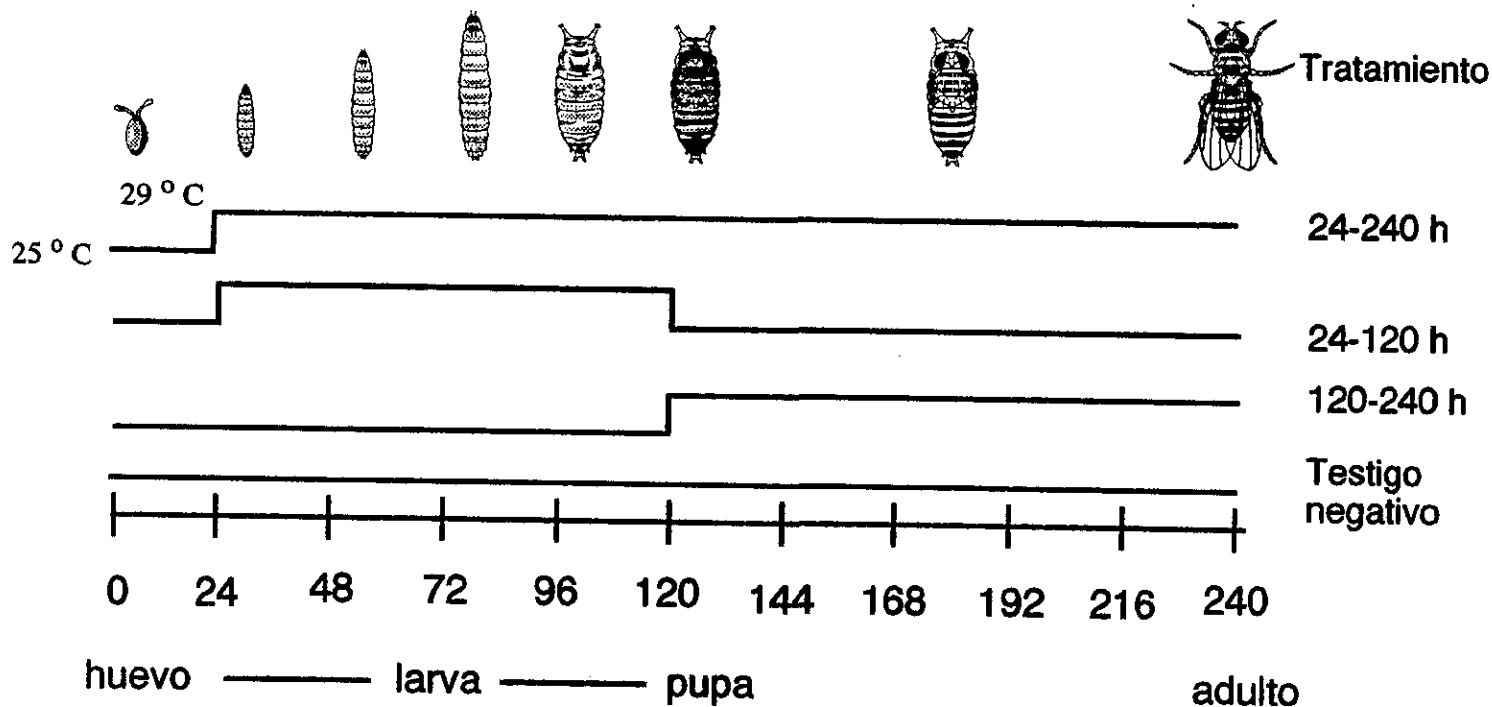


Fig. 9 Esquema del protocolo seguido, al tratar con temperatura a *Drosophila melanogaster* durante diferentes etapas del ciclo de vida.

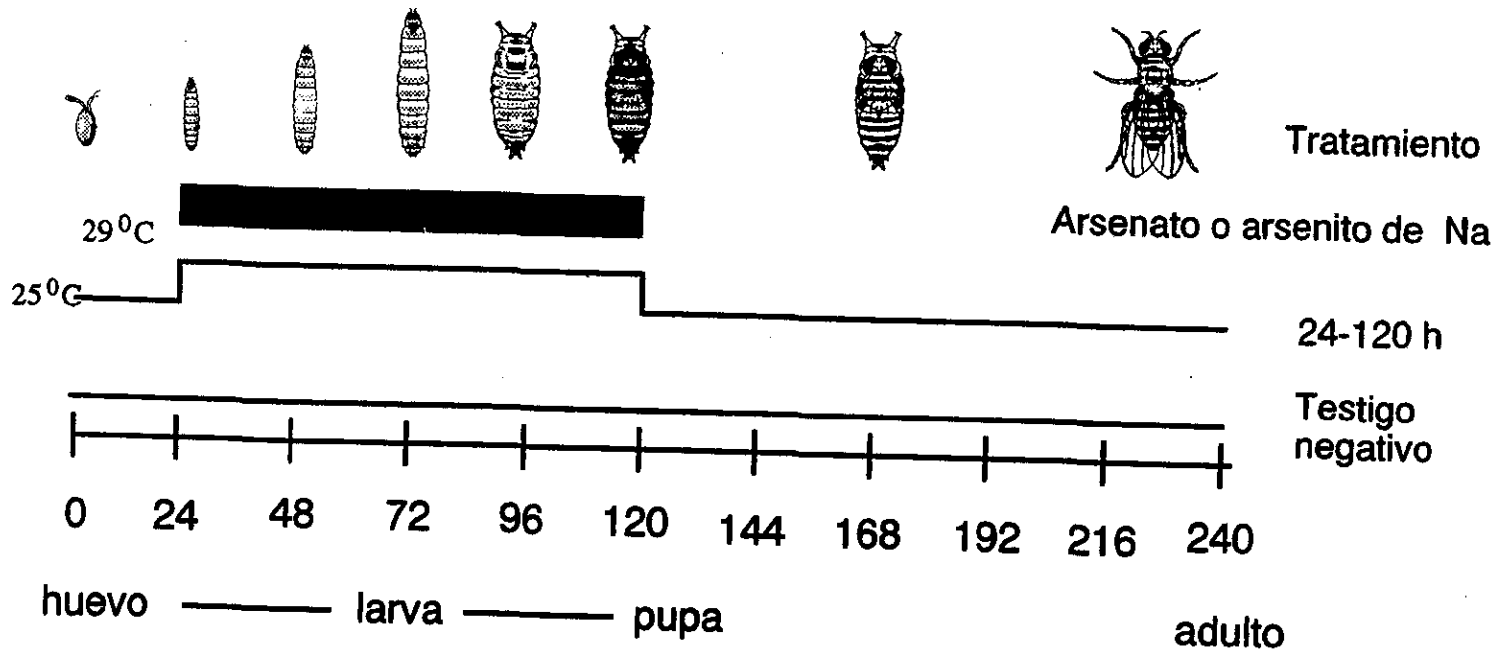


Fig.11 Esquema del protocolo seguido, al co-tratar con temperatura y arsénico a *Drosophila melanogaster* durante diferentes etapas del ciclo de vida.

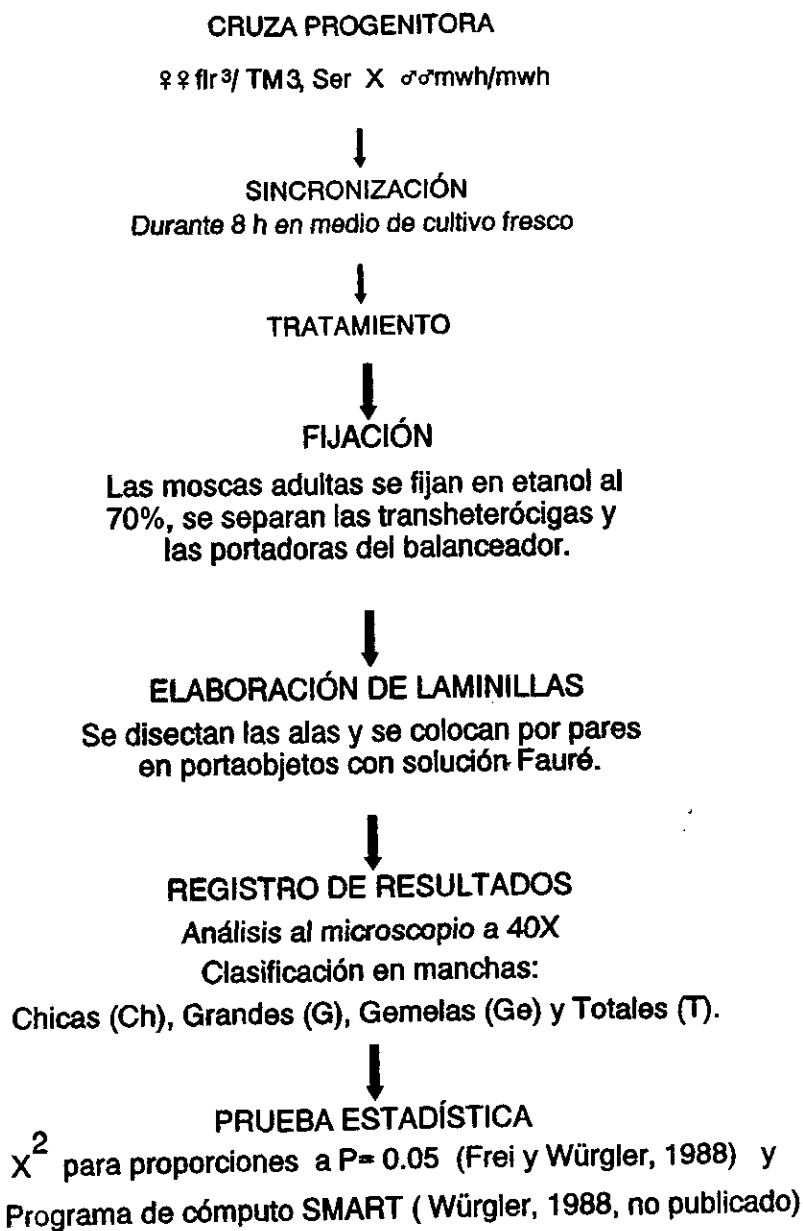


Fig. 11 Resumen de la metodología seguida en la prueba de SMART en células somáticas del ala de *Drosophila melanogaster*.

Merriam, 1971; Graf et al., 1984).

Análisis estadístico.

Para determinar si existían diferencias significativas entre las series testigo y tratadas, se comparó la frecuencia de manchas de cada lote mediante el programa de cómputo SMART (Frei y Würigler, no publicado), a un $\alpha = 0.05$, y el procedimiento de decisión múltiple de Frei y Würigler (1988). Este programa se basa en la prueba de X^2 para proporciones y contrasta dos hipótesis:

La hipótesis nula (H_0), estipula que no existe diferencia entre la frecuencia de mutación de las series testigo y las tratadas; por esta razón, su aceptación indica que el tratamiento no altera la frecuencia de mutación basal. El rechazo de esta hipótesis indica que hay un incremento estadístico significativo en la frecuencia de mutación basal.

La hipótesis alternativa (H_1) propone que el tratamiento incrementa m veces la frecuencia basal de mutación. Su rechazo indica que la frecuencia de mutación inducida no alcanza el incremento de frecuencia postulado (m), mientras que su aceptación señala un efecto positivo del tratamiento. El incremento propuesto m , indica el número de veces que debe aumentarse la frecuencia de mutación del lote testigo. Para manchas simples chicas y manchas totales, $m = 2$ debido a que la frecuencia basal de este tipo de manchas es alta; y para manchas simples grandes y manchas gemelas, $m = 5$ debido a que la frecuencia de estos eventos es muy baja. Los resultados que pueden obtenerse del análisis son los siguientes:

negativo (-), si se acepta la H_0 y se rechaza la H_a ; positivo (+), si se rechaza la H_0 y se acepta la H_a ; débil positivo (d+), si se rechazan ambas hipótesis, en cuyo caso la frecuencia de mutación será mayor de la del lote testigo, pero no alcanzará el incremento propuesto; e, indeterminado (i), si se aceptan ambas hipótesis, ya que esto no puede ser cierto simultáneamente.

En las moscas adultas, las manchas constituyen la expresión fenotípica de alteraciones genotípicas en las células precursoras de las alas (células de los discos imagales de las alas). Se ha determinado que para alcanzar el número de células que forman cada ala se requiere el concurso de 15.6 divisiones celulares, asumiendo que la duración del ciclo celular de las células precursoras es de 8 h (García-Bellido y Merriam, 1971; Szabad et al., 1983). Así, una célula precursora (sólo se ejemplifica con 1 célula) que inicia la serie de divisiones mitóticas para la formación del ala se encontraría en 2^0 ciclos = 1 célula; después de la primera división se tendrían 2^1 ciclos = 2 células; en la siguiente división, 2^2 ciclos = 4 células, y así sucesivamente, de manera que se puede estimar cuántos ciclos de división pasaron desde que se originó el cambio en la información genética de la célula precursora, ya que esto determinará el tamaño de la mancha en la mosca adulta, este valor recibe el nombre de **clase clonal promedio** (Tabla I) (Páez, 1996).

No obstante lo anterior, en la mosca adulta el tamaño de la mancha no siempre corresponde con el que podría esperarse con base en la edad de la larva al momento del tratamiento y con el tipo de

Tabla I . Número de células por clon y número de ciclos celulares
precursores de un ala de *Drosophila melanogaster*.

No. de Ciclos Celulares	No. de Células por clon
2^0	1
2^1	2
2^2	4
2^3	8
2^4	16
2^5	32
2^6	164
2^7	128
2^8	256
2^9	512
2^{10}	1024
2^{11}	2048
2^{12}	4096
2^{13}	8192
2^{14}	16384
2^{15}	32768
2^{16}	65536

acción de un agente mutagénico (mutágeno o promutágeno), de manera que variaciones en la clase clonal promedio pueden indicar interferencia en la proliferación de las células precursoras.

Cuando en las series tratadas se obtienen valores menores a los del testigo correspondiente es posible que el tratamiento provoque atraso o impida la proliferación. El análisis de la clase clonal promedio debe realizarse en combinación con otros parámetros, como la frecuencia de manchas totales y la frecuencia de inducción $\times 10^{-5}$ células (Páez, 1996).

La frecuencia de inducción $\times 10^{-5}$ células, estima cuántos clones nuevos se inducen con base en un número de células constante. La frecuencia de inducción corregida $\times 10^{-5}$, en la que se restan los clones del lote testigo, dá un valor indicativo de los clones producidos sólo por el tratamiento.

Se comparó la dispersión en la distribución del número de manchas por mosca y en la distribución del número de células por mancha con la prueba no paramétrica de comparaciones múltiples (U de Mann-Whitney-Wilcoxon), para la sobre dispersión en el número de manchas por mosca y el número de células por clon a un $\alpha = 0.05$. La prueba de U de Mann-Whitney-Wilcoxon aplicada a la dispersión poblacional contribuye a la toma de decisiones sobre la genotoxicidad de los compuestos evaluados en la SMART (Frei y Wurgler, 1995; Ramos et al., 1996).

RESULTADOS

Se realizaron al menos dos repeticiones de cada tratamiento y se compararon los resultados obtenidos en cada una; al no encontrarse diferencias significativas, se procedió a sumar los datos de cada repetición para incrementar el tamaño de muestra.

El factor temperatura fue probado por separado: 1) en tratamientos agudos; 2) en tratamientos crónicos y 3) en los cotratamientos crónicos con dos sales de arsénico (arsenato y arsenito de sodio).

Tratamientos agudos con temperatura

La frecuencia de manchas obtenida en moscas expuestas a uno, dos o tres pulsos de temperatura, se muestra en la tabla II. Con un pulso de temperatura arriba de 25 °C, no se incrementó de manera significativa la frecuencia de manchas totales, aunque en todos los casos la frecuencia fue ligeramente mayor a la del testigo negativo. La frecuencia de manchas grandes fue incrementada de manera significativa y en igual magnitud con los tres tratamientos de un pulso ($P < 0.05$). La frecuencia de manchas gemelas fue similar a la del testigo. También en los tratamientos de un pulso, la clase clonal promedio fue similar entre los lotes experimentales y mayor a la del testigo (1.42).

Al dar dos pulsos de 1 h a temperaturas superiores a 25 °C, separados por un intervalo de recuperación de 1 h a 25 °C se modificó la respuesta obtenida anteriormente. En el lote expuesto a 29 y 33 °C, la frecuencia de manchas chicas (0.46) fue

Tabla II. Número y frecuencia de manchas inducidas por tratamientos alternados con diferentes temperaturas.

Pulso	Temp. °C	Núm. de alas	Manchas por ala (Número de manchas) Diagnóstico estadístico*				Núm. de clones mwh	Clase cional prom.	Frecuencia de formación de clones X 10 ⁻³	
			Manchas simples chicas (1-2 cels.) m=2	Manchas simples grandes (> 2 cels.) m=5	Manchas gemelas m=5	Manchas totales m=2			obser- vada	corre- gida
1	25	120	46 (0.38)	0 (0.00)	2 (0.02)	48 (0.40)	48	1.42	1.6	
	29	120	45 (0.37)-	11 (0.09)+	0 (0.00)-	56 (0.47)-	56	1.86	1.9	0.3
	33	120	49 (0.41)-	11 (0.09)+	2 (0.02)-	62 (0.52)-	62	1.89	2.1	0.5
	38	120	54 (0.45)-	12 (0.10)+	2 (0.02)-	68 (0.57)i	67	1.94	2.3	0.6
2	29-33	120	55 (0.46)-	4 (0.03)i	0 (0.00)-	59 (0.49)-	59	1.63	2.0	0.4
	33-38	120	44 (0.37)-	5 (0.04)+	4 (0.03)i	53 (0.44)-	52	1.71	1.8	0.2
	29-38	120	67 (0.56)+	7 (0.06)+	0 (0.00)-	74 (0.62)+	74	1.66	2.5	1.0
3	29-33-38	120	58 (0.48)-	8 (0.07)+	0 (0.00)-	66 (0.55)i	65	1.75	2.2	0.7

* Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würzler, 1988 (no publicado): +, positivo; -, negativo; i, inconcluso; con un nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$.

ligeramente mayor a la obtenida con 29 °C (0.37) y similar a la registrada para 33 °C (0.41), en ningún caso la diferencia fue significativa. Se registraron pocas manchas grandes y ninguna gemela. La suma de todas las manchas alcanzó una frecuencia intermedia entre los dos tratamientos de un solo pulso, y finalmente la clase clonal promedio fue mayor a la del testigo negativo y menor a la de los tratamientos de un pulso. En las moscas expuestas a 33 y 38 °C, la frecuencia de manchas chicas fue menor a la de los tratamientos de un pulso (0.37) y similar a la del testigo negativo; la de manchas grandes fue mayor a la del testigo a 25 °C ($P < 0.05$), pero comparada con la de los lotes que recibieron un solo pulso fue aproximadamente de la mitad. Se recobraron manchas gemelas, pero no fueron significativas en número; finalmente, la frecuencia total de manchas fue similar a la del testigo negativo y menor a la obtenida en los tratamientos correspondientes de un pulso. En los tratamientos con dos pulsos: 29 y 38 °C, separados por un período de 3 h a 25 °C, se obtuvo un efecto diferente. La frecuencia de manchas chicas fue mayor a la obtenida en los correspondientes tratamientos de un pulso (0.56); la frecuencia de manchas grandes también se incrementó de manera significativa, aunque comparada con los tratamientos individuales el valor fue menor (0.06); no se recobraron manchas gemelas; y la suma de todas las manchas dio la mayor inducción de todos los tratamientos (0.62) ($P < 0.05$).

La combinación de tres pulsos de temperatura: 29, 33 y 38 °C, separados por 1 h de recuperación a 25 °C, produjo sólo un ligero

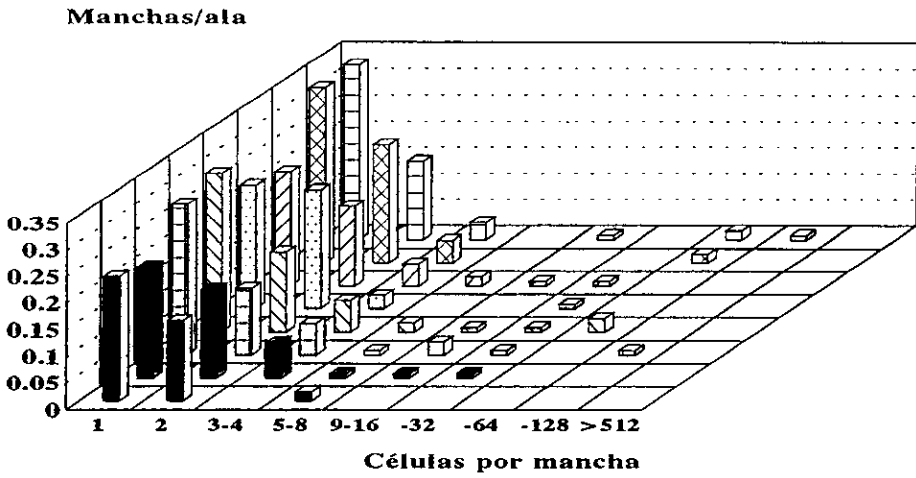
incremento en la frecuencia de manchas chicas; las manchas grandes fueron más numerosas que en los tratamientos con dos pulsos pero no superaron las frecuencias obtenidas con los tratamientos de un solo pulso; no se recobraron manchas gemelas y la frecuencia de manchas totales se incrementó en forma similar a la obtenida con los tratamientos a 33 y a 38 °C (0.52 y 0.57, respectivamente). También en este tratamiento, la clase clonal promedio fue mayor a la del testigo negativo (1.75).

La figura 12a muestra que la dispersión de la distribución del número de células por mancha fue mayor en todas las series experimentales, debido a la aparición de manchas con gran número de células, sin embargo, la frecuencia con la que se recobraron éstas fue baja, por lo que las diferencias con respecto al testigo negativo no fueron significativas ($P > 0.05$).

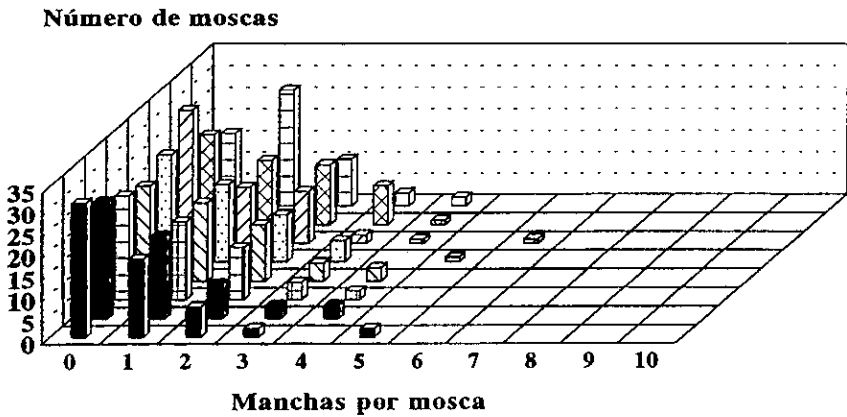
La dispersión en la distribución de manchas por moscas también fue ligeramente mayor a la encontrada para el lote testigo, aunque el número de moscas por mancha fue similar entre los lotes, la frecuencia de moscas con más de una mancha se incrementó en las series experimentales (Fig. 12b).

En resumen, la aplicación de un pulso de temperatura mayor a 25°C, induce alteraciones heredables en las células somáticas de *Drosophila*. Dos pulsos consecutivos (con intervalos de recuperación de 1 h a la temperatura óptima) confiere termotolerancia de las células al segundo pulso y la respuesta recobrada es menor. La aplicación de dos pulsos no consecutivos (separados más de 3 h) induce mayor daño a las células somáticas que los tratamientos

a)



b)



°C

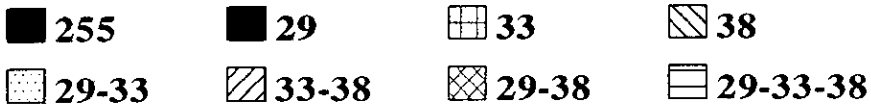


Fig. 12 a) Frecuencia de células por mancha y b) Manchas por mosca, inducidas por diferentes pulsos de temperatura en *Drosophila melanogaster*.

independientes. La aplicación de tres pulsos consecutivos (separados por 1 h de recuperación entre cada uno), tiene un efecto menor que la aplicación de dos pulsos no consecutivos (Fig. 13).

Tratamientos crónicos con temperatura

Para los tratamientos con un mayor tiempo de exposición a una temperatura superior a la óptima se seleccionaron 29 °C, aunque finalmente se utilizaron 29.5 °C, temperatura a la que se logró estabilizar la estufa de cultivo. A 29 °C se obtuvo un incremento significativo en la frecuencia de manchas grandes, por lo que al prolongar el tiempo de exposición se esperaba que el efecto fuera más marcado.

En esta etapa se analizó el efecto de la temperatura en el desarrollo postembrionario de moscas libres de inversión y de moscas portadoras del cromosoma balanceador (*Ser*), en las últimas la presencia de múltiples inversiones no permite recobrar eventos de origen recombinogénico; por lo anterior, la comparación de las frecuencias en los dos tipos de moscas estima la contribución de la recombinación a la respuesta recobrada. Con la finalidad de determinar cuál es la etapa más sensible se analizó por separado el efecto en la etapa larvaria y en la metamorfosis.

Moscas libres de inversión

En la fase larvaria, el incremento en la temperatura no modificó la frecuencia de manchas chicas y gemelas (Tabla III), pero sí la de manchas grandes de manera significativa ($P < 0.05$),

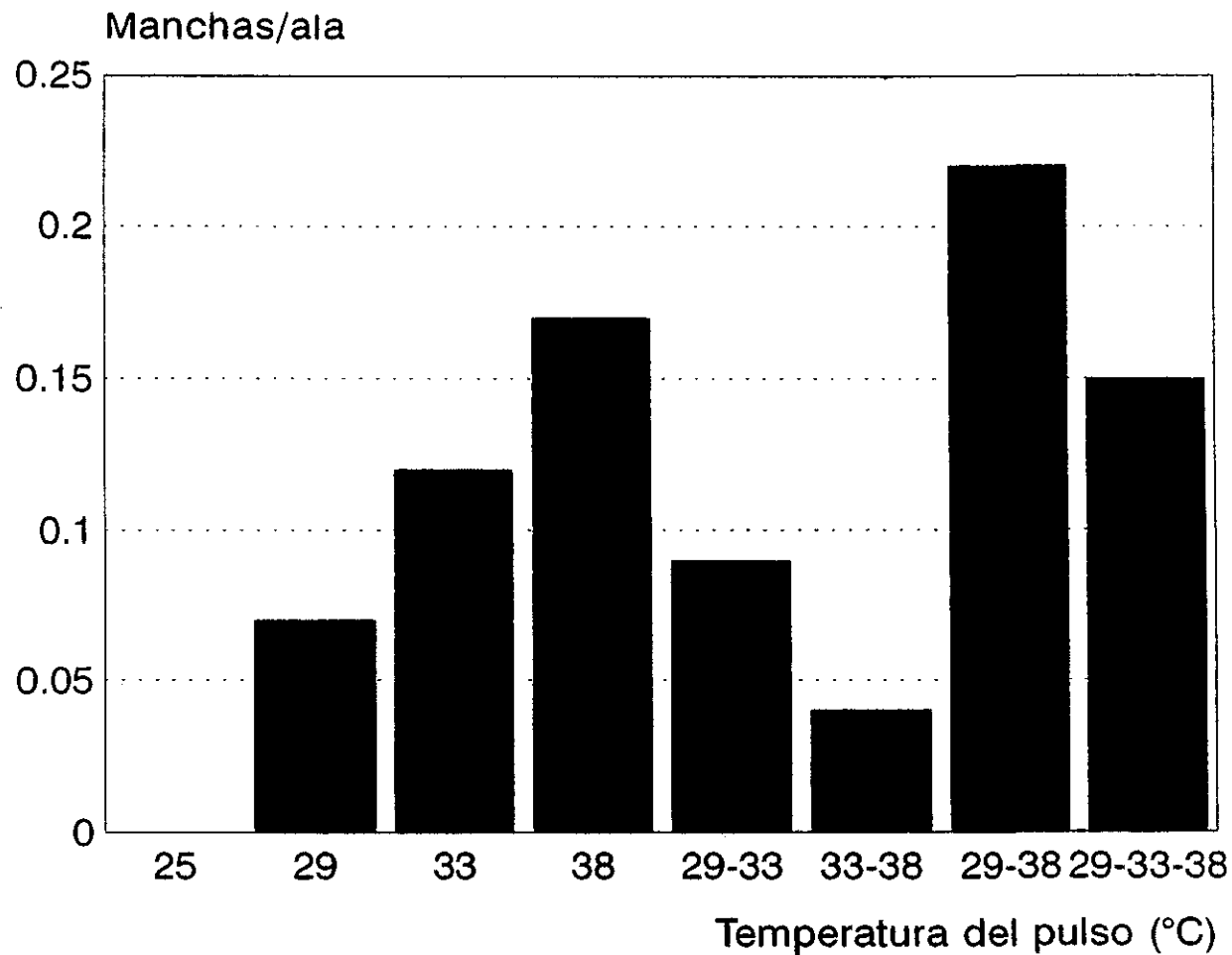


Fig. 13 Frecuencia corregida de manchas por ala recobradas en tratamientos con uno, dos, y tres pulsos de temperatura.

Tabla III. Número y frecuencia de manchas inducidas por tratamientos con temperaturas a larvas de diferentes edades de *Drosophila melanogaster*.

Temp. °C	Tiempo de Exposi- ción	Núm. de alas	Manchas por ala (Número de manchas) Diagnóstico estadístico*				Núm. de clones mwh	Clase clonal prom.	Frecuencia de formación de clones X 10 ⁻³	
			Manchas simples chicas (1-2 cels.) m=2	Manchas simples grandes (> 2 cels.) m=5	Manchas gemelas m=5	Manchas totales m=2			obser- vada	corre- gida
25.0	0-240	120	46 (0.38)	0 (0.00)	2 (0.02)	48 (0.40)	48	1.42	1.6	
29.5	24-120	120	45 (0.37) -	9 (0.08) +	1 (0.01) -	55 (0.46) -	55	1.85	1.9	0.2
29.5	120-240	120	195 (1.62) +	63 (0.52) +	1 (0.01) -	259 (2.16) +	258	1.94	8.8	7.2
29.5	24-240	120	195 (1.62) +	90 (0.75) +	1 (0.01) -	286 (2.38) +	286	2.24	9.8	8.1
Efecto	aditivo		1.99	0.61	0.02	2.62				

* Analisis estadístico de acuerdo con Frei y Würgler, 1988 (no publicado): +, positivo; -, negativo; i, inconcluso; con un nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$.

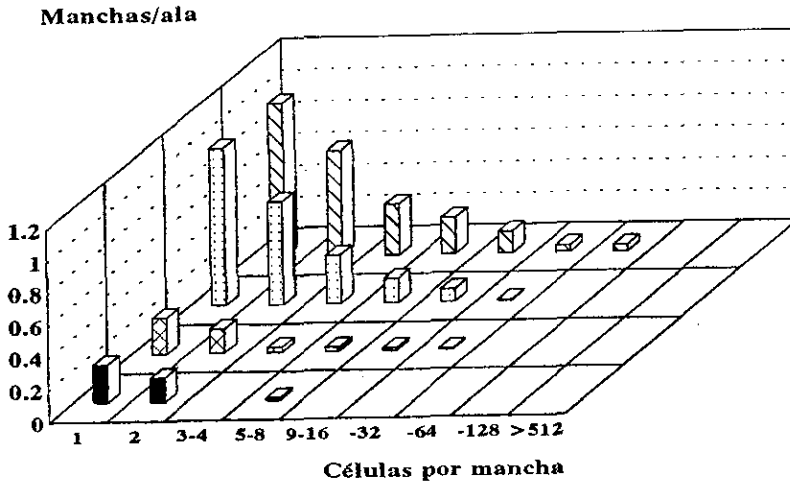
sin embargo, como este tipo de manchas contribuye en una proporción reducida a la frecuencia de manchas totales, ésta apenas registró un ligero incremento, comparado con las moscas mantenidas a 25 °C; no obstante, la clase clonal promedio sí aumentó (1.85). Cuando se exponen los organismos a partir de las 120 h de edad y durante la metamorfosis, se observó un notable incremento en la frecuencia de manchas simples, tanto chicas como grandes ($P < 0.05$), pero no de manchas gemelas.

La suma del total de manchas quintuplica la frecuencia del testigo negativo (2.16 y 0.40, respectivamente), registrándose una clase clonal promedio mayor y una frecuencia corregida de formación de clones por 10^{-5} células de 7.2. Al exponer a las moscas todo el período postembrionario, la frecuencia de manchas chicas fue menor (1.62) a la que se esperaría bajo un modelo aditivo (1.99); la de manchas grandes (0.75) es mayor a la esperada (0.61); y, finalmente, la frecuencia de la suma de todas las manchas (2.38) fue menor a lo esperado (2.62), con un déficit de 29 manchas (0.24 X 120 alas). La clase clonal promedio fue la mayor de todos los tratamientos (2.24) y se registró la mayor frecuencia corregida de formación de clones por 10^{-5} células (8.1).

La dispersión en la distribución del número de células por mancha fue mayor en todas las series experimentales, pero las frecuencias por tipo de mancha se incrementaron notoriamente en los tratamientos que abarcaron 120-240 y 24-240 h (Fig. 14a).

La dispersión en el número de manchas por mosca sólo se modificó en los tratamientos que abarcaron la metamorfosis ($P <$

a)



b)

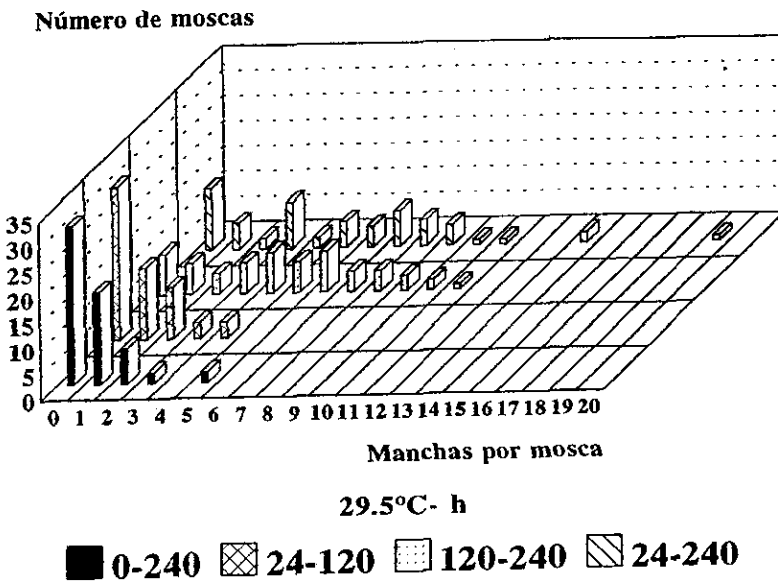


Fig. 14 a) Frecuencia de células por mancha y b) Manchas por mosca, inducidas por temperatura en diferentes etapas del ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

0.005), siendo mayor durante todo el período postembrionario (Fig. 14b).

Moscas portadoras del cromosoma balanceador (Ser)

Las moscas expuestas durante la fase larvaria mostraron la misma frecuencia de manchas que el testigo a 25 °C (0.52) (Tabla IV), sin embargo, el efecto sobre el tipo de mancha fue diferente. La frecuencia de manchas chicas fue menor y la de manchas grandes registró un incremento débil positivo (0.22), en consecuencia, la clase clonal promedio también se incrementó (2.21). También en estas moscas, durante la metamorfosis se recobró un gran número de manchas, siendo significativo el incremento en la frecuencia de manchas simples ($P < 0.05$). La frecuencia del total de manchas fue el triple de la del testigo negativo (1.53), con una clase clonal promedio que fue la mayor de todos los tratamientos (2.35), así como la frecuencia corregida de formación de clones por 10^{-5} células (4.1). Contrario a lo observado en las moscas libres de inversión, la exposición durante todo el período postembrionario no registró el máximo efecto. La frecuencia de manchas chicas se incrementó ligeramente, la de manchas grandes y la de la suma de todas las manchas sí registró un aumento significativo pero menor al del tratamiento anterior. La clase clonal promedio fue mayor a la del testigo y la frecuencia de formación de clones por 10^{-5} células fue sólo de 1.6.

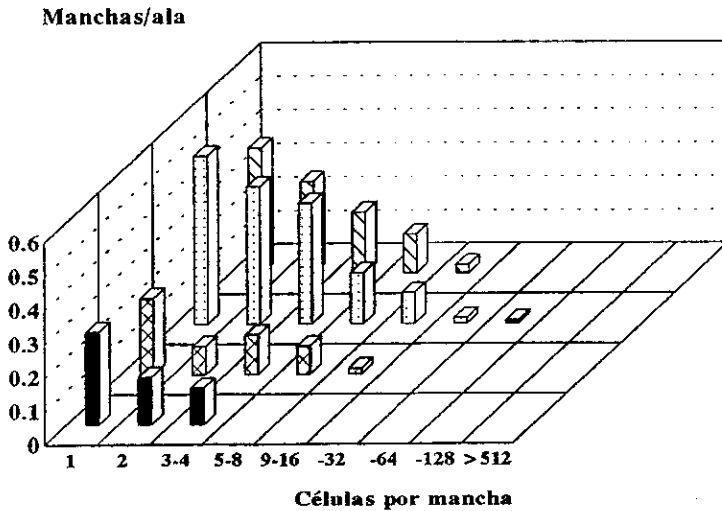
La dispersión en la distribución del número de células por mancha (Fig. 15a) fue mayor en todos los tratamientos y al igual que en las moscas libres de inversión, en los tratamientos que

Tabla IV. Número y frecuencia de manchas inducidas por tratamientos con temperaturas a larvas heterocigas (Ser) de diferentes edades de *Drosophila melanogaster*.

Temp. °C	Tiempo de Exposi- ción	Núm. de alas	Manchas por ala (Número de manchas) Diagnóstico estadístico*				Núm. de clones mwh	Clase clonal prom.	Frecuencia de formación de clones X 10 ³	
			Manchas simples chicas (1-2 cels.) n=2	Manchas simples grandes (> 2 cels.) n=5	Manchas gemelas n=5	Manchas totales n=2			obser- vada	corre- gida
25.0	0-240	120	50 (0.42)	13 (0.11)	0 (0.00)	63 (0.52)	63	1.68	2.2	
29.5	24-120	120	37 (0.31)-	26 (0.22)d*	0 (0.00)-	63 (0.52)-	63	2.21	2.2	0.0
29.5	120-240	120	109 (0.91)+	75 (0.62)+	0 (0.00)-	184 (1.53)+	184	2.35	6.3	4.1
29.5	24-240	120	78 (0.60)i	39 (0.30)+	0 (0.00)-	117 (0.91)+	117	2.12	3.7	1.6

* Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würgler, 1988 (no publicado): +, positivo; -, negativo; i, inconcluso; con un nivel de probabilidad:
alfa = beta = 0.05.

a)



b)

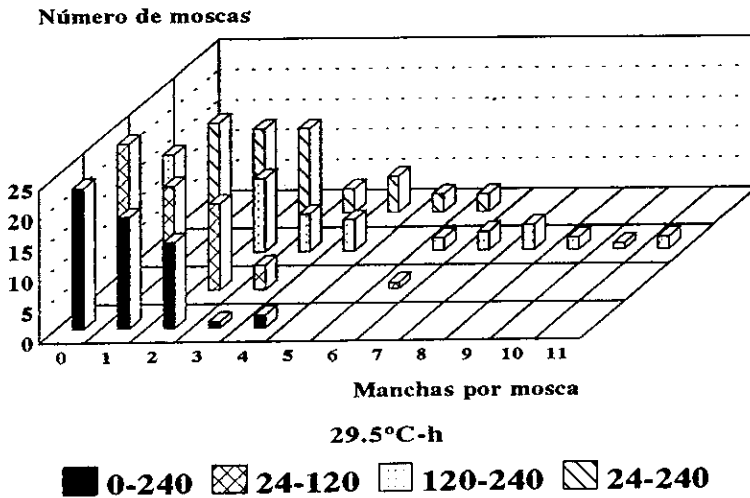


Fig. 15 a) Frecuencia de células por mancha y b) Manchas por mosca, inducidas por temperatura en diferentes etapas del ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* en organismos portadores de inversión.

abarcaron la metamorfosis la frecuencia de todos los tamaños de mancha se incrementó de manera notable.

La dispersión en la distribución del número de manchas por mosca no se modificó en las moscas expuestas durante la fase larvaria; fue mayor en el tratamiento de 120-240 h ($P < 0.01$), y la frecuencia de moscas con múltiples manchas se incrementó también en la fase postembrionaria ($P < 0.05$) (Fig. 15b).

En la figura 16 se compara la frecuencia corregida de manchas por ala en moscas libres de inversión (silvestres) y portadoras del cromosoma balanceador (*Ser*). La diferente constitución genética de las moscas analizadas permite estimar la participación de la recombinación a la respuesta encontrada. Los resultados indicaron que durante la fase larvaria el efecto de una temperatura superior no modificó la frecuencia de manchas en ambos tipos de moscas, sin embargo, en el período postlarvario (120-240 h) en ambas se obtuvo un incremento significativo, del que el 43 % es explicado a través de la recombinación y el 57 % restante puede adjudicarse a eventos no recombinogénicos; finalmente, cuando la exposición abarca el período postembrionario, la recombinación tiene una participación del 80 % y sólo se recobra un 20 % de eventos no recombinogénicos.

Arsénico

En la progenie transheterociga se analizó la inducción de manchas por dos sales de arsénico: arsenato y arsenito de sodio. Los compuestos se probaron a la temperatura óptima (25 °C) durante la fase larvaria, es decir, a partir de las 24 h de edad total que es el tiempo en el que emergen las larvas de primer estadio y hasta

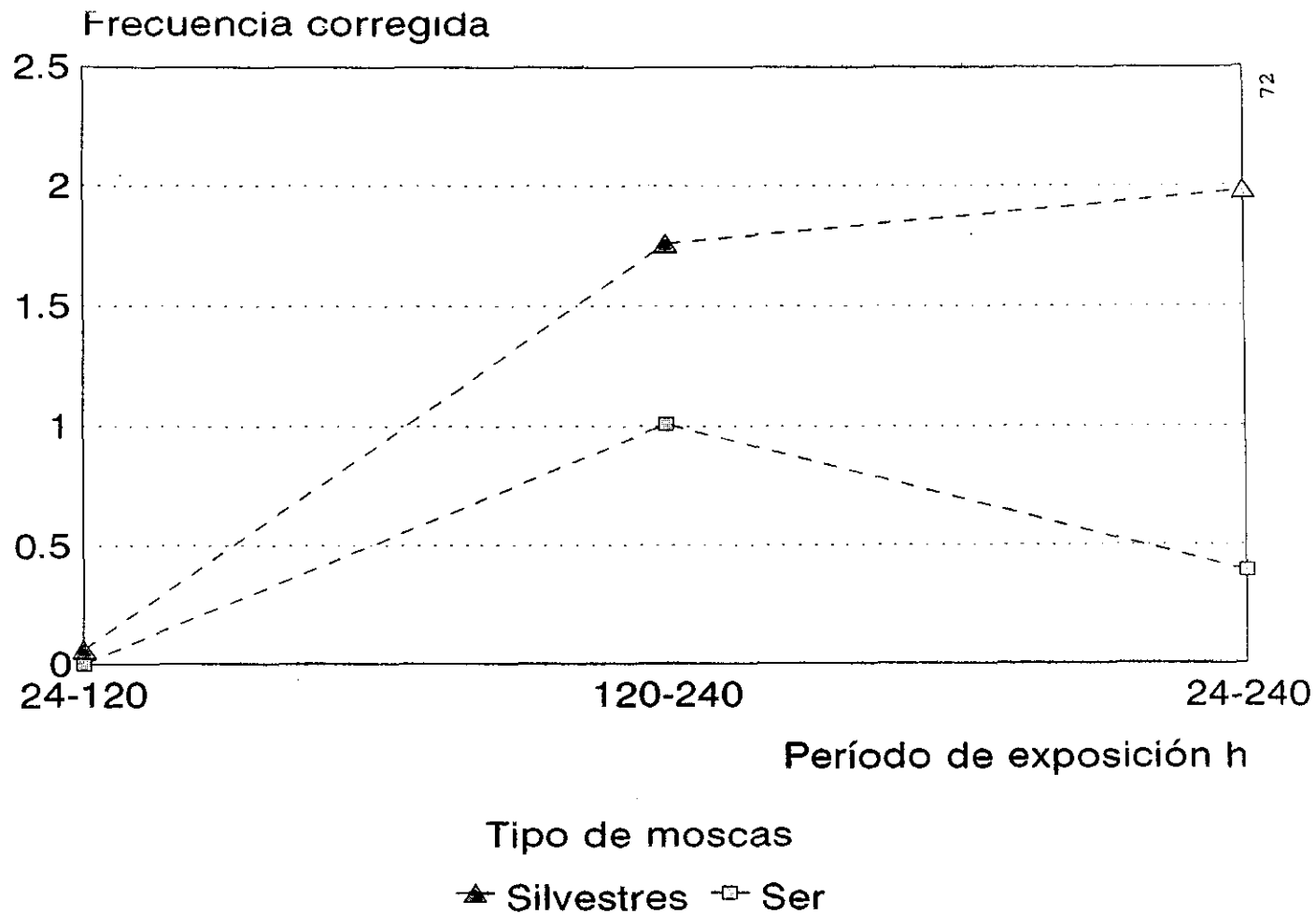


Fig. 16 Frecuencia de manchas corregida en moscas libres de inversión y portadoras del cromosoma balanceador (*Ser*).

las 120 h, momento en el que se induce la pupación, por lo que se interrumpe la exposición directa a los compuestos. Posteriormente se analizó el efecto de la exposición simultánea a cada uno de los compuestos manteniendo los cultivos a una temperatura superior durante el período de la exposición (29.5 °C).

Arsenato de sodio

La frecuencia de manchas totales se incrementó de manera significativa sólo a 0.2 ppm ($P < 0.05$); sin embargo, en todas las concentraciones la frecuencia de manchas formadas por 3 o más células aumentó de manera significativa pero sin correspondencia con la concentración administrada (Tabla V). La clase clonal promedio fue mayor en todas las series experimentales con respecto al testigo negativo. La frecuencia de formación de clones $\times 10^{-5}$ células no se modificó de manera importante.

La figura 17a muestra que la dispersión en la distribución del número de células por mancha fue mayor a la del lote testigo en todas las series experimentales, lo que concuerda con el valor de la clase clonal promedio, es decir, aunque sólo a 0.2 ppm hubo inducción significativa de manchas, en las demás concentraciones se recobraron más manchas grandes. Resulta notoria la aparición de manchas de gran tamaño (>32 y < 256 células), sólo en el caso del tratamiento durante toda la fase postembrionaria se recobró una mancha de más de 512 células, sin embargo esto no se repitió en los demás lotes, por lo que su aparición pudo haber sido aleatoria.

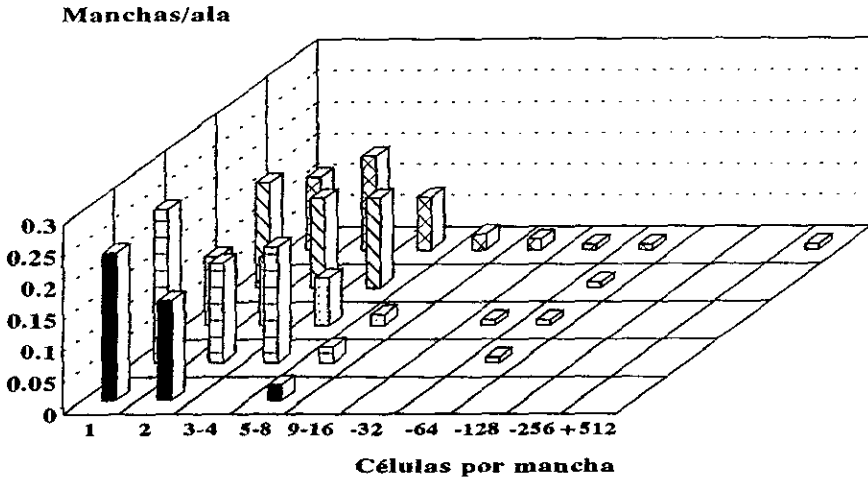
La dispersión en la distribución del número de manchas por

Tabla V. Número y frecuencia de manchas inducidas por tratamientos con Arsenato de sodio a larvas de primer estadio de *Drosophila melanogaster*.

Temp. °C	[ppm]	Núm. de alas	Manchas por ala (Número de manchas) Diagnóstico estadístico*				Núm. de clones mwh	Clase clonal prom.	Frecuencia de formación de clones X 10 ⁻⁴	
			Manchas simples chicas (1-2 Cels.) n=2	Manchas simples grandes (> 2 Cels.) n=5	Manchas gemelas n=5	Manchas totales n=2			obser- vada	corre- gida
25.0	0.0	120	47 (0.39)	0 (0.00)	3 (0.03)	50 (0.42)	50	1.44	1.7	
25.0	0.2	120	48 (0.40)-	25 (0.21)+	1 (0.01)-	74 (0.62)+	73	2.00	2.5	0.8
25.0	0.4	120	26 (0.22)-	12 (0.10)+	1 (0.01)-	39 (0.32)-	39	2.23	1.3	-0.4
25.0	2.0	120	37 (0.31)-	18 (0.15)+	0 (0.00)-	55 (0.46)-	55	2.04	1.9	0.2
25.0	6.0	120	32 (0.27)-	15 (0.12)+	3 (0.03)-	50 (0.42)-	50	2.42	1.7	0.0

* Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würgler, 1988 (no publicado): +, positivo; -, negativo; i, inconcluso; con un nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$.

a)



b)

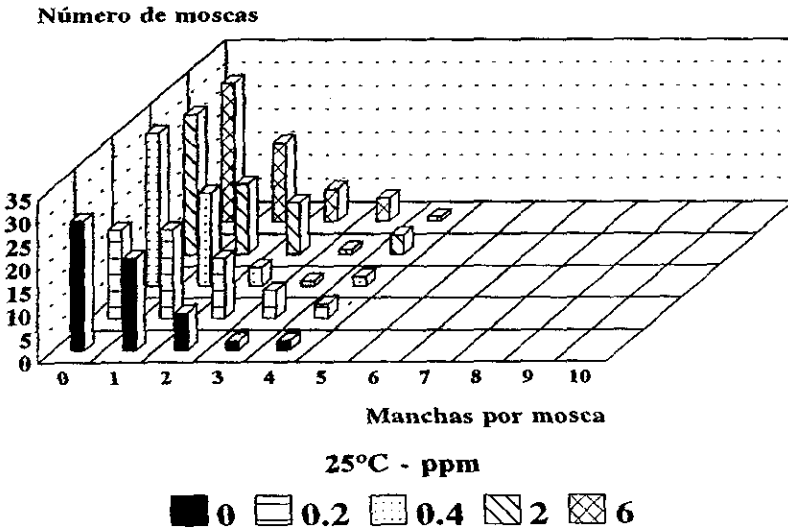


Fig. 17 a) Frecuencia de células por mancha y b) Manchas por mosca, inducidas por arsenato de sodio en larvas de segundo estadio de *Drosophila melanogaster*.

mosca resultó poco modificada ($P > 0.05$), aunque el número de manchas por mosca tendió a ser mayor en las series experimentales (Fig. 17b).

El cotratamiento con arsenato de sodio y una temperatura de 29.5 °C dio una respuesta diferente (Tabla VI), ya que comparadas con su testigo concurrente, ninguna de las series experimentales mostró una frecuencia de manchas por ala significativamente mayor y en el caso del lote tratado con 0.2 ppm que a 25 °C dio una respuesta significativa, ahora se recobró una frecuencia de manchas incluso menor a la del lote expuesto sólo a 29.5 °C. En todos los lotes la clase clonal promedio fue similar.

La dispersión de la distribución del número de células por mancha fue diferente a la del testigo concurrente incluso a 0.2 ppm, ya que en todos los lotes experimentales se obtuvieron manchas de mayor tamaño que las recobradas en ausencia de arsenato de sodio (Fig. 18a).

Al igual que en la distribución anterior, la dispersión en el número de manchas por mosca también cambió, sin embargo, llama la atención que el número de moscas que no presentan manchas se incrementó a 0.2, 0.8 y 2 ppm, además de que en todas las series experimentales aparecieron más moscas que presentaban mayor número de manchas (Fig. 18b).

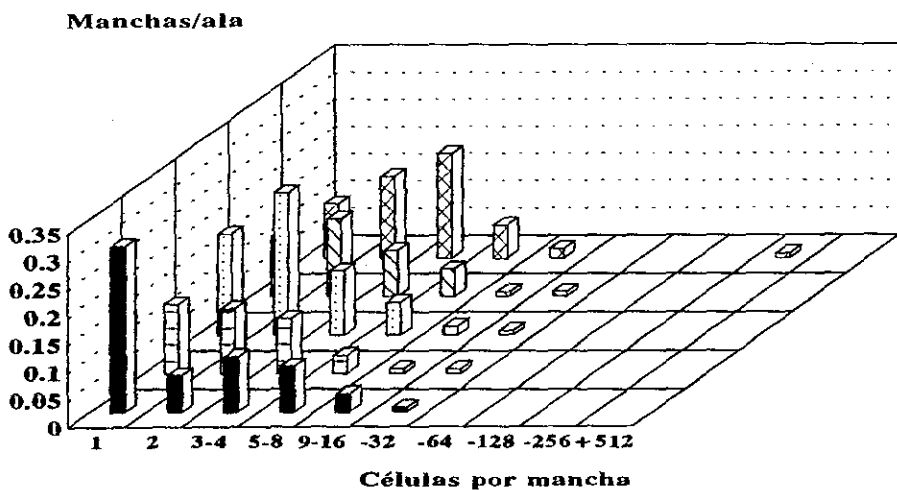
La figura 19 compara la frecuencia corregida de manchas por ala obtenidas en el tratamiento con arsenato de sodio a 25 °C y el cotratamiento a 29.5 °C. La frecuencia corregida se ha obtenido por la diferencia entre las frecuencias experimentales y la frecuencia

Tabla VI. Número y frecuencia de manchas inducidas por tratamientos con Arsenato de sodio más temperatura a larvas de primer estadio de *Drosophila melanogaster*.

Temp. °C	[ppm]	Núm. de alas	Manchas por ala (Número de manchas) Diagnóstico estadístico*				Núm. de clones mwh	Clase clonal prom.	Frecuencia de formación de clones X 10 ⁻⁴	
			Manchas simples chicas (1-2 cels.) n=2	Manchas simples grandes (> 2 cels.) n=5	Manchas gemelas n=5	Manchas totales# n=2			obser- vada	corre- gida
29.5	0.0	120	44 (0.37)	26 (0.22)	1 (0.01)	71 (0.59)	71	2.15	2.4	
29.5	0.2	120	29 (0.24) -	17 (0.14) -	1 (0.01) -	47 (0.39) -	47	2.23	1.6	-0.8
29.5	0.4	120	53 (0.44) 1	24 (0.20) -	0 (0.00) -	77 (0.64) -	57	2.20	2.6	0.2
29.5	2.0	120	30 (0.25) -	17 (0.14) -	1 (0.01) -	48 (0.40) -	48	2.29	1.6	-0.8
29.5	6.0	120	30 (0.25) -	34 (0.28) -	0 (0.00) -	64 (0.53) -	63	2.63	2.2	-0.3

* Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würgler, 1988 (no publicado): +, positivo; -, negativo; 1, inconcluso; con un nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$.

a)



b)

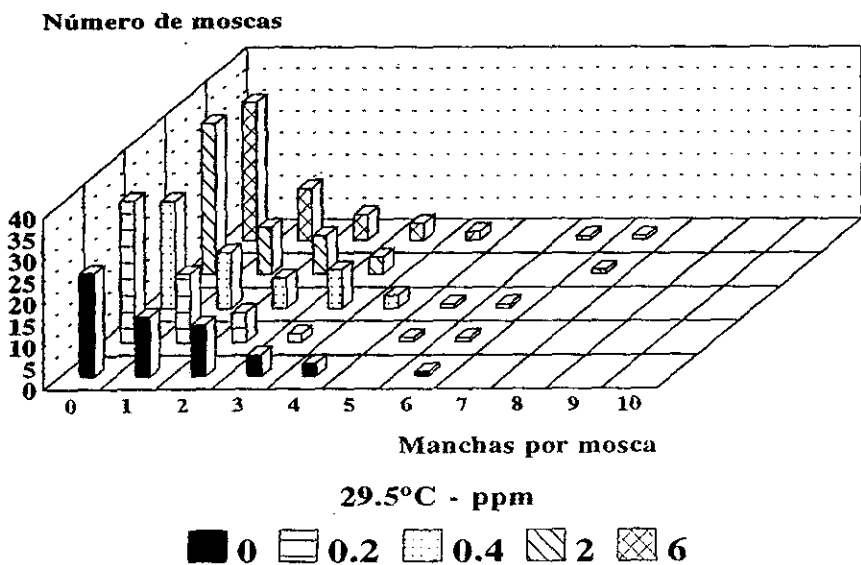


Fig. 18 a) Frecuencia de células por mancha y b) Manchas por mosca, inducidas por arsenato de sodio más temperatura.

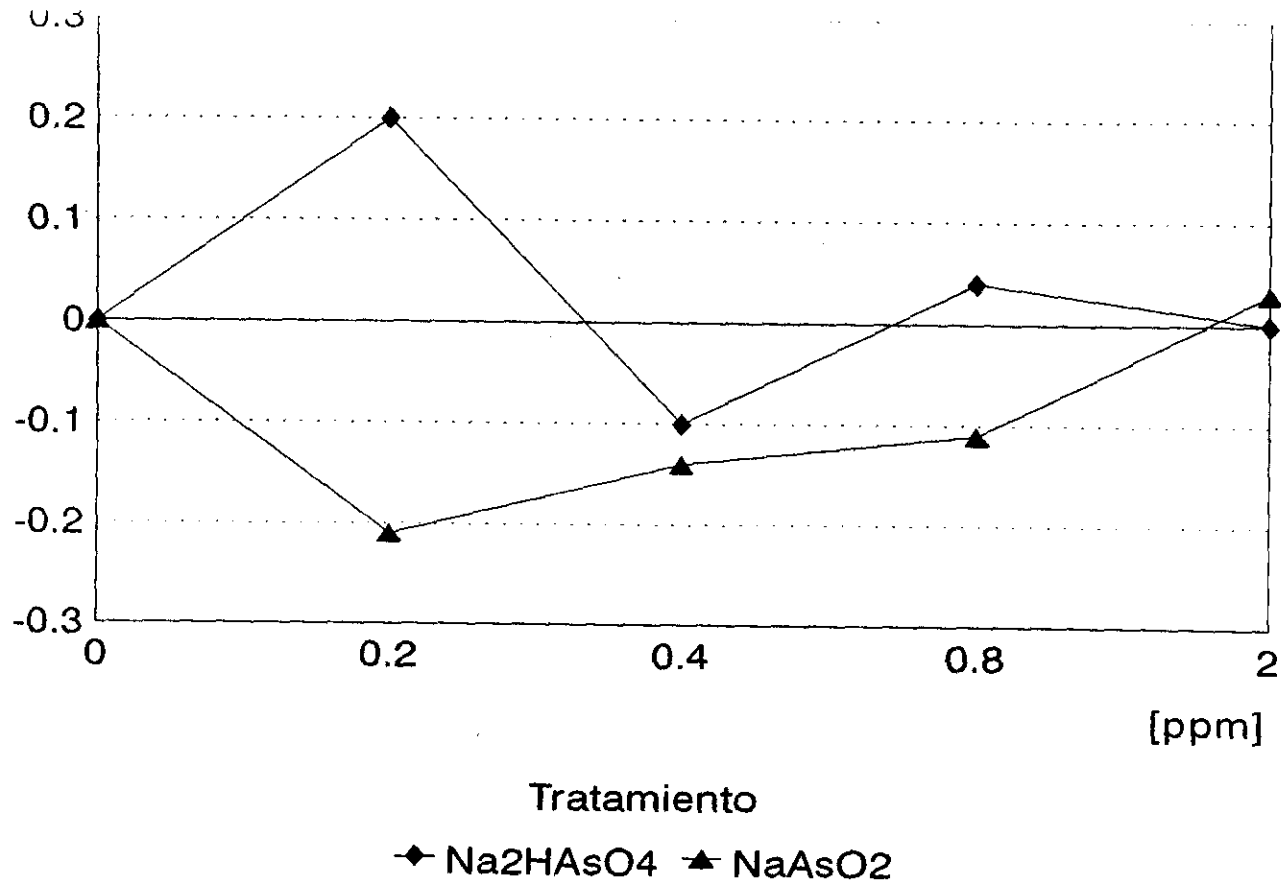


Fig. 23 Frecuencia corregida de manchas por ala recobradas en tratamientos con arsenato y arsenito de sodio a 25°C.

del testigo concurrente (25 o 29°C, respectivamente) El efecto significativo del tratamiento con 0.2 ppm de arsenato de sodio no se mantiene a 29.5 °C.

Arsenito de sodio

El tratamiento con el arsenito de sodio a 25 °C no incrementó la frecuencia de manchas totales en las series experimentales e incluso se obtuvieron frecuencias menores en presencia de 0.2 a 0.8 ppm (Tabla VII). Sin embargo, similar a lo ocurrido con el arsenato de sodio, la frecuencia de manchas grandes se incrementó de manera significativa en las moscas expuestas al arsenito (excepto a 0.4 ppm). La frecuencia de manchas chicas fue menor a la del testigo y no se registró efecto en la de manchas gemelas. La clase clonal promedio de las series expuestas al arsenito fue mayor a la del testigo.

La dispersión de la distribución del número de células por mancha mostró que la proporción de manchas formadas por 3 células o más se incrementó en relación con la concentración administrada (Fig. 20a).

La dispersión de la distribución del número de manchas por mosca mostró poca variación, aunque a partir de 0.8 ppm se recobró una mayor proporción de moscas con más de una mancha (Fig. 20b).

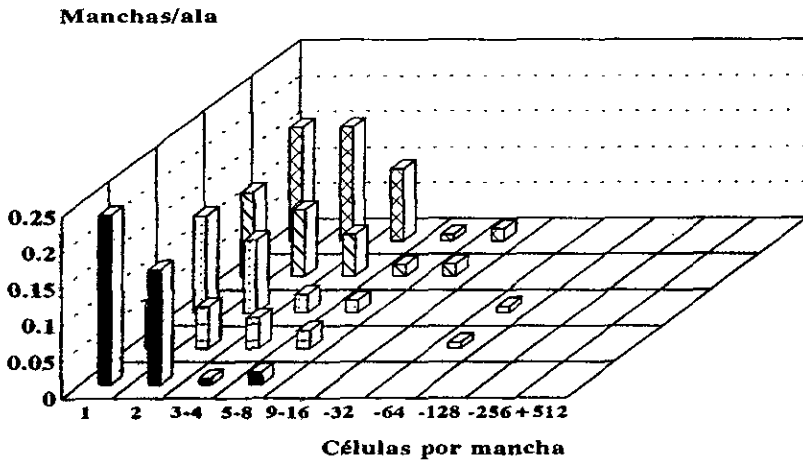
El cotratamiento con arsenito de sodio y temperatura (Tabla VIII) produjo una respuesta similar al cotratamiento con arsenato y temperatura. Comparada con el testigo concurrente, la frecuencia de manchas totales de los cotratamientos fue menor). En el

Tabla VII. Número y frecuencia de manchas inducidas por tratamientos con Arsenito de sodio a larvas de primer estadio de *Drosophila melanogaster*.

Temp. °C	[ppm]	Núm. de alas	Manchas por ala (Número de manchas) Diagnóstico estadístico*				Núm. de clones mwh	Clase clonal prom.	Frecuencia de formación de clones X 10 ⁻⁵	
			Manchas simples chicas (1-2 cels.) m=2	Manchas simples grandes (> 2 cels.) m=5	Manchas gemelas m=5	Manchas totales m=2			obser- vada	corre- gida
25.0	0.0	120	47 (0.39)	1 (0.01)	2 (0.02)	50 (0.42)	50	1.46	1.7	
25.0	0.2	120	15 (0.12)-	9 (0.08)+	1 (0.01)-	25 (0.21)-	25	2.56	0.9	-0.9
25.0	0.4	120	28 (0.23)-	6 (0.05)i	0 (0.00)-	34 (0.28)-	34	1.88	1.2	-0.5
25.0	0.8	120	25 (0.21)-	11 (0.09)+	1 (0.01)-	37 (0.31)-	37	2.22	1.3	-0.4
25.0	2.0	120	38 (0.32)-	15 (0.12)+	1 (0.01)-	54 (0.45)-	54	2.00	1.8	0.1

* Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würgler, 1988 (no publicado): +, positivo; -, negativo; i, inconcluso, con un nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$.

a)



b)

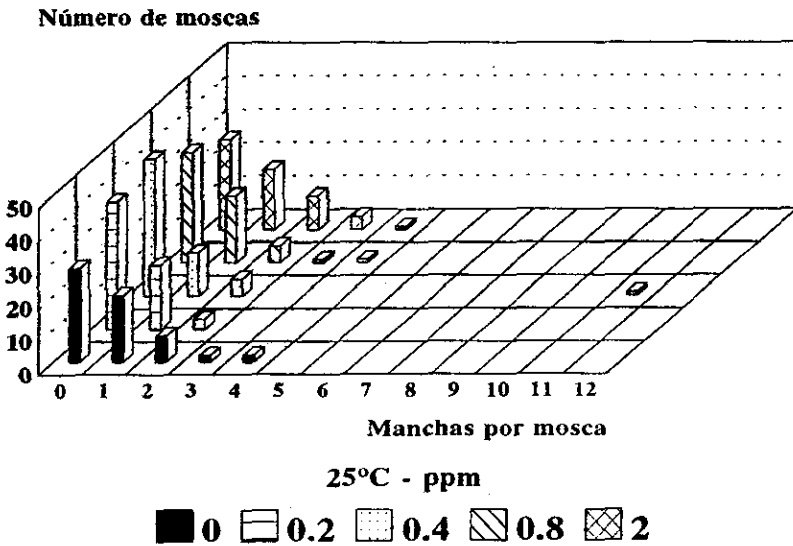


Fig. 20 a) Frecuencia de células por mancha y b) Manchas por mosca, inducidas por arsenito de sodio.

Tabla VIII. Número y frecuencia de manchas inducidas por tratamientos con Arsenito de sodio más temperatura a larvas de primer estadio de *Drosophila melanogaster*.

Temp. °C	[ppm]	Núm. de alas	Manchas por ala (Número de manchas) Diagnóstico estadístico*				Núm. de clones mwh	Clase clonal prom.	Frecuencia de formación de clones X 10 ³	
			Manchas simples chicas (1-2 cels.) m=2	Manchas simples grandes (> 2 cels.) m=5	Manchas gemelas m=5	Manchas totales m=2			obser- vada	corre- gida
29.5	0.0	120	44 (0.37)	26 (0.22)	1 (0.01)	71 (0.59)	71	2.15	2.4	
29.5	0.2	120	7 (0.06) -	9 (0.08) -	0 (0.00) -	16 (0.13) -	16	2.31	0.5 -1.9	
29.5	0.4	120	26 (0.22) -	18 (0.15) -	0 (0.00) -	44 (0.37) -	44	2.55	1.5 -0.9	
29.5	0.8	120	42 (0.35) -	18 (0.15) -	3 (0.03) -	63 (0.52) -	63	2.05	2.2 -0.3	
29.5	2.0	120	35 (0.29) -	9 (0.08) -	0 (0.00) -	44 (0.37) -	44	1.91	1.5 -0.9	

* Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würgler, 1988 (no publicado): +, positivo; -, negativo; i. inconcluso; con un nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$.

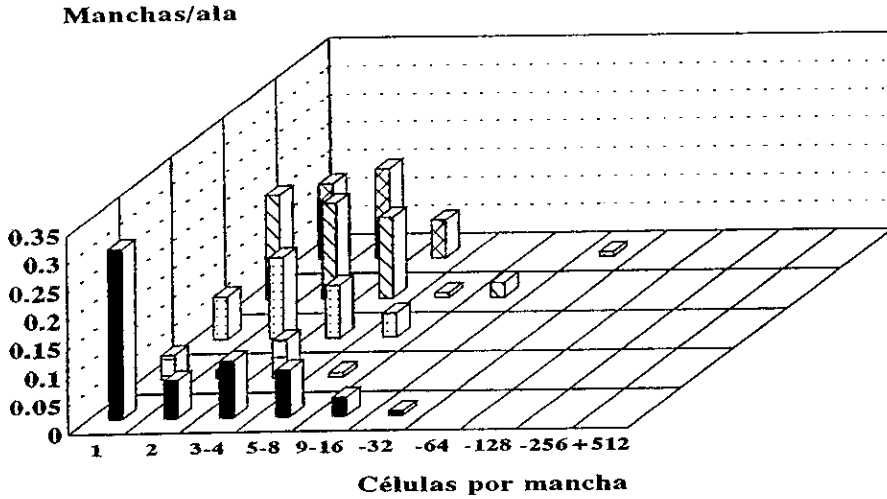
cotratamiento con 0.2 ppm de arsenito, la frecuencia de manchas de 1 a 2 células se redujo notoriamente, lo mismo ocurrió con la frecuencia de más de 3 células a 0.2 y 2 ppm. La clase clonal promedio fue similar a la del testigo concurrente.

La dispersión en la distribución del número de células por mancha fue diferente a la del testigo concurrente en todos los casos ya que en general, la proporción de manchas de 1 célula, que generalmente es mayor del 50 % del total de las manchas recobradas fue menor y la proporción de manchas de más de una célula se incrementó, sin embargo, se obtuvieron relativamente pocas manchas de gran tamaño (Fig. 21a).

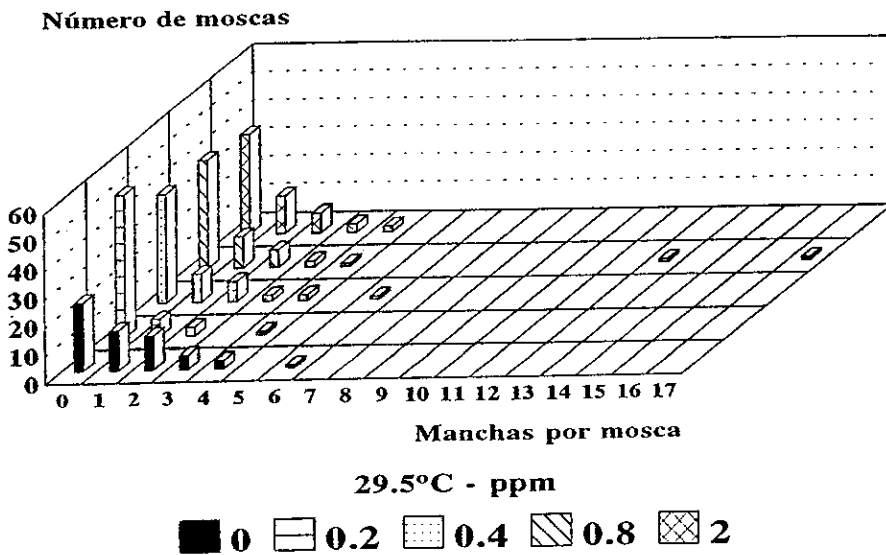
La dispersión de la distribución del número de manchas por mosca mostró una mayor proporción de moscas sin manchas que las presentes en el testigo concurrente y sólo en el cotratamiento con 0.8 ppm se recobraron moscas con 13 y 17 manchas sobre sus alas (Fig. 21b).

En la figura 22 se compara la frecuencia corregida de manchas por ala del tratamiento con arsenito de sodio a 25 °C y el cotratamiento a 29.5 °C. En el primero, la frecuencia de manchas fue menor a la del lote testigo incluso a 0.2 ppm, este efecto se hace más pronunciado en presencia de una temperatura no óptima ya que con excepción del lote a 0.8 ppm de arsenito de sodio, la frecuencia de manchas es menor a la del tratamiento sólo con arsenito de sodio.

a)



b)



21 a) Frecuencia de células por mancha y b) Manchas por mosca, ucidas por arsenito de sodio más temperatura.

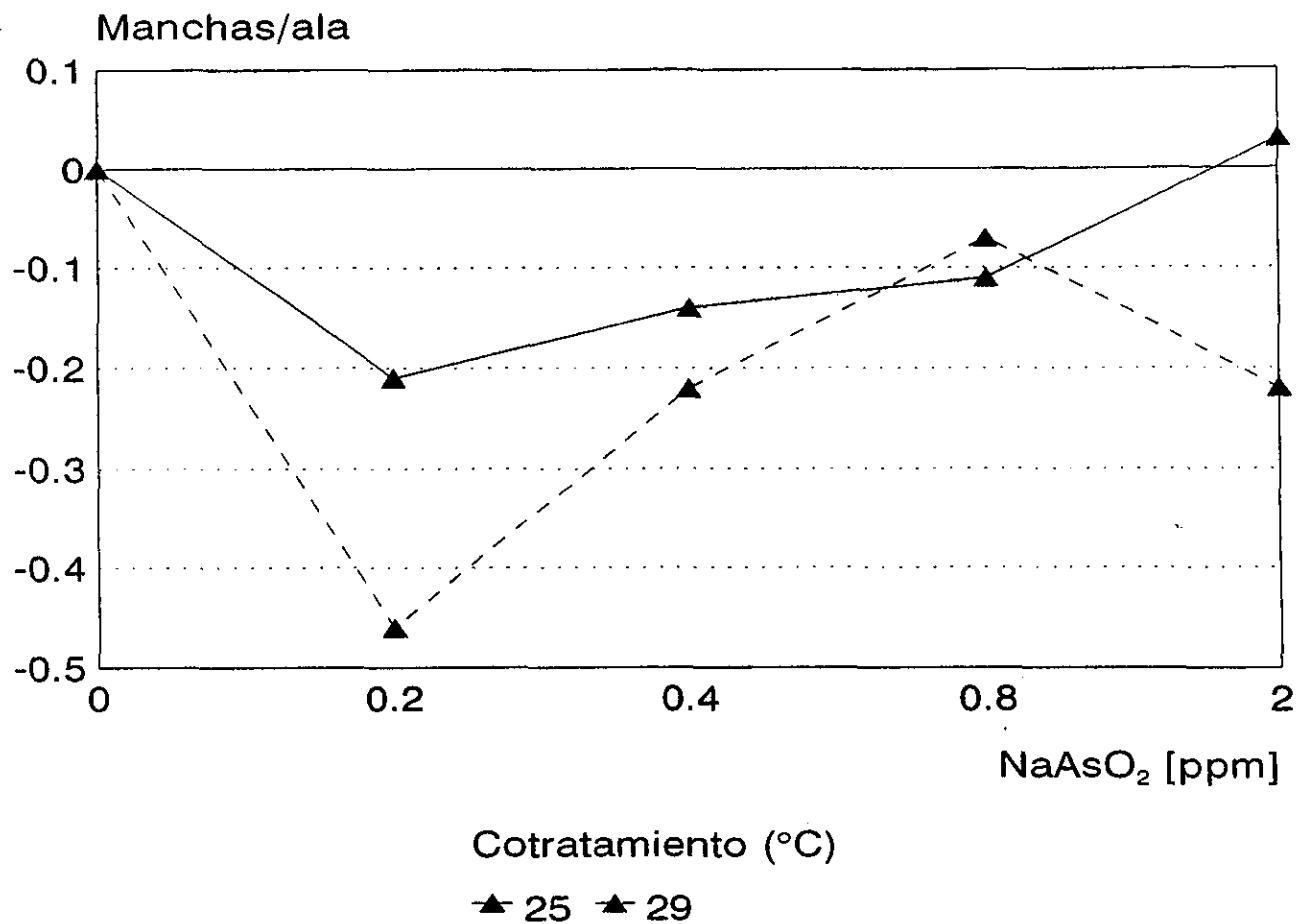


Fig. 22 Frecuencia de manchas por ala recobradas en cotratamientos con arsenito de sodio a 25 y 29°C.

DISCUSIÓN

La investigación enfocada a combatir o prevenir el cáncer ha explorado diversas alternativas y ha enfocado numerosos estudios que permiten vislumbrar los efectos y los mecanismos de acción de diferentes compuestos, como una alternativa que facilite, por un lado prevenir tales efectos, o bien, si ya se ha presentado algún tipo de alteración entonces encontrar la forma de combatirlos.

En forma paralela a la búsqueda de alternativas útiles en la terapia del cáncer se han desarrollado modelos biológicos que aceleren el análisis de compuestos con actividad mutagénica, carcinogénica, teratogénica, comutagénica, cocarcinogénica, antineoplásica etc, proporcionando información sobre estos compuestos con una inversión de tiempo y costo menores a los requeridos en sistemas de mamíferos. Además de los requisitos anteriores, un modelo debe reproducir los eventos biológicos relacionados con el desarrollo de procesos malignos.

La iniciación de procesos cancerosos se asocia con cambios en la información genética de las células afectadas, de manera que aproximadamente el 80 % de los compuestos carcinogénicos son además, mutágenos activos (Cairns, 1981). Otro de los eventos relacionados con la carcinogénesis es la capacidad de los compuestos químicos para inducir recombinación.

La prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) que utiliza las células de las alas de *Drosophila* fue propuesta originalmente como una alternativa para estudiar la actividad genotóxica de los diversos compuestos sobre las células somáticas

(Graf et al., 1984). A medida que se ha acumulado información relacionada con la sensibilidad y reproducibilidad de este sistema de prueba, se ha aceptado que con esta metodología se puede determinar de manera preliminar la genotoxicidad de sustancias pertenecientes a grupos diversos de compuestos químicos.

Además de los compuestos con clara actividad mutagénica y carcinogénica se han reportado otros factores que si bien no tienen un potencial genotóxico definido, actúan facilitando la acción de otros compuestos genotóxicos (comutágenos). Entre los compuestos que han sido considerados comutagénicos están el arsénico, el cadmio, el litio y el níquel, entre otros.

Los compuestos del arsénico alteran fuertemente la actividad de diversas enzimas. Los organoarsenicales y los compuestos inorgánicos (formas trivalentes) del arsénico se consideran reactantes primarios de sulfidrilo e inhiben sistemas enzimáticos dependientes del grupo tiol en varios tipos de tejidos. Evidencias epidemiológicas asocian a los compuestos del arsénico con ciertos tipos de cáncer, sin embargo, en estudios experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*, estos compuestos muestran un potencial cocarcinogénico, pero no mutagénico.

Además de la importancia inherente al tipo de compuestos involucrados, es también necesario considerar la participación de otros factores en el ambiente para la inducción de daño. Entre éstos se tiene a la temperatura que puede modificar la estabilidad y la persistencia de un compuesto químico (el tiempo en el cual el compuesto permanece en el ambiente sin sufrir cambio en su

composición y/o estructura), o bien, alterar a la maquinaria enzimática propia del organismo implicada en la desintoxicación (Vega, 1985).

Se han reportado diferentes factores tanto endógenos como exógenos que influyen en la inducción y progresión de un tumor. Entre otros parámetros se encuentra el estrés, el cual se ha reportado que modula la inducción y el crecimiento de tumores. Se ha concluido que el estrés es un parámetro firmemente establecido en la carcinogénesis (Vogel, 1995).

En este trabajo se probó el efecto de la temperatura sobre las células somáticas de las alas; en primera instancia se probó el efecto de una exposición aguda a una temperatura mayor a la óptima para el crecimiento de *Drosophila*; posteriormente se analizó el efecto de una exposición crónica y finalmente, en cotratamientos con dos compuestos de arsénico, uno de los cuales, el arsenito de sodio es considerado un claro inductor de estrés.

Efecto de la temperatura

Existen dos planteamientos principales que intentan explicar el efecto que puede ocasionar la temperatura en los organismos; 1) la temperatura es capaz de ocasionar alguna alteración al ADN y esta alteración puede ser fijada y transmitirse a la descendencia; y 2) la temperatura induce fenotipos similares a mutaciones conocidas (fenocopias) y estas alteraciones son únicamente a nivel de expresión.

Mitchell en 1975, propone que la producción de fenocopias esta

relacionada con efectos de estrés sobre la síntesis directa del ARN a través de la retroalimentación de la transcripción de proteínas de estrés térmico (HSP).

Santamaria en 1979, reporta que un estrés térmico de 37°C aplicado a embriones de *Drosophila* en estado de blastodermo induce fenocopias de algunos mutantes dominantes del complejo bitórax.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que la temperatura induce mutación y recombinación somática en células de las alas de *Drosophila*. El aumento en la frecuencia de manchas fue mayor conforme se incrementó la temperatura de los pulsos (29, 33 ó 38 °C). Un aspecto interesante en la respuesta recobrada fue que aunque la suma total de manchas no alcanzó valores significativos, al distinguir entre manchas chicas (de 1 a 2 células) y grandes (de más de 3 células), en las últimas se obtuvieron incrementos significativos a partir de 29 °C. Las moscas tratadas presentaron manchas en el intervalo de 65-128 células. De acuerdo con la edad de las larvas al momento del tratamiento (72 h) y el tiempo que transcurre hasta el término de la actividad mitótica, se esperan clones de hasta 512 células, lo que sugiere que las primeras manchas se originaron después de transcurrido un ciclo de división celular (8 h), aunque en la mayor parte de los tratamientos éstas se manifiestan claramente en clones de 1 a 32 células, probablemente como resultado de la reparación de las alteraciones inducidas. La aparición de clones de más de 3 células es sumamente importante porque implica que el tipo de daño que se recobra es heredable ya que las manchas grandes indican

proliferación celular. Aunque este resultado no descarta la producción de fenocopias como proponen Mitchell (1975) y Santamaria (1979), es relevante considerar que la exposición a temperaturas mayores a la óptima puede generar daño heredable, los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la idea que la temperatura induce daño que es transmitido a las siguientes generaciones. Cuando se utilizan dos pulsos consecutivos, separados por sólo 1 h a 25 °C, se recobró un efecto menor, es decir, aunque la frecuencia de manchas de los tratamientos a 29-33 y 33-38 °C fueron ligeramente mayores a la del testigo, son menores comparadas con las obtenidas en los tratamientos con un solo pulso a la misma temperatura (29, 33 ó 38 °C). El período entre la aplicación del primer y último pulso es de sólo 3 h, que es menor a la duración de un ciclo celular (8 h).

Se ha reportado que la mayoría de las células de casi todos los organismos responden al estrés térmico con la inducción de un grupo de proteínas a las cuales se les ha llamado proteínas de estrés térmico (HSP). La inducción de la síntesis de HSPs es acompañada por la suspensión de la síntesis de otras proteínas. Las células estresadas se comprometen con la mayoría de la maquinaria de biosíntesis macromolecular en la producción de estas proteínas. Tal compromiso garantiza que las HSPs aparezcan y confieran termotolerancia a las células que las están expresando (Ashbuner 1970; Lindquist 1986; Zimarino y Wu 1987).

Lo anterior podría explicar porqué el efecto fue menor al aplicar dos pulsos en un período de 3 h, ya que cuando se aplica el

segundo estímulo, las HSPs han incrementado ya su síntesis, con lo cual se protegería la célula del segundo pulso de temperatura. Una respuesta diferente se obtuvo al separar los dos pulsos por un período más largo. El tratamiento a 29-38 °C implica un intervalo de 5 h entre la aplicación del primer y el segundo pulso. En este tratamiento se incrementó de manera significativa la frecuencia de manchas chicas y grandes, y se registró el mayor efecto global de estos tratamientos. Lo anterior permite sugerir que si el efecto de dos pulsos consecutivos parece conferir termotolerancia a las células de las larvas expuestas, ésta podría tener una duración menor a 3 h, que es el tiempo que transcurre entre el término del primer pulso y el inicio del segundo. La eliminación del estado de respuesta al estímulo y el tiempo que transcurre hasta que el equilibrio celular se restaura, podría implicar un estado de sensibilidad celular de importancia en mutagénesis que haría a la célula particularmente vulnerable a la acción de otros mutágenos y comutágenos oportunistas.

La aplicación de tres pulsos consecutivos separados por un período de recuperación de 1 h apoyó los resultados anteriores, ya que aunque la frecuencia de manchas se incrementó de manera significativa (0.55), fue similar a la obtenida con los pulsos individuales: 0.47, 0.52 y 0.57 (con 29, 33 y 38 °C, respectivamente) y no alcanzó la obtenida en el tratamiento con dos pulsos no consecutivos (29 y 38 °C). Así, parece ser que la termotolerancia sí se indujo, aunque la aplicación de tres pulsos parece implicar una presión mayor. Como se muestra en la figura

13a, aunque en todos los tratamientos se registran manchas grandes, en los dos últimos se recobran en menor proporción y se incrementa la fracción de manchas de 1 célula.

La dispersión en la distribución de manchas por mosca es un indicador de la susceptibilidad individual de los organismos expuestos. El uso de diferentes organismos de la escala evolutiva ha indicado que mientras unos son particularmente susceptibles a la acción de mutágenos y carcinógenos, otros logran mantenerse sin alteraciones evidentes. Esto podría ser el resultado de la actividad metabólica, la eficiencia en reparación y otros aspectos relacionados con la dotación genética de los organismos expuestos. Cabe aclarar que aunque se utilizan cepas puras para los marcadores implicados en el estudio de la mutación y la recombinación somáticas, no se espera que sean idénticos para el resto del genoma, lo que es evidente en la respuesta diferencial observada en la figura 12b, ya que mientras algunas moscas presentan múltiples manchas en sus alas, otras no muestran alguna.

Por otro lado, la exposición crónica al estrés puede conducir en cierto tiempo a la adaptación, con la reducción gradual en la respuesta al estrés. En algunos casos el estrés crónico no produce cambios en su respuesta a éste. Contrariamente, el estrés crónico puede llevar a la sensibilización con un incremento en la respuesta al estrés por un tiempo excesivo (Vogel 1987). Esto puede llevar al desgaste de la maquinaria celular, la cual se satura cuando las células son enfrentadas consecutivamente a estrés térmico. Y entonces pueden generarse alteraciones.

Para analizar el efecto de una exposición mayor a una temperatura superior a la óptima se seleccionó la de 29.5 °C (temperatura en la que se estabilizó la estufa de cultivo), ya que con 29 °C se recobraron manchas grandes en una frecuencia significativa y no se observó pérdida de organismos como ocurrió con los otros tratamientos a temperaturas superiores a las indicadas (> 38 °C).

La exposición a 29.5 °C durante la fase larvaria (24-120 h) no tuvo efecto en la frecuencia de manchas chicas, incrementó significativamente el número de manchas grandes y no modificó la frecuencia de manchas gemelas. Sin embargo, al considerar todas las manchas, sólo se observó un pequeño incremento en la frecuencia de manchas (0.46) comparado con el testigo (0.40). La clase clonal promedio se incrementó indicando la aparición de manchas grandes (hasta 32 células).

La exposición durante la fase postlarvaria (120 a 240 h) es posterior al disparo de la metamorfosis por la hormona ecdisona y se marca por la migración de las larvas hacia una superficie con menor humedad en el frasco de cultivo, por lo que ya no ingieren alimento y muestran movimientos cada vez más lentos mientras se aproximan a la formación del *puparium*, estructura formada por la cutícula que las mantiene aisladas del exterior durante la metamorfosis. Se ha descrito que las últimas divisiones celulares transcurren después de la formación del *puparium*, es decir a las 144 h de edad total (Demerec, 1965; Szabad et al., 1983). Si esto es así, cabe suponer que en 24 h pueden transcurrir 3 ciclos

celulares de 8 h de duración, de manera que si a las 120 h se induce alguna alteración que cambie la información de las células en división, podrían obtenerse clones de 8 células, pero como las divisiones no son sincrónicas, no se descarta la posibilidad de recobrar clones de hasta 16 células.

El tratamiento durante la metamorfosis incrementó más de 4 veces la frecuencia de manchas chicas y más de 50 veces la de manchas grandes, no obstante, tampoco en este tratamiento se observó inducción de manchas gemelas. El incremento global fue de más de 5 veces la frecuencia basal. La clase clonal promedio se incrementó en consecuencia por el efecto de las manchas grandes y se obtuvo una frecuencia de inducción de clones $\times 10^{-5}$ de 8.8, lo que implica un claro efecto genotóxico. Curiosamente se registró la aparición de una mancha de mayor tamaño a lo esperado, sin embargo, este dato fue único por lo que no podría sugerirse un efecto mitogénico del tratamiento.

La aplicación de temperatura durante el período postembrionario completo (24 a 240 h), mostró una respuesta semejante al tratamiento anterior aunque se recobró una frecuencia mayor de manchas grandes (0.75) y una frecuencia total de 2.38, curiosamente no se incrementó la frecuencia de manchas chicas con respecto al tratamiento anterior. Al calcular el número de manchas que se esperarían bajo un modelo aditivo de los tratamientos durante la fase larvaria y la postlarvaria se encontró un déficit de manchas chicas (1.62) con respecto a las esperadas (1.99), lo que se explica porque las manchas chicas surgen durante las últimas

divisiones celulares por lo que realmente no se esperaría un incremento en su frecuencia en el tratamiento postembrionario. Con respecto a las manchas de más de 3 células, se recobraron más de las esperadas (0.75 y 0.61, respectivamente). El tamaño de estas manchas se ubicó en el intervalo de 33 a 64 células, lo que resulta interesante ya que sugiere que se originaron cuando las larvas tenían más de 120 h de edad. La frecuencia de inducción de clones $\times 10^{-5}$ células fue el mayor obtenido en todos los tratamientos (9.8).

Los datos obtenidos resultan interesantes porque indican que en general, la mayor parte de las manchas recobradas en la SMART (incluyendo las manchas recobradas en organismos no tratados) surgen principalmente después de las 120 h de edad, es decir, durante la histogénesis que se lleva al cabo en la metamorfosis y sólo en el caso de compuestos fuertemente genotóxicos se llegan a inducir manchas con origen más temprano. Así, como se ha mostrado por otros estudios, esta etapa del ciclo de vida resulta la más sensible y de interés en el estudio de la mutagénesis (Demerec, 1965; Wilkins 1986; Pomerai 1990).

Otro aspecto interesante es la nula inducción de manchas gemelas. Debe recordarse que estas manchas surgen por eventos de recombinación entre el marcador proximal (*flr*) y el centrómero, lo que señala a una zona principalmente heterocromática. Se ha propuesto que la temperatura es capaz de provocar alteraciones en la estructura del ADN las cuales son reparadas principalmente por recombinación (Munro et al, 1984; Desrosiers and Tanguay 1985;

Maldonado et al, 1993; Arcos et al, 1995); sin embargo, la prácticamente nula inducción de estas manchas sugiere que la recombinación en las zonas heterocromáticas participa poco en la reparación del daño inducido o bien, que estas zonas son menos afectadas, lo cual podría entenderse con base en la mayor compactación del ADN en estas regiones (Desrosiers et al, 1986).

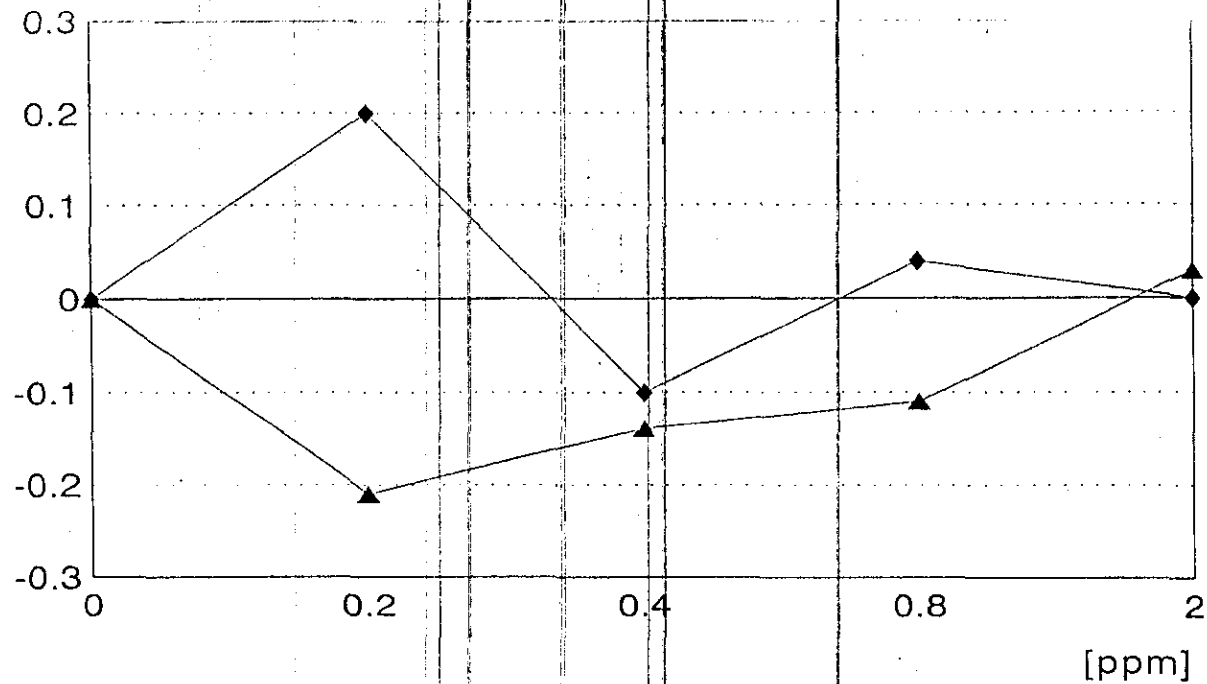
Al analizar el efecto de la temperatura en moscas portadoras de inversiones múltiples (*Ser*) debido la presencia del cromosoma balanceador (Fig. 16), se observó que al igual que en su contraparte silvestre, la exposición durante la fase larvaria no incrementó la frecuencia de manchas con respecto a su testigo concurrente; sin embargo, la exposición en la etapa postlarvaria produjo el máximo efecto en las moscas *Ser*, lo que apoya el hecho de que esta etapa es la más vulnerable en el desarrollo de la mosca. La contribución de la recombinación, estimada mediante la diferencia en la respuesta de ambos tipos de moscas indicó que sólo el 43 % de las manchas son producidas por eventos de naturaleza recombinogénica y el resto tienen un origen diferente, ya que el tamaño de las manchas fue también grande, puede decirse que la temperatura efectivamente produce alteraciones en el ADN que son heredables ya que se transmiten a las células hijas que forman un clon.

En la exposición durante la fase postembrionaria la respuesta fue diferente. Las moscas portadoras de inversiones sólo muestran el 20 % del total de eventos recobrados en las moscas libres de inversión. Una posibilidad es que en esta etapa las moscas

portadoras de inversión sean más sensibles ya que la demanda de la recombinación en la producción de manchas se incrementa, por lo que probablemente se estén perdiendo algunas de las células dañadas; esto no necesariamente resulta letal para la mosca ya que se ha determinado experimentalmente que las células que forman las alas pueden llevar al cabo divisiones celulares extras para cubrir la superficie de las alas (García Bellido y Merriam, 1971).

Efecto del arsénico

De las dos sales de arsénico, el arsenato a la concentración más baja (0.2 ppm) incrementó la frecuencia de manchas totales. El arsenito de sodio no tuvo un efecto significativo. En la figura 23 se comparan las frecuencias de manchas por ala recobrados en los tratamientos con las dos sales de arsénico. En comparación con el arsenato de sodio, la frecuencia de manchas de los lotes con arsenito de sodio son menores a la del testigo. Este resultado apoya el reportado por Ramos et al. (1995) en *Drosophila*, quienes encontraron que el arsenato de sodio resulta más genotóxico que el arsenito de sodio en exposiciones crónicas. Lo anterior es relevante porque gran parte de los estudios de mutagénesis han conferido una mayor actividad al arsenito de sodio, aunque en los estudios *in vivo* esta actividad no ha podido ser comprobada (Leonard y Lauwerys, 1980; IARC, 1987; Tripathy et al., 1990). Ramos y Rodríguez (1995) proponen que la gran toxicidad del arsenito de sodio es responsable de la baja actividad de este compuesto y han sugerido que su actividad puede ser principalmente como comutágeno.



Tratamiento
 ◆ Na_2HAsO_4 ▲ NaAsO_2

Fig. 23 Frecuencia corregida de manchas por ala recobradas en tratamientos con arsenato y arsenito de sodio a 25°C.

Además el arsenito de sodio ha sido calificado como un fuerte inductor de estrés ya que interfiere con la actividad de gran cantidad de enzimas e induce aproximadamente el 80 % de las hsp que se inducen en tratamientos con temperatura (Parker et al., 1987; Jedlicka et al., 1997), lo anterior explicaría parcialmente porqué la frecuencia de manchas de los lotes con arsenito es menor a la del testigo, esta actividad podría ser responsable de los reportes en los que se califica al arsenito de sodio como un antimutágeno (Leonard and Lauwers, 1980). Por su parte, el arsenato de sodio es menos tóxico por lo que penetra con mayor facilidad a los organismos y posteriormente es transformado a la forma As(III) en la que probablemente produce daño, no es considerado un inductor de estrés eficiente. La menor toxicidad del arsenato le ha restado importancia en los estudios de mutagénesis, sin embargo como ha sido mostrado en el caso de *Drosophila* por Ramos et al. (1995), su potencial mutagénico es mayor en exposiciones crónicas. En el presente estudio, se muestra que ambos compuestos son genotóxicos y capaces de inducir manchas de más de 3 células, por lo que el efecto resulta heredable y mayor en el caso del arsenato de sodio.

Se ha propuesto que el estrés térmico induce en las células el desarrollo de un estado transitorio de termotolerancia y en algunas situaciones también de quimiotolerancia, a través de la inducción de proteínas de estrés térmico (Lavoie et al., 1993). Landry y col. (1991) proponen que las HSP27 juegan un importante papel en el desarrollo de esta respuesta, como habilidad transitoria para sobrevivir. Además se ha reportado que las células de diferentes

organismos responden al estrés térmico con la inducción de la síntesis de un pequeño grupo de proteínas de estrés térmico, HSP cuya función es proteger a las células de este tipo de estímulos (Arrigo et al., 1980; Findly y Pederson 1981; Tanguay 1983; Lindquist, 1986; Parker et al., 1987). Por su parte, Jedlicka et al., (1997) proponen que los factores de transcripción del estrés térmico (HSF) tienen un papel esencial en la habilidad de los organismos para sobrevivir a un estrés térmico extremo.

Los cotratamientos con arsénico y temperatura arrojaron los resultados esperados, ya que ahora no se recobró inducción de algún tipo de mancha por el arsenato y el arsenito de sodio (Figs. 21 y 22). La frecuencia de manchas fue menor a la de sus testigos concurrentes y tampoco se indujeron manchas grandes en las concentraciones probadas. Las menores frecuencias de manchas por ala recobradas en el tratamiento con arsenito de sodio y temperatura indican que aunque ambos tratamientos son inductores de estrés, la respuesta inducida es diferente y mayor cuando se encuentran presentes ambos inductores (Leonard et al., 1980; Desrosiers et al., 1986; Tripathy et al., 1990).

Un aspecto que requiere ser probado experimentalmente es si la temperatura induce también quimiorresistencia, es decir, si confiere a los organismos expuestos mayor capacidad para tolerar concentraciones de compuestos que en otras condiciones resultarían letales.

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que el modelo *in vivo* de *Drosophila melanogaster* y la prueba de mutación

y recombinación somáticas constituyen una metodología sensible, versátil, económica y confiable para estudiar las interacciones entre varios compuestos de interés.

CONCLUSIONES

1. La temperatura *per se* induce mutación y recombinación somáticas en células de las alas de *Drosophila melanogaster*.
2. Las alteraciones inducidas en las células somáticas son de naturaleza heredable.
3. La exposición aguda a una temperatura elevada confiere termotolerancia a las células expuestas por un período menor a 3 h.
4. La sensibilidad a la exposición a una temperatura de 29.5 °C durante diferentes etapas del desarrollo postembrionario se encuentra en el orden: etapa postembrionaria > etapa postlarvaria > etapa larvaria.
5. En exposiciones crónicas a 25°C, el arsenato de sodio es más genotóxico que el arsenito de sodio.
6. En el estadio larvario la exposición prolongada a una temperatura superior a la óptima reduce el efecto genotóxico del arsenato y del arsenito de sodio.
7. El modelo *in vivo* de *Drosophila* es útil en el estudio del efecto residual del estrés y la inducción de termotolerancia y quimiotolerancia.

REFERENCIAS

ADLER, I. D. 1981. Comparative mutagenicity of mitomycin C. En: Comparative chemical mutagenesis (F. J. De Serres y M. D. Shelby, eds.) Plenum Press. Nueva York, pp. 993-1014.

ALLOWAY, B.J. Ed. 1990. Heavy metals in soils, Blackie, Londres, pp. 83-99.

AMES, B., W. Durston., E. Yamasaki y F. Lee. 1973. Carcinogens are mutagens; A simple test system combining liver homogenate for activation and bacteria for detection. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70(80): 2281-2285.

AMIN, J; J. Ananthan and R. Voellmy. 1988. Key features of heat shock regulatory elements. Mol. Cell Biol. 8: 3761-3769.

ANGELIDIS, C. E; I. Lazaridis and G. N. Pagoulatos. 1991. Constitutive expression of heat shock protein 70 in mammalian cells confers thermoresistance. Eur. J. Biochem. 199: 35-39.

ARRIGO, A.P. 1981. Study of the interaction of heat shock proteins in the chromatin of *D. melanogaster* tissue culture cells. Mol. Gen Genet. 180: 785-795.

ARRIGO, A. P. and A. Zadeh. 1981. Immunofluorescence localization of a small heat shock protein (hsp 23) in salivary gland cells of *Drosophila melanogaster*. Mol. Gen Genet. 184: 73-79.

ARRIGO, A.P. 1980. Investigation of the function of the heat shock proteins in *Drosophila melanogaster* tissue culture cells. Mol. Gen Genet. 178: 517-524.

ARRIGO, A. P. and Tanguay, R. M. 1991. Repression of hsp70 heat shock gene transcription by the suppressor of hairy-wing

protein of *Drosophila melanogaster*. Mol. Cell Biol. 11: 1894-1900.

ARRIGO, A. P; Fakan S; and Tissières A. 1980. Localization of the heat shock induced proteins in *Drosophila melanogaster* tissue culture cells. Dev. Biol. 78: 86-103.

ARRIGO, A. P. 1987. Cellular localization of hsp23 during *Drosophila* development and following subsequent heat shock. Dev. Biol. 122: 39-48.

ARRIGO, A. P. and D. Pauli. 1988. Characterization of hsp 27 and three immunologically related polypeptide during *Drosophila* development. Exp. Cell Res. 175: 169-183.

ASANO, M; H. Nagashima; Y. Iwakura and Y. Kawade. 1988. Interferon production under the control of heterologous inducible enhancers and promoters. Microbiol. Immunol. 32: 589-596.

ASHBURNER, M. 1970. Patterns of puffing in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. V Responses to environmental treatments. Chromosoma 31: 356-376.

ASHBURNER, M. and J. J. Bonner. 1979. The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. Cell. 17: 241-254.

AYME, A. and A. Tissieres. 1985. Locus 67B of *Drosophila melanogaster* contains seven, not four, closely related heat shock genes. EMBO J. 4: 2949-2954.

BERND, B. 1993. Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. Mol. Microbiology 9 (4): 671-680.

BEYER, H. 1987. Manual de química orgánica. Ed. Reverté. España, 287-289 pp.

BRUSICK, D. 1987. Principles of Genetic Toxicology, 2a. ed;

Plenum Press, Londres, pp. 69-129.

CAIRNS, J. 1981. The origin of human cancers. *Nature* 289: 353-357.

CAMATO, R. and R. M. Tanguay. 1982. Changes in the methylation pattern of core histones during heat-shock in *Drosophila* cells. *EMBO. J.* 1529-1532.

CARTER, S. K. y R. B. Livingston. 1976. Plant products in cancer chemotherapy. *Cancer Treat. Rep.* 60: 1141-1156.

CLAYSON, D. 1980. Comparison between *in vitro* and *in vivo* test for carcinogenicity. *Mutation Res.* 75: 205-213.

DE FLORA, S. y C. Ramel. 1988. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview. *Mutation Res.* 202: 285-306.

DELGADO, R. A. 1990. Daño inducido por mutágenos positivos en células de ala de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 75 pp.

DEMEREK, M. 1965. *Biology of Drosophila*. Hafner Publishing Co. Nueva York, 633 pp.

DE SERRES, F. J. 1979. Evaluation of test for mutagenicity as indicator of environmental mutagens and carcinogens. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 84: 75-84.

DESROSIERS R; and R. M. Tanguay. 1985. The modifications in the methylation patterns of H2B and H3 after heat shock can be correlated with the inactivation of normal gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133: 823-829.

DESROSIERS, R; and R. M. Tanguay. 1986. Further

characterization of the posttranslational modifications of core histones in response to heat and arsenite stress in *Drosophila*. *Biochem. Cell Biol.* 64: 750-757.

DURA, J. M. 1981. Stage dependent synthesis of heat shock induced proteins in early embryos of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen Genet.* 184: 381-385.

EBERLEIN, S. 1986. Stage specific embryonic defects following heat shock in *Drosophila*. *Dev. Genet.* 5: 179-197.

EBERLEIN, S. and K. H. Mitchell. 1987. Protein synthesis patterns following stage-specific heat shock in early *Drosophila* embryos. *Mol. Gen Genet.* 210: 407-412.

ELLIS, R. J. and S. M. Hemmingsen. 1989. Molecular chaperones proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. *Trends. Biochem. Sci.* 14: 339-342.

ELLIS, R. J. 1990. The molecular chaperone concept. *Seminars in Cell Biol.* 1: 1-9.

FINDLY, R. C. and T. Pederson. 1981. Regulated transcription of genes for actin and heat-shock proteins in cultured *Drosophila* cells. *J. Cell Biol.* 88: 323-328.

FISHBEIN, L. 1981. Sources, transport and alterations of metal compounds: An overview. I. Arsenic, Beryllium, Cadmium, Chromium, and Nickel, *Environ. Health Pers.* 40: 43-64.

FREI, H. y F. E. Würgler. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result, *Mutation Res.* 203: 297-308.

FREI, H. y F. E. Würgler. 1995. Optimal experimental desing and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. Mutation Res. 334: 247-258.

GAESTEL, M; R. Benndorf; K. Hayess; E. Priemer and K. Engel. 1992. Dephosphorylation of the small heat shock protein hsp25 by calcium/calmodulin-dependent (type 2B) protein phosphatase. J Biol. Chem. 267: 21607-21611.

GARCIA-Bellido, A. y J. R. Merriam. 1971. Parameters of the wing imagal disc development of *Drosophila melanogaster*. Dev. Biol. 24: 61-87.

GARCIA-Bellido, A. y J. Dapena. 1974. Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila melanogaster*, Molecular Genetics. 128: 117-130.

GARDNER, E. J. 1988. Principios de genética. Ed. Limusa. México. 551 pp.

GEORGOPOULOS, C. P. 1977. A new bacterial gene bacterial gene (groPC) which affects lambda DNA replication. Mol. Gen Genet. 151: 35-39.

GEORGOPOULOS, C.P; Georgiou M; Selzer G; and Eisen H. 1977. Bacteriophage T4 mutants which propagate on *E. coli* K12 but not on *E. coli*. B. Experientia 33: 1157-1158.

GEORGOPOULOS, C.P; Bisig R; Magazin M; Eisen H; and Court D. 1979. Novel bacteriophage lambda mutation affecting lambda head assembly. J. Virol. 29: 782-788.

GEORGOPOULOS, C. 1990. In stress proteins in Biology and

Medicine. Morimoto, R. Tissieres, A; and Georgopoulos, C (eds). Cold Spring Harbor Press, New York, pp. 191-222.

GOLDSCHMIDT, R. B. 1935. Gen und ausseengigenschaft (untersuchung an *Drosophila*). Z induct. Abstamm Vererbungsl 69: 38-131.

GLASER, R. L; M. F. Wolfner and J. T. Lis. 1986. Spatial and temporal pattern of hsp 26 expression during normal development. EMBO J. 5: 747-754.

GLOOR, H. 1947. Phenokopie-Versuche mit Aether an *Drosophila*. Rev. Suisse Zool. 54: 637-712.

GRAF, U. y F. E. Würgler. 1988. The sex-linked recessive lethal assay and recombination test in *Drosophila melanogaster*. En: Evaluation of short term test for carcinogens (J. Ashby et al. Eds.). Cambridge UK-WHO/Cambridge University Press. 2: 301-309.

GRAF, U., F. Würgler., A. Katz., H. Frei., H. Juan., C. Hall y P. Kale. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, Environ. Mutagen. 6: 153-188.

HAASS, C; U. Klein and P. M. Kloetzel. 1990. Developmental expression of *Drosophila melanogaster* small heat-shock proteins. J. Cell Sci. 96: 413-418.

HARTL, F.U. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature 381: 571-580.

HELLMAN, K. 1972. Anticancer drugs, Chem. Brit. 8: 69-72.

HIGHTOWER, L. E. 1980. Cultured animal cells exposed to amino acid analogues or puromycin rapidly synthesize several polypeptide. J. Cell Physiol. 102: 407-427.

HUBEL, A; J. H. Lee; C. Wu and F. Schoffl. 1995. *Arabidopsis* heat shock factor is constitutively active in *Drosophila* and human cells. *Mol. Gen Genet.* 248: 136-141.

IARC. 1979 b. Chemicals and industrial processes associated with cancer in humans, arsenic and certain arsenic compounds, in: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic risk of Chemicals to Humans. Suppl. 1, International Agency for Research on Cancer; Lyon. pp. 22-33.

IARC. 1987. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Overall evaluations of carcinogenicity, Vols. 1-42, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 100-106.

INDEX MERCK. 1989. Encyclopedia of chemical and drugs. Published by Merck and Co. 1606 pp.

IRELAND, R.C; E. Berger; K. Sirotkin; M. A. Yund; D. Osterbur and J. Fristrom. 1982. Ecdysterone induces the transcription of four heat-shock genes in *Drosophila* S3 cell and imaginal discs. *Dev. Biol.* 93: 498-507.

JACK, B; R. Jourdan and B. R. Jourdan. 1977. Structure and processing of precursor 5S RNA in *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.* 117: 785-795.

JEDLICKA, P; M. A. Mortin and C. Wu. 1997. Multiple functions of *Drosophila* heat shock transcription factor *in vivo*. *EMBO. J.* 16: 2452-2462.

KANEMATSU, N; M. Hara and T. Lada. 1980. Rec assay and mutagenicity studies on metal compounds. *Mutation Res.* 77: 109-116.

KELLY, P. M. and M. J. Schlessinger. 1978. The effect of amino

acid analogues and heat shock on gene expression in chicken embryos fibroblasts. *Cell* 15: 1277-1286.

KOREN, H. 1991. *Handbook of Environmental Health and Safety. Principles and Practices*, Lewis Publishers, 2a. ed. Vol I, pp 109, 147-148, 243-244, 252, 449, 457.

LANDRY, J; P. Chretien; D. Bernier; L. M. Nicole; N. Marceau and R. M. Tanguay. 1982. Thermotolerance and heat shock proteins induced by hyperthermia in rat liver cells. *Int. J Radiat Oncol Biol. Phys.* 8: 59-62.

LANDRY, J; P. Chretien; H. Lambert; e. Hickey and L. A. Weber. 1989. Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. *J. Cell Biol.* 109: 7-15.

LANDRY, J; P. Chretien; A. Laszlo and H. Lambert. 1991. Phosphorylation of HSP27 during development and decay of thermotolerance in chinese hamster cells. *J. Cell Physiol.* 147: 93-101.

LARRAMENDY, M. L; N. C. Popescu and J. A. DiPaolo. 1981. Induction by inorganic metal salts of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in human and Syrian hamster cell strains. *Environ. Mutagen.* 3: 597-606.

LAVOIE, J. N; G. Gingras-Breton; R. M. Tanguay and J. Landry. 1993. Induction of Chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. HSP27 stabilization of the microfilament organization. *J. Biol. Chem.* 268: 3420-3429.

LAWRENCE, P. A. 1992. *The making of a fly: The genetics of animal design.* Blackwell Scientific Publications. Londres. pp. 78-

LEONARD, A; and R. R. Lauwerys. 1980. Carcinogenicity teratogenicity and mutagenicity of arsenic. *Mutation. Res.* 75: 49-62.

LEWIS, M; P. J. Helmsing and M. Ashburner. 1975. Parallel changes in puffing activity and patterns of protein synthesis in salivary glands of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 3604-3608.

LINDSLEY, D. L., y G. G. Zimm. 1992. *The genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego California. pp. 1-491.

LINDQUIST, S. 1986. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem.* 55: 1151-1191.

LIS, J. T. and C. Wu. 1994. In Conaway R. C. and Conaway J. W. (eds). *Transcription: Mechanisms and Regulation*. Raven Press. New York. N.Y. pp. 459-475.

LOPRIENO, N. 1980. General principles of genetic toxicology and methods for mutagenesis assessment. En: *The principles and methods in modern toxicology*. (C.l. Galli; S.D. Murphy y R. Paoletti, Eds.), Elsevier, Holanda.

LORIMER, G. H. 1996. Aquantitative assessment of the role of the chaperonin proteins in protein folding *in vivo*. *The FASEB J.* 10: 5-9.

MALDONADO, C. G; S. Llamazares and D. M. Glover. 1993. Heat shock results in cell cycle delay and synchronisation of mitotic domains in cellularised *Drosophila melanogaster* embryos. *J. Cell*

Sci. 105: 711-720.

MANAHAN, S.E. 1984. Environmental Chemistry, Willard Grant Press, 4a. ed. Boston, pp. 506-508.

MANAHAN, S.E. 1991. Environmental Chemistry, Lewis Publishers, 5a. ed. USA, pp. 148, 152, 493-499, 504.

MAROTO, F.G. and J. M. Sierra. 1988. Translational Control in heat-shocked *Drosophila* Embryos. Evidence for the inactivation of initiation factor(s) involved in the recognition of mRNA Cap structure. J. Biol. Chem. 263, 30: 15720-15725.

MASON, P.J; L. M. Hall and J. Gausz. 1984. The expression of heat shock genes during normal development in *Drosophila melanogaster*. Mol. Gen Genet. 194: 73-78.

MCKENZIE, S.L; S. Henikoff and M. Meselson. 1975. Localization of RNA from heat-induced polysomes at puff sites in *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72: 1117-1121.

MITCHELL, H. K. and L. S. Lipps. 1975. Rapidyl labeled proteins on the salivary gland chromosomes of *Drosophila melanogaster*. Biochem. Genet. 13: 585-602.

MITCHELL, H. K. and L. S. Lipps. 1978. Heat shock and phenocopy induction in *Drosophila*. Cell. 15: 907-918.

MILLER, M. J; X. Nguyen-Huu and E. P. Geiduschek. 1979. A response of protein synthesis to temperature shift in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 5222-5225.

MUNRO, S. and H. R. Pelham. 1984. Use of peptide tagging to detect proteins expressed from cloned genes: deletion mapping

functional domains of *Drosophila hsp70*. EMBO J. 3: 3087-3093.

MUNRO, S. and H. R. Pelham. 1985. What turns on heat shock genes? Nature 317: 477-478.

MUÑOZ, M. J. A. 1994. Caracterización del potencial genotóxico y protector de *Ipomoea orizabensis* en células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 65 pp.

MUÑOZ, M. J. A. y P. M. Ramos. 1995. Estudio comparativo del potencial protector de tres resinas del género *Ipomoea* en la prueba de mutación y recombinación somáticas de *Drosophila melanogaster*. Memorias del VI Congreso Nacional de Genética, Xalapa, Ver. México. pp. 141-142.

MOUTSCHEN, J. 1985. Introduction to genetic toxicology. John Wiley and Sons. Nueva York. 184 pp.

NEIDHARDT, F. C; R. A. VanBogelen and V. Vaughn. 1984. The genetic and regulation of heat-shock proteins. Ann. Rev. Genet. 18: 295-329.

NISHIOKA, H. 1975. Mutagenic activities of metal compounds in bacteria. Mutation Res. 31: 185-189.

NÖTHIGER, J. 1970. Sucrose density separation: a method for collecting large numbers of *Drosophila* larvae, Dros. Inf. Ser. 45:177.

NOUSO, K; S. S. Thorgerirsson and N. Battula. 1992. Stable expression of human cytochrome P450IIE1 in mammalian cells: metabolic and formation of aducts with cellular DNA. Cancer Res. 52 (7): 1796-1800.

NOVER, L. (ed.). 1984. Heat shock Response of Eukaryotic Cells, Veb. Georg. Thieme, Leipzig.

O'DONNELL, J; L.Gerace; F. Leister and W. Sofer. 1975. Chemical selection of mutants that affect alcohol dehydrogenase in *Drosophila* II. Use of 1-pentyne-3-ol. *Genetics* 79: 73-83.

OHNO, H; F. Hanaoka and M. Yamada. 1982. Inducibility of sister-chromatid exchanges by heavy-metals ions. *Mutation Res.* 104: 141-145.

PARKER, T. J. and J. J. Bonner. 1987. Mutations that induce the heat shock response of *Drosophila*. *Cell* 51: 763-772.

PÁEZ, S. Y. 1996. Calibración del protocolo para evaluar antimutágenos en la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en alas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. UNAM. México. 66 p.

PELHAM, H.R. B. 1982. A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* Hsp 70 heat-shock gene. *Cell* 30: 517-528.

PETERSEN, N. S. and Mitchell, H. K. 1991. Environmentally Induced Development Defects in *Drosophila*. En: Heat Shock and Development. Higtower L. and Nover L. (Eds). Springer-verlag. Germany. 29-43.

PETKO, L. and S. Lindquist. 1986. Hsp26 is not required for growth at high temperatures; nor for thermotolerance; spore development; or germination. *Cell* 45: 885-894.

POMERAI, D. D. 1990. From gene to animal: An introduction to the molecular development. Cambridge University Press. 2 ed. Nueva York. 417 pp.

PRATT, W. y M. Ruddon. 1979. The anticancer drugs. Nueva York Oxford University Press. Nueva York. 323 pp.

RADMAN, M. y A. Kinsella. 1980. Chromosomal events in carcinogenic initiation and promotion: Implications for carcinogenicity testing and cancer prevention strategies. En R. Montesano, H. Bartsch, L. Tomatis (Eds.): Molecular and Cellular Aspects for Carcinogen; Lyon, pp. 75-90.

RAMEL, C. 1986. Deployment of short-term assays for the detection of carcinogens: genetic and molecular considerations. Mutation Res. 168: 327-342.

RAMOS, M. P., M. H. M. Abundis., O. J. C. Gaytan., T. M. G. Ordaz., S. P. G. Orozco., L. J. Maldonado., A. J. Hernández., C. E. González., M. P. Reyes., M. E. M. Galicia y M. A. Muñoz. 1993. Manual de laboratorio de genética para *Drosophila melanogaster*. Mc Graw-Hill. México. 131 pp.

RAMOS, M. P. 1994. Efectos genotóxicos de algunas sales de arsénico en *Drosophila melanogaster*. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. UNAM. 142 pp.

RAMOS, M. P. and A.R. Rodríguez. 1995. Genotoxicity of two arsenic compounds in germ cells and somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Environ Mol Mutagen 25: 288-299.

RAMOS, M. P; M. G. Ordaz; J. Maldonado; J. A. Muñoz; E. González; Y. Páez. 1995. "Genotoxic Effects of Sodium Arsenite and Sodium Arsenate After Chronic exposure of *Drosophila melanogaster* Larvae". En: Environmental Mutagen Society 26th Annual Meeting. San Louis, Missouri. USA, marzo 12-16 .

RAMOS, M. P; M. G. Ordaz; J. Maldonado; J. A. Muñoz; E. González; H. M. Abundis, P. A. Campos; M. Martínez; Y. Páez; M. J. Islas; J. C. Gaytan; P. G. Orozco; B. R. Hernández; A. Y. Dorantes; H. Rivas; A. Muñoz and I. Jiménez. 1996. Lab. de Genética, Fac. de Ciencias, UNAM. 4o. Congreso conjunto de las Sociedades Mexicanas de Genética y Toxicología Genética. Septiembre 29 - Octubre 3 de 1996. Aguascalientes, Aguascalientes. México.

RITOSSA, F. M. 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18: 571-573.

RITOSSA, F. M. 1964a. Behavior of RNA and DNA synthesis at the puff level in salivary gland chromosomes of *Drosophila*. *Exp. Cell Res.* 36: 515-523.

RITOSSA, F. M. 1964b. Experimental activation of specific loci of polytene chromosomes of *Drosophila*. *Exp. Cell Res.* 35: 601-607.

ROBERTS, D. B. 1986. *Drosophila* a practical approach. IRL Press. Oxford. England. 295 p.

RODIONOV A.N; R.I. Kalendarev, G.V. Tchikvaidze y J.A. Eiduss. 1979. A new phase in solid state arsenic, *Nature* 281: 10.

RUSSELL, P. J. 1992. *Genetics*. Harper Collins Publishers. New York. pp. 543-551.

SANDALTZOPOULOS, R; C. Mitchelmore; E. Bonte; G. Wall and P. B. Becker. 1995. Dual regulation of the *Drosophila* hsp26 promoter in vitro. *Nucleic Acids Res.* 23, 13:2479-2487.

SANTAMARIA, P. 1979. Heat shock induced phenocopies of dominant mutants of the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen Genet.* 172: 161-163.

SCHLESINGER, R.J; M. Ashburner and A. Tissières (eds.) 1982. Heat shock: From bacteria to man, Cold spring. Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

SIMCOX, A. A; C. M. Cheney; E. P. Hoffman and A. Shearn. 1985. A deletion of the 3' end of the *Drosophila melanogaster* hsp 70 gene increases stability of mutant mRNA during recovery from heat shock. Mol. Cell Biol. 5: 3397-3402.

SIROTKIN, K. and N. Davidson. 1982. Developmentally regulated transcription from *Drosophila melanogaster* site 67B. Dev. Biol. 89: 196-210.

SOLOMON, J. M; Rossi J.; Golic M; McGarry T; and Lindquist S. 1991. Changes in hsp70 alter thermotolerance and heat shock regulation in *Drosophila*. New Biologist. 3: 1106-1120.

SORGER, K. and H. C. Nelson. 1989. Trimerization of a yeast transcriptional activator via a coiled coil motif. Cell 59: 807-813.

SPRADLING, A; M. L. Pardue and S. Penman. 1977. Messenger RNA in heat shocked *Drosophila* cells. J Mol Biol. 109: 559-587.

STEPHANIE, W; S. Hensse; C. Keitel; C. Elsner and B. Wittig. 1983. Heat shock gene expression is regulated during teratocarcinoma cell differentiation and early embryonic development. Dev. Biol. 96: 507-514.

STOCK, J. A. 1970. Chemoterapy of cancer. Chem. Brit. 6 (1): 11-16.

STOKINGER, H.E. 1981. The metals, En: Patty's industrial hygiene and toxicology, Clayton G.D. y F. E. Clayton Eds; John

Wiley & Sons, 3a. ed. Nueva York, pp. 1517-1531.

SZABAD, J; I. Soós; G. Polgár and G. Héjja. 1983. Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mosaic and the sex-linked recessive lethal test, Mutation Res. 113: 117-133.

TANGUAY, R. M. 1983. Genetic regulation heat shock and function of heat-shock proteins: a review. Can. J. Biochem. Cell Biol. 61: 387-394.

TIMBRELL, J. A. 1989. Introduction to toxicology. Taylor and Francis Ltd. USA. 155 pp.

TISSIERES, A; H. K Mitchell and U. M. Tracy. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. J Mol Biol. 84: 389-498.

TRIPATHY, N. K; F. E. Wurgler and H. Frei. 1990. Genetic toxicity of six carcinogens and six non-carcinogens in the *Drosophila* wing spot test. Mutation Res. 242: 169-180.

TSE-DINH, Y. C; H. Qi and R. Menzel. 1997. DNA supercoiling and bacterial adaptation: thermotolerance and thermoresistance. Trends Microbiol. 5: 323-326.

VANDER, S. A; C. Rommel; E. Dickson and E. Hafen. 1997. The heat shock protein 83 (Hsp83) is required for Raf-mediated signalling in *Drosophila*. EMBO J. 16: 1961-1969.

VAN-DONGEN, G; W. L. Geilenkirchen; J. Van-Rijn and R. Van-wijk. 1986. Increase of thermoresistance after growth stimulation of resting Reuber H35 hepatoma cells. Alteration of nuclear characteristics, non-histone chromosomal protein phosphorylation

and basal heat shock protein. *Exp. Cell Res.* 166: 427-441.

VEGA, A. S. 1985. Evaluacion epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales, Toxicología IV, Carcinogénesis química; Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Organización Mundial de la Salud. 10:1-47.

VIGUE, C. and W. Sofer. 1976. Chemical selection of mutants that affect ADH activity in *Drosophila*. III. Effects of ethanol. *Biochem. Genet.* 14: 127-135.

VOGEL, E. W. 1987. Somatic cell mutagenicity in *Drosophila melanogaster* in comparison with genetic damage in early germ cell states. *Mutation Res.* 180: 189-200.

VOGEL, E. W. 1991. Genotoxic chemicals an introduction into basic principles of genetic toxicology. Laboratorium voor Stralengenetica en Chemische Mutagenese, R.U. Leiden Sylvius Laboratoria. 66 pp.

VOGEL, E. W. 1992. Genotoxic chemicals an introduction into the basic principles of genetic toxicology. Laboratorium voor Stralengenetica en Chemische Mutagenese. RU Leiden, Sylvius Laboratoria. (Curso).

VOGEL, E. W. y F. H. Sobels. 1976. The function of *Drosophila* in genetic toxicology testing. En: Chemical mutagens, principles and methods for their detection. (A. Hollander Ed.), Plenum Press, Nueva York, Vol. 4. pp. 93-142.

VOGEL, E. W. y A. Szakmary. 1990. Basic principles and evaluation of results of assay measuring genotoxic damage in somatic cells of *Drosophila*. En: Mutation and the environment.

Part. B, pp 149-158.

VOGEL, E. W. y J. A. Zijlstra. 1987. Mechanistic and methodological aspects of chemically-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 182: 243-264.

VOGEL, E. W., Blijleven., P. Klapwijk y J. Zijlstra. 1980. Some current perspectives of the application of *Drosophila* in the evaluation of carcinogens. En: G.M.Williams; R. Kroes; H. Waaijers y K. Van de Poll (Eds.) *The Predictive value of short-term Screening Test in Carcinogenicity*. Elsevier, Amsterdam, pp.125-147.

VOGEL, W. H. 1995. Effect of stress on tumor induction. In: *Chemical Induction of Cancer. "Modulation and Combination Effects. An Inventory of the Many Factors. Which Influence Carcinogenesis"*. (eds). Arcos J. C; Argus M. F. and Woo Y. Birkhäuser. Boston . pp 627-631.

XIAO, H. and J. T. Lis. 1989. Heat shock and developmental regulation of the *Drosophila melanogaster* hsp83 gene. *Mol. Cell Biol.* 9: 1746-1753.

WATERS, M. D., A. L. Brady., H. F. Stack y H. E. Brokman. 1990. Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutation Res.* 238: 57-85.

WEBER, J. A. and D. S. Gilmour. 1995. Genomic footprinting of the hsp70 and histone H3 promoters in *Drosophila* embryos reveals novel protein- DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 23 (16): 3327-3334.

WHITE, C. N; L. E. Hightower and R. J. Schultz. 1994.

Variation in heat shock proteins among species of desert fishes (*Poeciliidae*, *Poeciliopsis*). *Mol. Biol. Evol.* 11: 106-119.

WILKINS, A. S. 1986. Genetic analysis of animal development. Willey. Nueva York. 546 pp.

WILLIAM J. W. 1993. Respuesta de las células al estrés. *Investigación y Ciencia*. 22-29.

WU, C; V. Zimarino; B. Tsai; B. Walker and S. Wilson. 1990. Transcriptional regulation of heat shock genes. In: Morimoto RI, Tissieres G. Georcopoulus C (eds) *Stress proteins in biology and medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. N. Y. pp. 429-442.

WÜGLER, F. E. y E. W. Vogel. 1986. *In vivo* mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*. En: *Chemical mutagens principles and methods for their detection*. (De Serres, F.J. Eds.). Plenum Press. Nueva York 10: 1-71.

ZIJLSTRA, J. A. 1987. Pharmacological and methodological aspects of chemically induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 182: 243-264.

ZIJLSTRA, J. A. 1984. Bioactivation and inactivation of mutagens in *Drosophila*. *Mutation Res.* 130: 276-322.

ZIMARINO, V. and C. Wu. 1987. Induction of sequence-specific binding of *Drosophila* heat shock activator protein without protein synthesis. *Nature* 327: 727-730.

ZIMMERMAN, J. L; W. Petri and M. Meselson. 1983. Accumulation of a specific subset of *Drosophila melanogaster* heat shock mRNA in normal development without heat shock. *Cell* 32: 1161-1170.