



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Facultat de Biociències

Departament de Genètica i de Microbiologia

Grup de Mutagènesi

**Evaluación genotóxica de algunos
metales pesados en *Drosophila
melanogaster* mediante los ensayos
SMART de alas y Cometa**

Tesis Doctoral

Erico R. Carmona Ortiz

2009

Evaluación genotóxica de algunos metales pesados
en *Drosophila melanogaster* mediante los ensayos
SMART de alas y Cometa

Memoria presentada para optar al
grado de Doctor en Ciencias
Ambientales por Erico R. Carmona
Ortiz

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès)
Julio de 2009.

Erico R. Carmona Ortiz

Vº Bº

Los directores de la tesis

Dr. Ricard Marcos Dauder

Catedrático de Genética

UAB

Dr. Amadeu Creus Capdevila

Catedrático de Genética

UAB

A mi familia

Agradecimientos

Primero que nada me gustaría decir que faltarían palabras y papel para agradecer a todas las personas que de diferentes formas me han alentado y apoyado a realizar esta tesis doctoral, y creo sinceramente que les estaré eternamente agradecido. Agradezco primero que nada a mi esposa Marcela y a mi familia. A Marcela, porque siempre estuvo a mi lado en los buenos y en los malos momentos durante estos cinco años de estadía en Barcelona y porque sin sus palabras de motivación y apoyo, este trabajo no hubiera sido posible. A mis padres y hermanos, que, sin importar los sacrificios, siempre estuvieron conmigo, a pesar de la gran distancia que nos separa.

También quiero expresar mis agradecimientos, cómo no, a todos los *cabros y cabras* del laboratorio. Me gustaría agradecer especialmente a Elk, quien fue mi compañera de trabajo y la que me enseñó y me introdujo al mundo de *Drosophila*. Agradezco también a mi gran amigo y compadre Wilser por su motivación, soporte y grandes consejos, no sólo en el laboratorio, sino también fuera de él. No puedo dejar de agradecer a mis otros grandes amigos: Eli, por su amistad, confianza y disposición en todo momento; a Mounaim, por hacerme reír y enojar a la vez, y por su asistencia en momentos claves; a Esteban por su grandeza, motivación y sinceridad.

Por otro lado, también quiero agradecer a Glòria, Lourdes y Anna, por la ayuda prestada, por la paciencia y la enorme disposición que siempre han tenido conmigo desde que llegué al laboratorio.

Agradezco también a Nucha Guecheva, Markus Robert y Mark N. Duk, ya que con su gran asistencia he podido desarrollar una parte importante y difícil de esta tesis. A Marcelo Rivadeneira por su gran asistencia en el arte de la estadística y del análisis de datos.

No puedo dejar de agradecer a mis tutores Ricard y Amadeu, quienes me han orientado y ayudado durante todo este periodo de estudios de doctorado e investigación. Sus críticas y comentarios han contribuido a mejorar en gran medida el presente trabajo.

Finalmente, agradezco la financiación otorgada por la Universitat Autònoma de Barcelona a través de la beca predoctoral PIF-UAB (Ref. 409-02-2/07) para finalizar la tesis doctoral.

Nuevamente a todos, muchas gracias.

Erico R. Carmona Ortiz

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LOS METALES PESADOS	1
1.1.1. <i>Toxicidad de los metales pesados</i>	2
1.1.2. <i>Genotoxicidad de los metales pesados</i>	4
1.2. DETECCIÓN DEL DAÑO GENOTÓXICO	10
1.3. <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> : CARACTERÍSTICAS Y CICLO BIOLÓGICO	11
1.4. ENSAYOS DE GENOTOXICIDAD EN <i>DROSOPHILA</i>	16
1.4.1. <i>Ensayos de mutación y recombinación somáticas (SMART)</i>	19
1.4.2. <i>El ensayo SMART en alas</i>	20
1.4.3. <i>El ensayo del cometa</i>	22
2. OBJETIVOS	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1. ENSAYO <i>SMART</i> EN ALAS.....	31
3.1.1. <i>Compuestos químicos utilizados</i>	31
3.1.2. <i>Cepas utilizadas</i>	31
3.1.3. <i>Cruzamientos</i>	33
3.1.4. <i>Tratamiento de larvas</i>	34
3.1.5. <i>Cotratamientos de larvas</i>	35
3.1.6. <i>Preparación de las alas</i>	36
3.1.7. <i>Análisis microscópico de las alas</i>	37
3.1.8. <i>Clasificación de los sectores mutantes</i>	37
3.1.9. <i>Análisis de los datos</i>	39
3.2. ENSAYO DEL COMETA EN <i>D. MELANOGASTER</i>	43
3.2.1. <i>Puesta a punto del ensayo del cometa en hemocitos de D. melanogaster</i>	43
3.2.2. <i>Genotoxicidad de metales pesados con el ensayo del cometa en hemocitos de D. melanogaster</i>	46
4. RESULTADOS	49
4.1 TOXICIDAD DE LOS METALES PESADOS	49
4.1.1 <i>Toxicidad de los compuestos de mercurio</i>	49
4.1.2. <i>Toxicidad de los compuestos de plomo</i>	50
4.1.3. <i>Toxicidad de los compuestos de níquel</i>	51
4.2. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS <i>SMART</i> EN ALAS	53
4.2.1 <i>Genotoxicidad de los compuestos de mercurio</i>	53
4.2.2. <i>Genotoxicidad de los compuestos de plomo</i>	58
4.2.3. <i>Genotoxicidad de los compuestos de níquel</i>	63
4.2.4. <i>Resultados de interacción en el ensayo SMART en alas</i>	67
4.3. RESULTADOS DEL ENSAYO DEL COMETA EN <i>D. MELANOGASTER</i>	80
4.3.1. <i>Puesta a punto del ensayo del cometa en hemocitos de D. melanogaster</i>	80
4.3.2. <i>Resultados de la genotoxicidad de metales pesados con el ensayo del cometa en hemocitos de D. melanogaster</i>	84
5. DISCUSIÓN	99
5.1. GENOTOXICIDAD DE LOS METALES PESADOS CON EL ENSAYO <i>SMART</i> DE ALAS EN <i>DROSOPHILA</i>	100
5.1.1. <i>Compuestos de mercurio</i>	101
5.1.2. <i>Compuestos de plomo</i>	104

5.1.3. <i>Compuestos de níquel</i>	106
5.2. INTERACCIÓN DE LOS METALES PESADOS CON LA RADIACIÓN- γ	109
5.2.1. <i>Mercurio vs radiación-γ</i>	110
5.2.2. <i>Plomo vs radiación-γ</i>	112
5.2.3. <i>Níquel vs radiación-γ</i>	114
5.3. ENSAYO DEL COMETA EN HEMOCITOS DE <i>DROSOPHILA</i>	116
5.3.1. <i>Puesta a punto del ensayo del cometa en hemocitos de Drosophila</i>	117
5.3.2. <i>Genotoxicidad de los metales pesados con el ensayo del cometa en hemocitos de Drosophila</i>	120
6. CONCLUSIONES	127
7. REFERENCIAS	129
8. ANEXOS	149

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Los metales pesados

La corteza terrestre contiene muchos metales que, ya desde tiempos remotos, han resultado de gran importancia en el desarrollo y progreso de las civilizaciones, hasta tal punto que sería muy difícil imaginar nuestra sociedad actual sin un extenso empleo de utensilios y herramientas elaborados con metales. De los elementos químicos que hoy conocemos, aproximadamente un 75% son metales, de entre los que destacan los denominados metales pesados. Éstos son un grupo de elementos químicos que presentan una densidad relativamente alta y cierta toxicidad para el ser humano. Aunque el término metal pesado no está bien definido, la descripción más aceptada corresponde a que los metales pesados son un grupo de elementos que tienen un peso molecular comprendido entre 63,5 y 200,6 con una distribución electrónica similar en su capa externa (Rainbow, 1993).

Los metales están siempre presentes en nuestro ambiente debido tanto a fuentes naturales como antropogénicas. Esta ubicuidad hace que estos elementos se encuentren prácticamente en todos los organismos vivos, donde ejercen un amplio rango de funciones biológicas importantes, tales como componentes enzimáticos y sistemas de óxido-reducción, activadores enzimáticos, etc. Sin embargo, hay una serie de elementos que en alguna de sus formas químicas pueden suponer un serio problema para la salud de la población y del medioambiente.

Desde un punto de vista biológico y toxicológico los metales pueden ser clasificados en cuatro grupos: (1) metales con toxicidad aparente y con amplia distribución en el ambiente (p. ej. arsénico, cadmio, plomo, mercurio y uranio); (2) metales traza esenciales (cromo, cobalto, manganeso, selenio y zinc); (3) otros metales con importancia biológica (níquel y vanadio); y (4) metales con interés farmacológico (aluminio, galio, litio y platino).

En las últimas décadas, la concentración de metales en el ambiente ha aumentado considerablemente, debido a las variadas actividades de origen

antropogénico, de manera que actualmente estos metales representan una clase importante de contaminantes ambientales.

Las rutas de exposición a los metales pesados pueden ser variables. Así, a través de la respiración se puede estar expuesto a distintos metales procedentes de procesos de combustión industrial. Otros se depositan en la tierra y las lluvias ayudan a la filtración y, finalmente, llegan al ser humano a través del agua de consumo. Además, los metales se pueden fijar en los vegetales y así pasar a la cadena trófica, afectando también a los animales y humanos, situados en la cima de esta cadena.

En general, algunos metales pueden tener efectos positivos como micronutrientes esenciales a bajas concentraciones y efectos tóxicos a niveles altos. Estos efectos pueden observarse a nivel histológico, celular o molecular. Entre los efectos a corto plazo causados por los metales de transición destacan la neurotoxicidad, la hepatotoxicidad y la nefrotoxicidad, sin olvidar su potencial cancerígeno.

1.1.1. Toxicidad de los metales pesados

Como se ha comentado, los metales pesados constituyen un serio problema tanto para el medioambiente como para los organismos vivos que lo habitan, debido principalmente a sus efectos tóxicos. Los metales pesados muestran toxicidad cuando no son metabolizados por el organismo y cuando, consecuentemente, se acumulan en los tejidos. Las rutas de exposición a los metales son múltiples, ya que éstos pueden entrar en el cuerpo humano a través de los alimentos, agua, aire o por la absorción a través de la piel. Aunque los niveles de exposición generalmente son bajos, éstos pueden incrementar considerablemente por razones de índole laboral o como consecuencia de accidentes.

Las propiedades toxicológicas de los metales dependen altamente del elemento metálico involucrado, pero éstas se ven modificadas drásticamente en función del tipo de compuesto formado, de si es orgánico o inorgánico, así como de sus características hidrofílicas o lipofílicas; estos factores determinan

significativamente su toxicinética y, por lo tanto, sus posibilidades de alcanzar sus dianas biológicas (Hartwing, 1998).

Potencialmente, todos los metales pesados pueden causar toxicidad cuando son ingeridos en cantidades suficientemente altas, pero hay algunos metales con características especiales, los cuales pueden tener una gran capacidad de penetración o producir toxicidad a concentraciones bajas. A pesar de que la toxicidad de los metales ha sido ampliamente investigada en las últimas décadas, todavía existen múltiples incógnitas sobre sus mecanismos de acción.

En general, los metales pesados suelen ejercer su toxicidad por la formación de complejos con compuestos orgánicos. Estas moléculas biológicas modificadas pierden sus capacidades funcionales propias, provocando el malfuncionamiento o la muerte de las células afectadas. La mayoría de los grupos involucrados en la formación de complejos son el oxígeno, el azufre, y el nitrógeno. Cuando los metales se unen a estos grupos pueden inactivar sistemas enzimáticos importantes o afectar las estructuras proteicas.

Los metales pesados poseen una elevada reactividad biológica dada su capacidad para unirse con diversos tipos de moléculas orgánicas. Los procesos de bioacumulación de los metales se deben básicamente a la imposibilidad, por parte del organismo afectado, de mantener los niveles necesarios de excreción del contaminante, por lo que sufre una acumulación en el interior del mismo. El proceso se suele agravar a lo largo de las cadenas tróficas, debido a que los niveles de incorporación experimentan un fuerte incremento a lo largo de sus sucesivos eslabones, siendo en los superiores donde se hallan los mayores niveles de contaminantes. Una vez incorporados a los tejidos, los metales son capaces de reaccionar con una gran variedad de moléculas, y sus efectos tóxicos específicos sobre un sistema biológico dependen de reacciones con complejos que son esenciales para la función normal de ese sistema. Así, los metales muestran gran afinidad por los grupos sulfhidrilo y, en menor medida, por los radicales amino, fosfato, carboxilo, imidazol e hidroxilo, pertenecientes a enzimas u otras proteínas esenciales.

Por otro lado, diversos estudios previos demuestran que algunos de los denominados metales de transición (plomo, cadmio, mercurio y arsénico) actúan como catalizadores de reacciones de oxidación de macromoléculas biológicas; por lo tanto, la toxicidad asociada a estos metales se podría deber también al daño oxidativo inducido en los tejidos (Stohs y Bagchi, 1995). Tanto los metales que poseen actividad óxido-reductora (hierro, cobre y cromo), como los que no la poseen (plomo, cadmio y mercurio), pueden causar incrementos importantes de los niveles de especies reactivas de oxígeno (EROs), tales como los radicales hidroxilo (OH^\cdot), superóxido (O_2^\cdot) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las células bajo condiciones de estrés oxidativo muestran un amplio rango de alteraciones debidas a lesiones causadas por las EROs en los lípidos, proteínas y DNA, lo que sugiere que la toxicidad de los metales pesados puede ser explicada, al menos en parte, por la capacidad de inducir estrés oxidativo en las células (Ercal *et al.*, 2001).

Al analizar los efectos tóxicos de los metales pesados debemos considerar que también la genotoxicidad es un tipo específico de toxicidad, ya que muchos de estos metales tienen la capacidad de interactuar con el DNA, ya sea de forma directa o indirecta, provocando efectos biológicos nocivos para las células y, en consecuencia, para los organismos.

1.1.2. Genotoxicidad de los metales pesados

Los metales pueden inducir genotoxicidad por múltiples vías, ya sea por sí solos o por la potenciación de los efectos de otros agentes, es decir, por la interacción entre agentes (Beyersmann y Hartwig, 1994). Se ha descrito que casi todos los metales causan daño en el DNA por la generación de estrés oxidativo en las células (Valko *et al.*, 2005), principalmente por las especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden inducir la peroxidación de lípidos, daño en el DNA, la reducción de grupos sulfhidrilo, así como alteraciones de las vías de señalización celular y de la homeostasis del calcio. Los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno generados por los metales pueden promover distintos tipos de daño en el DNA, tales como roturas de cadena simple y modificaciones de las bases del DNA. Sin embargo, los

metales también pueden inducir genotoxicidad debido a su habilidad para inhibir los mecanismos de reparación del DNA (Ercal *et al.*, 2001). Por ejemplo, metales como el níquel y el plomo pueden ser comutagénicos e interferir con los mecanismos de reparación por excisión de nucleótidos (NER) y de bases (BER). La disminución de la habilidad para eliminar el daño genético causado por los metales puede incrementar el riesgo de cáncer. Además, se ha demostrado que los metales afectan la fidelidad de la replicación del DNA (Wedrychowski *et al.*, 1986; Singh y Snow, 1998; Vaisman *et al.*, 2001), debido a que son capaces de inhibir las enzimas involucradas en la replicación y en la síntesis de los nucleótidos, así como alterar los procesos de metilación del DNA y de los componentes del complejo de replicación del DNA.

Aunque existen numerosos estudios que han evaluado los efectos genotóxicos y carcinogénicos de diferentes metales pesados, aún se desconocen los efectos que pueden provocar algunos metales y, fundamentalmente, los mecanismos por los cuales pueden causar genotoxicidad. De esta manera, nuevos estudios que utilicen ensayos sensibles y capaces de detectar un amplio rango de mutaciones ayudarán a dilucidar y conocer más profundamente los efectos de los metales o metaloides sobre el material genético. De entre todos los metales pesados existentes, en esta tesis doctoral nos vamos a dedicar a detallar los efectos inducidos por tres metales: mercurio, plomo y níquel.

1.1.2.1. Genotoxicidad del mercurio

El mercurio es un metal abundante en la corteza terrestre y ampliamente utilizado por el hombre, que ha provocado graves efectos sobre el medio ambiente y sobre los organismos vivos que lo habitan. Este metal ha demostrado ser extremadamente tóxico, tanto en procariotas como en eucariotas, y en humanos expuestos este metal puede ser altamente tóxico, afectando principalmente el sistema nervioso central (Crespo-López *et al.*, 2005). En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios sobre los posibles efectos genotóxicos de los compuestos de mercurio dirigidos, principalmente, a aclarar su posible potencial carcinogénico.

Así, la genotoxicidad de los compuestos de mercurio se ha investigado en una gran variedad de blancos genéticos, utilizando tanto organismos procariotas como eucariotas (De Flora *et al.*, 1994). Sin embargo, los resultados obtenidos son poco consistentes y no muestran una tendencia clara. Así, se podría decir que los compuestos de mercurio, en general, no inducen efectos mutagénicos en ensayos con bacterias, pero pueden ejercer genotoxicidad sobre los cromosomas de las células eucariotas, provocando aberraciones cromosómicas, clastogenicidad y efectos aneugénicos (De Flora *et al.*, 1994; Akiyama *et al.*, 2001; Thier *et al.*, 2003).

Los estudios de biomonitorización en humanos expuestos al mercurio han mostrado un incremento en las frecuencias de aberraciones cromosómicas y de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica (Franchi *et al.*, 1994; Amorim *et al.*, 2000). Sin embargo, en otros casos también se han encontrado resultados negativos y/o discordantes, poniéndose de manifiesto que los estudios citogenéticos de individuos expuestos a este metal no son muy específicos (De Flora *et al.*, 1994; Celbulska-Wasilewska *et al.*, 2005; Silva-Pereira *et al.*, 2005).

Respecto a los mecanismos involucrados en la genotoxicidad del mercurio, se ha considerado que ésta es debida a la capacidad del metal de reaccionar con los grupos sulfhidrilo de la tubulina, afectando las funciones del huso mitótico y produciendo errores en la segregación de los cromosomas durante la división celular lo que provoca, como consecuencia, aberraciones cromosómicas y poliploidía (De Flora *et al.*, 1994). Por otro lado, muchos estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que la genotoxicidad de las formas inorgánicas y orgánicas de mercurio se debe a la generación de radicales libres (De Flora *et al.*, 1994; Rao *et al.*, 2001). Una elevada formación de complejos entre el mercurio y el glutatión, principal antioxidante de las células, produciría un daño en el DNA, indirectamente, a través de la acumulación de especies reactivas de oxígeno, las cuales son eliminadas normalmente por el glutatión (De Flora *et al.*, 1994; Ercal *et al.*, 2001; Valko *et al.*, 2005).

Aunque se ha detectado alguna evidencia de que tanto el mercurio inorgánico como el orgánico pueden causar tumores renales en roedores

(National Toxicology Program, 1993), no existe evidencia suficiente que demuestre que los compuestos de mercurio puedan causar carcinogenicidad en humanos (Boffeta, 1993; De Flora *et al.*, 1994). Sin embargo, algunas observaciones han mostrado un cierto grado de riesgo de glioblastoma en dentistas y enfermeros dentales que utilizan amalgamas que contienen mercurio (Ahlbom *et al.*, 1986). De esta manera, y de acuerdo con la información acumulada sobre los efectos genotóxicos y carcinogénicos del mercurio, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) (ver Boffeta, 1993) ha clasificado los compuestos de mercurio en los siguientes grupos:

- Compuestos de metilmercurio en el grupo 2B, que corresponden a los compuestos que son posibles carcinógenos.
- Los compuestos inorgánicos de mercurio y el mercurio metálico en el grupo 3, que son los compuestos considerados no carcinogénicos en humanos.

1.1.2.2. Genotoxicidad del plomo

El plomo es uno de los metales más comúnmente utilizados en múltiples aplicaciones industriales y presenta una elevada toxicidad en la mayoría de los organismos. Debido al amplio uso industrial y a las continuas emisiones al medioambiente, el plomo ha sido uno de los metales más estudiados desde el punto de vista carcinogénico y genotóxico (Cohen *et al.*, 1996).

La genotoxicidad de diferentes compuestos de plomo se ha evaluado y discutido ampliamente durante las dos últimas décadas (Gerber *et al.*, 1980; Winder y Bonin, 1993; Cohen *et al.*, 1996; Steenland y Boffetta, 2000). Los estudios de mutagenicidad en bacterias han demostrado que los compuestos de plomo son mutágenos débiles, mientras que los estudios llevados a cabo en células de mamífero han mostrado diferentes efectos, y los resultados son ambiguos. Las razones de esta situación pueden estar relacionadas con problemas de solubilidad de los compuestos de plomo, su capacidad para disolverse en fluidos biológicos, interferencias químicas, uso de ensayos no

específicos o a que la genotoxicidad se produzca a través de mecanismos indirectos (Winder y Bonin, 1993; Hartwig, 1994).

En eucariotas se ha visto que altas concentraciones de plomo inorgánico pueden inducir aberraciones cromosómicas, intercambios entre cromátidas hermanas y micronúcleos (Johnson, 1998). Además, algunos estudios en humanos expuestos al plomo muestran un incremento en el daño cromosómico (efectos clastogénicos y aneugénicos) (Vaglenov *et al.*, 2001; Palus *et al.*, 2003), lo cual indica que el plomo produce efectos citogenéticos *in vivo*.

A pesar de que los mecanismos de acción genotóxica de los compuestos de plomo aún no están claros, algunos estudios indican que los mecanismos de acción mutagénica del plomo podrían ser por efectos indirectos. Se ha documentado que el plomo puede afectar principalmente a los ciclos de óxido-reducción en las células, inhibiendo la reparación del DNA, lo que puede alterar la organización de los microtúbulos en las células y modular los mecanismos epigenéticos (Skerfving y Bergdahl, 2007).

De acuerdo con la IARC, el plomo y los compuestos inorgánicos de plomo presentan evidencias de producir cáncer en animales, aunque en humanos éstas son insuficientes; es por esto que se les clasifica en el grupo 2B, es decir posibles carcinógenos en humanos. En cambio la IARC clasifica los compuestos orgánicos de plomo en el grupo 3, que corresponde a los compuestos considerados no carcinogénicos en humanos (Boffeta, 1993).

1.1.2.3. Genotoxicidad del níquel

El níquel es también un metal muy abundante que ha probado ser tóxico y carcinogénico en diversos órganos (Kasprzak *et al.*, 2003). La combustión de combustibles fósiles y la contaminación por las industrias del níquel son las principales fuentes que aportan níquel al medio ambiente. Específicamente, las fuentes de níquel provienen de la quema de carbón, la incineración de basuras, la minería y la industria del acero y la galvanoplastia (Klein y Costa, 2007). Los efectos más graves sobre la salud, provocados por exposición al níquel, son

alergias, bronquitis crónica, disminución de la función pulmonar y cáncer de pulmón y de los senos nasales (Lu *et al.*, 2005).

A pesar de que numerosos estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* en células de mamíferos han documentado daño en el DNA y en los cromosomas, el potencial mutagénico de los compuestos de níquel en células y tejidos expuestos es considerado bajo y restringido a compuestos poco solubles (Hartwing, 1995; Kasprzak *et al.*, 2003). Sin embargo, existen algunos datos que sugieren que el níquel puede actuar como un potente comutágeno en combinación con otros agentes que dañan el DNA, incluyendo la radiación UV, los rayos X, los agentes alquilantes y el benzo[α]pireno (Hartwig *et al.*, 1994b; Hartwing, 1995). Esto sugiere que el níquel puede tener un papel importante en la alteración de los mecanismos involucrados en la reparación del DNA. Por otro lado, algunos estudios han demostrado que los compuestos de níquel pueden inducir daño oxidativo en el DNA, a través de la generación de EROs (Sugiyama, 1994; Kasprzak, 1995). No obstante, estos resultados indican que el daño oxidativo en el DNA solamente se produce a concentraciones altas y citotóxicas.

De acuerdo con la IARC (Boffeta, 1993), el níquel metálico no muestra evidencias suficientes de carcinogenicidad en humanos, mientras que los diversos compuestos de níquel sí que presentan evidencias suficientes de producir cáncer en humanos. Estos datos se basan fundamentalmente en estudios con trabajadores expuestos al níquel, en los que se observó una alta incidencia de cáncer de pulmón y nasal.

Finalmente, dado que no existe una correlación directa y que las evidencias existentes entre mutagénesis y carcinogénesis son débiles, los datos sugieren que la inducción de una actividad mutagénica directa del níquel es la primera causa de la carcinogenicidad de este metal. Estudios recientes muestran que la carcinogenicidad del níquel puede estar relacionada con la producción de alteraciones significativas en el metabolismo celular, tales como la estimulación de la actividad glicolítica, alteración de la homeostasis del hierro, reducción del ascorbato y estrés hipóxico. Estos factores pueden producir claramente una modulación de la expresión genética (cambios

epigenéticos). De esta manera, estos mecanismos más bien de tipo indirecto podrían ser relevantes a la hora de explicar la carcinogénesis del níquel (Salnikow y Costa, 2000; Kasprzak *et al.*, 2003; Salnikow y Zhitkovich, 2008).

1.2. Detección del daño genotóxico

La gran trascendencia que tienen los efectos adversos causados por los metales pesados (y otros agentes) sobre el DNA, ha hecho que los científicos se hayan movilizado en la obtención de herramientas que permitan detectar con la mayor rapidez y sencillez posibles si un determinado agente es genotóxico o no, y aportar información sobre los mecanismos mediante los cuales ejercen su potencialidad genotóxica.

Así, para detectar los posibles agentes genotóxicos se ha desarrollado una amplia variedad de ensayos que utilizan organismos de complejidad muy variada, abarcando desde organismos unicelulares simples, como las bacterias, hasta mamíferos y cultivos de células humanas. Cada ensayo tiene la capacidad de detectar diferentes alteraciones en el DNA, lo que permite que, al utilizar distintos ensayos en paralelo, se pueda tener una evaluación genotóxica completa del potencial de un determinado agente.

Entre los distintos ensayos, los ensayos de mutación reversa con bacterias son muy utilizados para la evaluación mutagénica de las sustancias químicas, especialmente para hacer un primer análisis de sus propiedades genotóxicas. Por su sencillez y rapidez, estos ensayos son unos de los más utilizados a la hora de evaluar nuevos productos químicos (p. ej. cosméticos, aditivos alimentarios, medicamentos, etc.), ya que permiten identificar sustancias capaces de causar, fundamentalmente, sustituciones de bases o adiciones y deleciones. Las especies bacterianas más utilizadas para este tipo de ensayos son *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*.

Dadas las diferencias existentes entre bacterias y mamíferos, tanto en la organización del genoma como en la complejidad genética, los ensayos bacterianos se han de complementar con ensayos que utilizan cultivos de

células eucariotas, principalmente de mamíferos. Mediante el uso de estas células se pueden estudiar prácticamente todos los tipos de daño (incluyendo las aberraciones cromosómicas y las alteraciones en la segregación cromosómica).

En general, los ensayos de mutagénesis *in vivo* con mamíferos son menos sensibles que los realizados *in vitro*. Sin embargo, se trata de ensayos que miden los efectos reales en organismos superiores y, por lo tanto, cumplen un papel muy importante a la hora de la evaluación final de un determinado compuesto. La razón de esta menor sensibilidad se debe, sin duda alguna, a los diversos mecanismos/barreras involucrados en el metabolismo/excreción de dichos compuestos por los organismos complejos, lo que impide que muchos de ellos puedan llegar a alcanzar el blanco esperado (DNA) y producir efectos genotóxicos.

Entre las pruebas de mutagénesis que utilizan sistemas *in vivo*, hay que destacar aquellas que emplean *Drosophila melanogaster* como organismo de ensayo, especialmente si nos referimos a la investigación básica. La simplicidad de *Drosophila* frente a los mamíferos, junto con la elevada información que se posee de esta especie modelo, la hace particularmente útil en los estudios de genotoxicidad. A pesar de que están en regresión, los ensayos con *Drosophila* todavía ocupan un lugar importante en las baterías mínimas de ensayos de corta duración para la evaluación genotóxica.

1.3. *Drosophila melanogaster*: características y ciclo biológico

D. melanogaster (Meigen, 1830) es un insecto del orden de los dípteros (dos alas), que se caracteriza por tener ojos rojos, un cuerpo de color amarillo-marrón y anillos negros transversales que cruzan su abdomen. Presenta dimorfismo sexual: las hembras tienen un tamaño aproximado de 2,5 mm, los machos son un poco más pequeños y la parte trasera de su cuerpo es más oscura. Los machos se distinguen fácilmente de las hembras por la diferencia de color (los machos tienen los segmentos terminales de su abdomen

melanizados); además, los machos tienen peines sexuales en las patas delanteras que les permiten sujetar a la hembra durante el apareamiento.

D. melanogaster es uno de los organismos más usados en la investigación biológica, particularmente en el área de la genética. Además, cabe señalar que las primeras evidencias de mutagénesis física (rayos-X) y de mutagénesis química (gas mostaza) en eucariotas fueron obtenidas precisamente por medio del empleo de *D. melanogaster* (Müller, 1927; Auerbach y Robson, 1947). A continuación se mencionan algunas de las razones de su amplia utilización:

- Es pequeña y de fácil mantenimiento y crecimiento en el laboratorio.
- Tiene un periodo de generación corto y una alta fertilidad (las hembras pueden llegar a poner 100 huevos en 1 día).
- Las larvas de tercer estadio presentan cromosomas gigantes en las glándulas salivales, llamados cromosomas politénicos, que permiten visualizar regiones de transcripción y, por lo tanto, de actividad génica.
- Sólo presenta cuatro pares de cromosomas: tres autosomas y uno sexual.
- Los machos no muestran recombinación meiótica, facilitando los estudios genéticos.
- Alrededor del 61% de las enfermedades genéticas conocidas en el hombre corresponden a alteraciones con un parecido reconocible en la secuencia genética de la mosca de la fruta y un 50% de sus secuencias proteicas tiene un análogo en mamíferos.
- Su genoma fue secuenciado en 1998, con 132 millones de bases y 13.376 genes, aproximadamente.

Su ciclo de vida comprende un período de embriogénesis dentro del huevo y una sucesión de estadios larvarios que culminan con una metamorfosis completa (en el interior de la pupa), de la que finalmente emerge un imago o adulto (Figura 1). La duración del ciclo de vida completo es de 9 a 10 días en condiciones de laboratorio a 25 °C de temperatura y una humedad relativa del 60% (Tabla 1).

Las moscas adultas tienen la capacidad de aparearse pocas horas después de su salida de la pupa, y la puesta de huevos fecundados comienza inmediatamente después del apareamiento. Después de un día de desarrollo embrionario, eclosiona del huevo una pequeña larva, iniciándose así el desarrollo post-embrionario.

La fase de larva corresponde a un crecimiento muy rápido del organismo, lo que hace que las larvas sean muy activas y voraces. Pasan por dos mudas, pudiéndose distinguir, por lo tanto, tres estadios larvarios.

La pupa es una fase estacionaria en la que se produce la metamorfosis de larva a adulto, un proceso que supone la casi completa degeneración del tejido larvario y la posterior formación de nuevos tejidos y órganos adultos derivados de los discos imaginales.

Los adultos o imagos emergen con las alas plegadas y con el cuerpo alargado, delgado y poco pigmentado. Las alas se expanden aproximadamente en el intervalo de una hora y la pigmentación aparece al cabo de 2 ó 3 horas después de la eclosión. Transcurrido este tiempo los machos ya pueden aparearse, mientras que el tiempo que requieren las hembras para adquirir la madurez sexual y poder ser fecundadas es de unas 6 horas.

Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

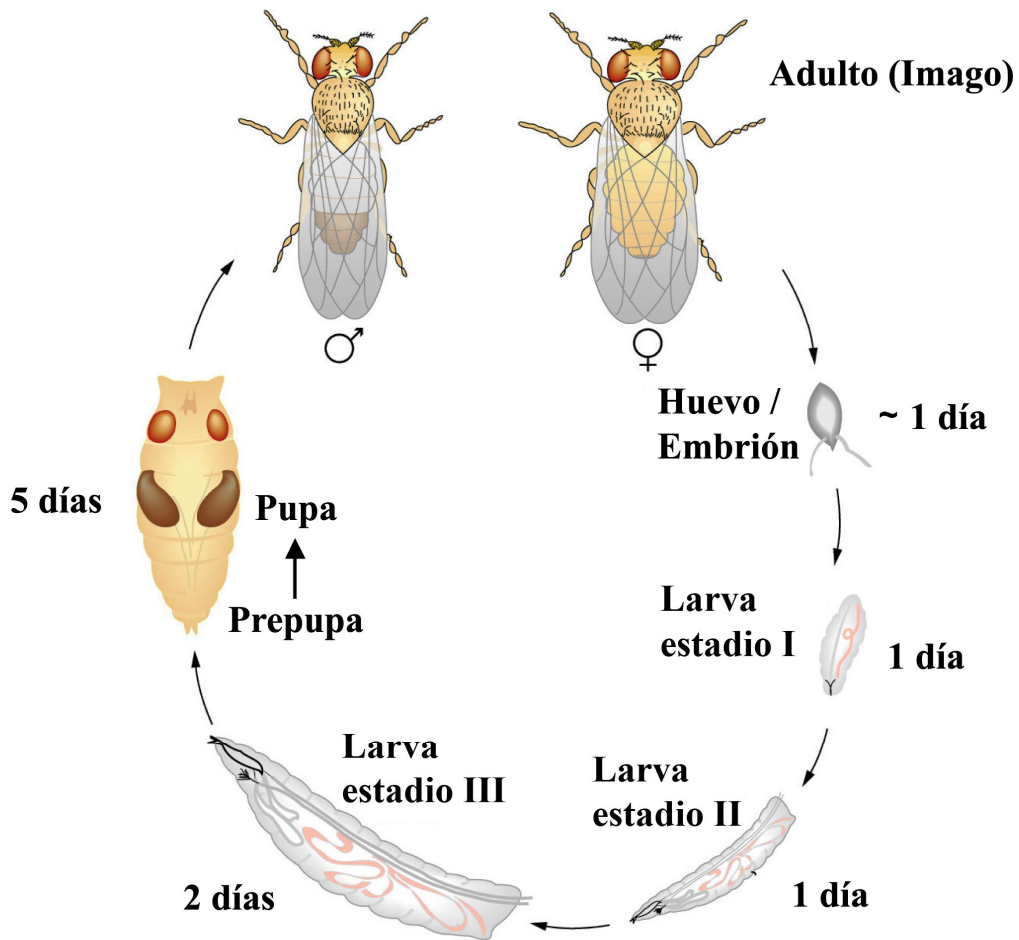


Figura 1. Ciclo de vida de *D. melanogaster* (Modificado de Weigmann *et al.*, 2003).

Tabla 1. Cronología del desarrollo de <i>D. melanogaster</i>		
Día	Horas	Estadio y/o suceso del desarrollo
0	0	Huevo
1	22	Primer estadio larvario
2	47	Segundo estadio larvario
3	70	Tercer estadio larvario
5	118	Formación de la pupa: pupa blanca
5	119	Pupa amarilla
5	120	Pupa pigmentada
5	122	Muda prepupal
5,5	130	Pupación: formación de la cabeza, alas y patas
7	167	Pigmentación de los ojos
7,5	187	Pigmentación de las quetas
9	214	Emergencia del adulto con las alas plegadas
9	215	Adulto con las alas desplegadas
Según Strickberger, 1962; Bodenstein, 1965.		

1.4. Ensayos de genotoxicidad en *Drosophila*

El objetivo básico de todo ensayo de genotoxicidad es contribuir a la evaluación del riesgo que puede suponer un determinado agente para los seres humanos. Para tratar de identificar la gran variedad de mutágenos, se han diseñado distintos ensayos que utilizan diferentes sistemas biológicos de complejidad muy variable, abarcando desde bacterias hasta mamíferos y cultivos de células humanas. Sin duda alguna, es indiscutible la importancia de los mamíferos en los estudios de toxicología genética, sobre todo por su estrecha relación filogenética con el hombre, que nos permite extrapolar los resultados con una buena fiabilidad. Sin embargo, los mamíferos presentan muchos inconvenientes para ser usados de manera generalizada en dichos estudios por varias razones: su ciclo reproductor es largo, la descendencia es poco numerosa, tienen un alto costo de mantenimiento y ocupan gran espacio. Por la importancia de los estudios *in vivo* y por la falta de información directa sobre el ser humano, se han establecido una serie de ensayos con diferentes organismos vegetales y animales, dentro de los cuales destaca *D. melanogaster*, conocida vulgarmente como mosca de la fruta o del vinagre.

Históricamente, las primeras pruebas para la detección de agentes mutagénicos fueron realizadas utilizando *D. melanogaster* como organismo modelo (Müller, 1927; Auerbach y Robson, 1947). Desde entonces, numerosos compuestos han sido evaluados con este organismo y, además, ha sido ampliamente utilizado en las baterías de ensayos de mutagenicidad propuestas por diversas entidades internacionales. La presencia de *D. melanogaster* dentro de las baterías mínimas de ensayo viene determinada por sus múltiples ventajas en este tipo de estudios.

Las ventajas que posee la mosca de la fruta en los estudios de toxicología genética se pueden resumir de la siguiente manera:

- Posee un tiempo de generación corto y una progenie numerosa.
- Es un organismo muy bien estudiado genéticamente, del cual se conocen muchas mutaciones con efectos fenotípicos claramente visibles que son utilizados como marcadores genéticos.

- Se puede detectar un amplio rango de efectos genéticos tales como: mutaciones letales dominantes, mutaciones letales recesivas ligadas al sexo, deleciones, translocaciones, recombinación mitótica y/o meiótica, no disyunción, pérdida de cromosomas, etc. (Sobels y Vogel, 1976a).
- Tiene la capacidad metabólica de activar o inactivar promutágenos y sus metabolitos, siendo comparable a la versatilidad metabólica del hígado de los mamíferos, pudiendo transformar muchos compuestos, entre otros menos tóxicos y/o biológicamente más activos (Vogel y Sobels, 1976; Zijlstra *et al.*, 1979).
- Es un organismo eucariota con reproducción sexual que presenta unos estadios germinales paralelos a los de mamíferos y resulta relativamente sencillo evaluar la actividad mutagénica de un determinado agente.
- Posee cromosomas politénicos en las glándulas salivares de las larvas, las cuales permiten detectar con mayor facilidad cualquier tipo de reordenación cromosómica.

Como se ha indicado anteriormente, *D. melanogaster* ofrece un conjunto de ventajas que le hacen un organismo modelo para los estudios de genotoxicidad, habiendo desempeñado un papel muy importante en el desarrollo de la Toxicología Genética. Además, la mosca de la fruta ofrece muchas ventajas a la hora de detectar actividades mutagénicas de agentes potencialmente carcinogénicos (Sobels y Vogel, 1976b).

Los ensayos más utilizados en *D. melanogaster*, si se mide la inducción de mutaciones en la línea germinal, son los siguientes:

- La prueba de letales recesivos ligados al sexo.
- La prueba de letales dominantes.
- El ensayo de pérdida de los cromosomas sexuales X o Y.
- La prueba de translocaciones entre los cromosomas 2 y 3.

A pesar de la variedad de ensayos de corta duración existentes en *Drosophila*, el ensayo de detección de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo (Sex-Linked Recessive Lethal Test, *SLRLT*) en células germinales de *D.*

melanogaster ha sido, durante mucho tiempo el ensayo más utilizado con este organismo (Sobels y Vogel, 1976a). Se trata de un ensayo muy bien establecido y estandarizado, que hasta el momento es el mejor validado en *Drosophila*. Los tipos de daño genético que se pueden detectar con este ensayo son: mutaciones puntuales, deleciones y ciertos tipos de aberraciones cromosómicas. Así, una gran parte de los datos disponibles sobre la genotoxicidad de un total de 750 compuestos químicos evaluados provienen de la información generada por el *SLRLT* (Vogel *et al.*, 1999). No obstante, como ensayo *in vivo* no está muy claro su poder predictivo en relación a la carcinogenicidad en mamíferos, debido probablemente a que no es adecuado realizar esta extrapolación. Por otro lado, es un ensayo que consume bastante tiempo y también es costoso de realizar en el laboratorio, por la elevada cantidad de material que se requiere.

Otras desventajas del *SLRLT* son las siguientes:

- Para mutágenos débiles o no mutágenos se debe analizar un número elevado de cromosomas antes de poder confirmar un resultado.
- Existe la posibilidad de que las células portadoras de mutaciones sean eliminadas durante alguna de las fases del proceso de meiosis y, por lo tanto, pase desapercibida la actividad genotóxica del agente evaluado.
- Tiene una baja sensibilidad cuando se ensayan compuestos que no son agentes de acción directa o promutágenos de activación simple.

De esta manera, y por las razones anteriormente mencionadas, durante los últimos años los ensayos de mutagenicidad que utilizan células somáticas (en lugar de células germinales) han ido adquiriendo más importancia y un mayor interés no sólo por el hecho de que representan un complemento, sino porque también son una atractiva alternativa al *SLRLT*, dada su rapidez y capacidad para detectar una gran variedad de alteraciones genéticas, incluyendo la recombinación mitótica (Graf *et al.*, 1984).

1.4.1. Ensayos de mutación y recombinación somáticas (SMART)

Los ensayos de mutación y recombinación somáticas en *D. melanogaster* son ensayos *in vivo* que permiten la detección rápida y barata de agentes genotóxicos. Se basan en la detección y cuantificación de eventos mutacionales y recombinacionales en células somáticas de un organismo eucariota.

Se han descrito dos sistemas de ensayo diferentes, uno que emplea marcadores de las alas (Graf *et al.*, 1984) y el otro que emplea marcadores que afectan la pigmentación de los ojos (Vogel y Zijlstra, 1987a). Estas pruebas se basan en la pérdida de heterocigisidad de los genes normales en las células de los discos imaginales de las larvas, lo que causa la formación de clones o sectores de células mutantes, expresándose fenotípicamente en clones mutantes en las alas o en los ojos de las moscas adultas.

Los principales ensayos *SMART* descritos son los siguientes:

a) El ensayo *UZ* (*white-zeste* inestable)

Éste fue desarrollado por Rasmuson *et al.* (1978) y se basa en la detección de mutaciones somáticas en el locus *white* inestable, dando lugar a sectores rojos sobre el fondo amarillo del ojo. La inestabilidad es causada por un elemento transponible insertado dentro de la región reguladora del locus *white*, cuya movilización (espontánea o inducida) produce el cambio del fenotipo *zeste* (amarillo) al salvaje (rojo) (Xamena *et al.*, 1988). Las alteraciones genéticas detectadas en este ensayo son mutaciones génicas y pequeñas deleciones.

b) El ensayo *w/w'* (*white/white-ivory*)

Desarrollado por Green *et al.* (1986), se basa en la reversión somática del fenotipo salvaje (w^+) del color del ojo w' (blanco-amarillo). Para incrementar el número de células diana, se utiliza una cepa portadora de una tetraplicación en tándem del alelo w' . Los análisis moleculares apuntan a que la inducción de reversiones (espontáneas o inducidas) está asociada a la pérdida total o parcial de un fragmento de 2,9 kb originada en la mutación w' por un mecanismo todavía no muy bien establecido (Suárez *et al.*, 1996).

c) El ensayo w/w^+ (*white/white*⁺)

Descrito por Vogel y Zijlstra (1987b), se basa en la pérdida de heterocigosidad y la consiguiente expresión del alelo *white*, dando lugar a clones mutantes que se cuantifican por la aparición de sectores blancos en los ojos (rojos) de individuos adultos. Estas alteraciones son producidas, principalmente, por recombinación mitótica entre cromosomas homólogos o mutación puntual.

d) El ensayo mwh/flr^3 (*multiple wing hairs/flare*)

Esta prueba fue desarrollada por Graf *et al.* (1984) y constituye el único ensayo descrito que utiliza marcadores de alas para el estudio de mutación y recombinación somáticas. El ensayo se lleva a cabo con larvas transheterocigóticas para los marcadores *multiple wing hairs* y *flare* y se basa en la pérdida de heterocigosidad (LOH), dando lugar a la expresión de los genes recesivos *mwh* y *flr*³ sobre el fondo normal del ala.

1.4.2. El ensayo SMART en alas

Las células diana utilizadas en este ensayo son los discos imaginales, los cuales corresponden a los primordios celulares presentes en las larvas y que dan lugar a diferentes partes del cuerpo durante el proceso de pupación, en particular, las que dan origen al ala en el adulto. Como ya se ha comentado previamente, este ensayo se basa en el principio de la pérdida de heterocigosidad de genes marcadores (*mwh* y *flr*³) en las células de los discos imaginales de las larvas, que pueden dar lugar a la formación de clones mutantes que se expresarán como sectores distinguibles por su aspecto fenotípico en las alas de los individuos adultos.

Lo importante de esta prueba es la capacidad de detectar un amplio rango de sucesos mutacionales, incluidas la recombinación mitótica y la conversión génica. La capacidad de detectar la recombinación somática hace que sea de gran interés para la identificación de agentes potencialmente carcinogénicos, ya que se ha señalado que la recombinación mitótica puede ser un mecanismo importante en la pérdida de heterocigosidad en las células,

un proceso que puede ser crucial para la carcinogénesis (Stettler y Sengstag, 2001; Wijnhoven *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006).

Además de las características previamente señaladas, el ensayo *SMART* en alas presenta las siguientes ventajas:

- En comparación con los ensayos que utilizan marcadores en los ojos, el número de células de los discos imaginales de las alas es mucho mayor que el de los discos oculares. Aunque todos los discos imaginales comienzan su división al mismo tiempo, los oculares cesan su división a las 80 horas, mientras que los alares finalizan su división 120-140 horas después. Esto implica que, al final del período larvario, un mayor número de células diana habrán estado potencialmente expuestas a los agentes genotóxicos evaluados.
- El costo económico que supone realizar este ensayo es bajo, debido a que sólo representa un 5-10% de lo que cuesta el ensayo *SLRL* (Vogel *et al.*, 1999).
- Las moscas tratadas pueden ser conservadas en etanol al 70% para un análisis posterior, sin que se pierdan las características de los sectores mutantes y/o recombinantes (Graf *et al.*, 1984).
- Posee una gran sensibilidad para detectar un amplio rango de daño genético: mutaciones puntuales, deleciones, algunos tipos de aberraciones cromosómicas, recombinación y conversión génica (Graf *et al.*, 1984).
- Permite hacer estudios de antigenotoxicidad con agentes específicos o de mezclas complejas (e.g. Rizki *et al.*, 2001; 2002).

Las ventajas indicadas han hecho que el ensayo *SMART* en alas se haya utilizado ampliamente para la evaluación genotóxica de un amplio número de agentes químicos y físicos, con diferentes mecanismos de acción (Graf *et al.*, 1986; 1989). Además, dada su alta versatilidad también se ha aplicado para el estudio de los efectos antimutagénicos y otros efectos moduladores de compuestos químicos y de mezclas complejas (Graf *et al.*, 1998). En general, estos estudios de modulación genotóxica han demostrado que el ensayo

SMART en alas de *Drosophila* es una excelente herramienta para este tipo de estudios, debido a su alta sensibilidad, rapidez y bajo costo. Así, hasta la fecha con el ensayo *SMART* en alas se han evaluado los efectos moduladores de muchos compuestos, entre los cuales se pueden destacar el ácido ascórbico (Kaya *et al.*, 2002), el café (Abraham y Graf, 1996) y el ácido tánico (Lehmann *et al.*, 2000), así como también los efectos moduladores de algunos metales pesados, tales como el selenio, el arsénico y el cadmio (Rizki *et al.*, 2001; 2002; 2004).

1.4.3. El ensayo del cometa

El ensayo del cometa, conocido también como electroforesis alcalina en gel de células individuales (SCG: *Single cell gel electrophoresis assay*), es una prueba sensible, rápida y sencilla que permite la cuantificación y análisis del daño genético causado por diferentes agentes químicos y físicos (Fairbairn *et al.*, 1995). Este ensayo tiene la capacidad de detectar el daño genético causado por roturas del DNA de doble y simple cadena, sitios álcali-lábiles, daño oxidativo, y enlaces DNA-DNA, DNA-proteína, o aductos, así como el daño genético debido a deficiencias en la reparación del DNA (Singh *et al.*, 1988; Collins, 2004).

El ensayo del cometa comprende una metodología básica, la cual se puede resumir en siete etapas: (1) las células de interés se suspenden en agarosa y se colocan en portaobjetos previamente cubiertos con agarosa; (2) se procede a la lisis de las células bajo una alta concentración de sales para eliminar las proteínas celulares y liberar el DNA; (3) se lleva a cabo una exposición alcalina (usualmente, pH > 13) para el desenrollamiento y relajación del DNA, permitiendo la expresión de roturas de cadena simple y de sitios álcali lábiles; (4) se lleva a cabo una electroforesis bajo condiciones alcalinas (pH > 13), la cual permite que las roturas del DNA o los bucles relajados migren bajo el efecto del campo eléctrico hacia el ánodo; (5) a continuación, se procede a la neutralización de las condiciones alcalinas; (6) se procede a la tinción del DNA y a la visualización microscópica (mediante fluorescencia) de los cometas; y (7)

finalmente se procede al recuento y análisis de los niveles de daño genético observado.

El principio del ensayo se basa en que el DNA no dañado mantiene una asociación altamente organizada con una matriz de proteínas en el núcleo. Cuando el DNA es dañado, esta organización es alterada y las cadenas simples de DNA pierden su estructura compacta y se relajan, expandiéndose fuera de su cavidad. Cuando el campo eléctrico es aplicado, el DNA, que tiene una carga negativa, migra hacia el ánodo. Las cadenas de DNA no dañado son demasiado grandes, y no migran de la cavidad, mientras que el DNA dañado presenta fragmentos, los cuales se pueden mover fácilmente a través de la agarosa. Así, la cantidad de DNA que migra es una medida de la cantidad de DNA dañado en la célula (Östling y Johanson, 1984).

Las principales ventajas que presenta este ensayo son las siguientes: a) se pueden obtener datos a nivel de células individuales, lo cual permite un análisis estadístico más potente; b) sólo se necesita un pequeño número de células por muestra (~ 10.000); c) es capaz de detectar niveles bajos de daño genético; d) se puede utilizar cualquier célula eucariota; e) el tiempo necesario para completar un estudio es muy corto; y f) es un ensayo relativamente económico de realizar (Tice *et al.*, 2000).

La gran sensibilidad del ensayo del cometa y su capacidad para detectar daño genético en células individuales lo ha convertido en una herramienta rápida y en creciente expansión, que puede predecir fácilmente la genotoxicidad de compuestos de interés (Fairbairn *et al.*, 1995).

A pesar de que en los inicios el ensayo del cometa fue desarrollado para medir la variación del daño en el DNA y la capacidad de reparación dentro de una población de células de mamífero, en la última década sus aplicaciones van desde la biomonitorización de poblaciones humanas y organismos centinelas, a procesos de reparación del DNA y otros estudios de toxicología genética (Tice *et al.*, 2000; Olive y Banáth, 2006). En este último campo este ensayo ha tenido una gran importancia y sus aplicaciones incluyen: 1) ensayos de exploración; 2) estudios mecánicos para distinguir el daño producido en los cromosomas por genotoxicidad y citotoxicidad; 3) estudios mecánicos

para distinguir entre carcinógenos genotóxicos y carcinógenos no genotóxicos; y 4) puede incluirse en las baterías de ensayos *in vitro* e *in vivo* (Tice *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2004).

Por otro lado, la utilización del ensayo del cometa en estudios *in vivo* ha experimentado un gran aumento en los últimos años. Este amplio uso se debe principalmente a que es un ensayo muy versátil, en donde cualquier tipo de tejido puede ser empleado, tiene la capacidad de detectar diferentes tipos de daño genético y sólo requiere un bajo número de células. Dadas estas ventajas, el ensayo del cometa se ha convertido en un ensayo ideal en comparación a otros ensayos *in vivo* (Hartmann *et al.*, 2003).

1.4.3.1. Ensayo del cometa en *Drosophila*

Drosophila es uno de los pocos organismos no mamíferos que se emplea actualmente en los estudios de toxicología genética, con la ventaja adicional de que este organismo puede activar promutágenos de forma similar a lo que sucede en humanos. Además, *D. melanogaster* ha sido recomendado como animal modelo alternativo para estudios que involucren la experimentación con animales por el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM) (Benford *et al.*, 2000).

El ensayo del cometa es una de las técnicas que más se ha extendido en la evaluación de genotoxicidad, desarrollándose en diferentes organismos, hasta su aplicación en humanos (Dhawan *et al.*, 2009). Como era de suponer, *D. melanogaster* ha sido uno de los múltiples modelos *in vivo* para los que se ha adaptado el ensayo del cometa. Los trabajos que utilizan *Drosophila* y el ensayo del cometa se han llevado a cabo tanto para evaluar la genotoxicidad de diversos compuestos químicos (Mukhopadhyay *et al.*, 2004; Siddique *et al.*, 2005a b), como también para estudios mecanísticos relacionados con la reparación del DNA (Bilbao *et al.*, 2002). En general, los resultados obtenidos en estos estudios demuestran que: 1) el ensayo del cometa *in vivo* en *Drosophila* es una herramienta sencilla y rápida para evaluar el daño genético; 2) los estudios de validación llevados a cabo con el ensayo del cometa en

Drosophila muestran una buena relación dosis-respuesta con agentes genotóxicos de acción conocida (p. ej. EMS y MMS); 3) ha demostrado su utilidad en la evaluación genotóxica de algunos compuestos químicos y contaminantes ambientales; y 4) tanto los neuroblastos como las células del intestino de *Drosophila* son adecuados para su uso en el ensayo del cometa.

Como conclusión, los estudios llevados a cabo hasta ahora en *Drosophila* han demostrado que este organismo es un buen modelo alternativo para la evaluación genotóxica *in vivo* de agentes químicos por medio del ensayo del cometa (Dhawan *et al.*, 2009) aunque tan solo dos tipos celulares (neuroblastos y células intestinales) se han utilizado para llevar a cabo el ensayo. Por lo tanto, parece interesante utilizar otras células blanco que puedan ser también útiles en la aplicación del ensayo del cometa con *Drosophila*.

1.4.3.2. Utilización de células de hemolinfa

La hemolinfa es un líquido circulatorio presente en los invertebrados, tales como insectos, moluscos y anélidos. Es considerado como un fluido análogo a la sangre en los vertebrados. Por un lado, la hemolinfa está compuesta de agua, sales inorgánicas (Na^+ , Cl^- y Ca^{2+}) y compuestos orgánicos (carbohidratos, proteínas y lípidos). Por otro lado, la hemolinfa contiene células sanguíneas en suspensión llamadas hemocitos, los cuales cumplen una función importante en el sistema inmune de los artrópodos.

Las principales funciones de la hemolinfa son las siguientes:

- Transporte de nutrientes hacia los tejidos y de materiales de desecho a los órganos excretores.
- Coagulación y cicatrización de heridas.
- Inmunidad frente a la invasión microbiana.
- Transporte de oxígeno y hormonas.

De esta manera, y debido a que la hemolinfa de los invertebrados puede estar involucrada en diferentes funciones esenciales para el organismo, tales como

las inmunitarias, metabólicas y de transporte de sustancias, este tejido ha cobrado un gran interés para los investigadores de diferentes áreas de la biología.

En los últimos años, se ha demostrado que la hemolinfa es un excelente material para los estudios de genotoxicidad *in vivo*, debido a que sus células muestran una alta sensibilidad y son fáciles de obtener y manipular (Mersch *et al.*, 1996). Además, los hemocitos inmersos en la hemolinfa pueden estar directamente expuestos a las sustancias tóxicas que entran al organismo, lo cual lo convierte en un tejido de alto interés para llevar a cabo estudios de genotoxicidad (Villela *et al.*, 2006; 2007). A pesar de que *D. melanogaster* ha sido ampliamente utilizada como modelo de estudio en el área de la toxicología genética, hasta ahora no se había puesto atención sobre los posibles efectos de diferentes agentes genotóxicos en las células de la hemolinfa.

1.4.3.3. Hemocitos de *Drosophila*

Al igual que en otros invertebrados, la hemolinfa de *Drosophila* contiene hemocitos que pueden circular libremente por las cavidades del cuerpo o estar sésiles, asociados a diferentes tejidos y órganos (Holz *et al.*, 2003). Éstos participan activamente en el sistema inmunitario y se pueden dividir en tres linajes celulares: plasmocitos, células cristal y lamelocitos (Rizki y Rizki, 1980). Los plasmocitos cumplen funciones de fagocitosis parecidas a las células del linaje de monocitos/macrófagos de los mamíferos, mientras que las células cristalinas tienen enzimas necesarias para la melanización, la cual se cree conlleva a la producción de radicales libres citotóxicos que eliminan a los patógenos; finalmente, los lamelocitos son un tipo de células que participan en el reconocimiento, encapsulación y eliminación de los patógenos (Meister y Lagueux, 2003; Meister, 2004)

Una de las ventajas de trabajar con hemocitos radica en que son relativamente fáciles de obtener y manipular. Además, se pueden obtener durante todo el ciclo de vida de *Drosophila*, tanto en la fase de larva como en la de imago. Sin embargo, en los estadios larvarios, la obtención de hemocitos es más sencilla y el número de células obtenidas es mayor en comparación al

número obtenido en los adultos, especialmente en larvas de tercer estadio (p. ej. 72 horas de edad) (Meister y Lagueux, 2003). El protocolo para obtener hemocitos circulantes desde la hemolinfa es sencillo y no necesita una manipulación excesiva de las células. Así, la metodología usada habitualmente incluye tres pasos: 1) rotura de la cutícula de la larva para que la hemolinfa salga de su interior; 2) obtención y separación de la hemolinfa en una solución salina fría (comúnmente una solución salina de tampón fosfato); y 3) aislamiento de los hemocitos por medio de centrifugación (Irving *et al.*, 2005).

Entre los hemocitos circulantes de la hemolinfa, los más numerosos son las poblaciones de plasmocitos, los cuales representan alrededor del 95% del total de hemocitos, mientras las células cristal y los lamelocitos representan tan solo el 5%. En relación a la cantidad de hemocitos, los individuos normales pueden contener 1000-3000 hemocitos por 1 μ L de hemolinfa (Brehélin, 1982) y, a nivel individual, entre 1000-1500 células por larva (Braun *et al.*, 1998). De esta forma, no se necesita un gran esfuerzo para obtener un número suficiente de células, ya que basta sólo con un número reducido de individuos.

En resumen, las células de la hemolinfa de *Drosophila* ofrecen una serie de ventajas y facilidades que permiten su aplicación en distintas áreas de la biología, especialmente en el campo de la inmunología, donde han desarrollado un papel importante en el entendimiento de los procesos involucrados en la respuesta inmune de los invertebrados (Meister y Lagueux, 2003; Meister, 2004). Sin embargo, dado que los hemocitos forman parte de un fluido que circula por todo el organismo y pueden estar en contacto con sustancias tóxicas, es interesante analizar los posibles efectos genotóxicos de agentes físicos y químicos sobre este tipo de células en *D. melanogaster*.

2. OBJETIVOS

Esta tesis se enmarca dentro de la línea de investigación desarrollada en el Grupo de Mutagénesis de la UAB sobre la determinación de mecanismos de genotoxicidad de los metales pesados empleando *Drosophila* como modelo. En este contexto, el presente trabajo se ha llevado cabo para cubrir los objetivos que se especifican a continuación:

1. Evaluar la genotoxicidad de los metales pesados mercurio, plomo y níquel utilizando el ensayo de mutación y recombinación somáticas (*SMART*) en alas de *D. melanogaster*.
2. Estudiar la posible interacción de estos metales con la radiación gamma para aportar información sobre sus mecanismos de acción genotóxica en *D. melanogaster* y sobre su papel modulador de la reparación.
3. Poner a punto el ensayo del cometa *in vivo* en hemocitos de *D. melanogaster* utilizando tres agentes genotóxicos de acción bien conocida: metanosulfonato de etilo, dicromato potásico y radiación gamma.
4. Finalmente, evaluar la genotoxicidad de los tres metales objeto de estudio con el ensayo del cometa en hemocitos de *D. melanogaster*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ensayo *SMART* en alas

3.1.1. Compuestos químicos utilizados

Para este estudio se utilizaron los siguientes compuestos: cloruro de mercurio (HgCl_2 , $\geq 99,5\%$ de pureza, N° CAS 7487-94-7), cloruro de metilmercurio (CH_3HgCl , $\geq 98\%$ de pureza, N° CAS 115-09-3), cloruro de plomo (PbCl_2 , 98% de pureza, N° CAS 7758-95-4), nitrato de plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\geq 99\%$ de pureza, N° CAS 10099-74-8), cloruro de níquel (NiCl_2 , 98% de pureza, N° CAS 7718-54-9), sulfato de níquel ($\text{NiSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, $\geq 99\%$ de pureza, N° CAS 10101-97-0), y metanosulfonato de etilo (EMS, 100% de pureza, N° CAS 62-50-0). Todos estos compuestos fueron obtenidos de la casa comercial Sigma-Aldrich S.A. (España). Los compuestos HgCl_2 , PbCl_2 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, NiCl_2 , $\text{NiSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ y el EMS se disolvieron en agua destilada, mientras que el CH_3HgCl se disolvió en un 3% de etanol y 1% de Tween 80 (Panreac Química, S.A.). Los controles negativos utilizados en este estudio fueron agua destilada y 3% de etanol-Tween 80, mientras que como control positivo se utilizó el EMS.

3.1.2. Cepas utilizadas

Para realizar el ensayo de mutación y recombinación somáticas en alas se utilizaron las cepas *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3) y *flare* (*flr*³, 3-38), ambas portadoras de mutaciones que afectan de forma visible el fenotipo de los tricomas o pelos de las alas de *D. melanogaster*.

La mutación *mwh* se ubica en el cromosoma 3, es recesiva, su origen es espontáneo y resulta viable en homocigosis. Su manifestación fenotípica se caracteriza por la aparición de tres o más tricomas en cada célula alar en lugar de uno por célula, que es el fenotipo normal (Figura 2). Los individuos de esta cepa presentan la siguiente constitución genética *y; mwh jv, y*. Los dos marcadores adicionales *yellow* (*y*, 1-0,0) y *javelin* (*jv*, 3-19,2) se caracterizan

por otorgar un color amarillo al cuerpo y por la presencia de pelos y quetas cilíndricas, respectivamente.

La mutación *flr*³ está situada también en el cromosoma 3, es recesiva y originalmente se obtuvo por tratamientos con metanosulfonato de etilo; produce letalidad en homocigosis en la línea germinal, pero no en las células somáticas. El fenotipo es bastante variable ya que se pueden observar desde pelos cortos, gruesos y deformes, hasta pelos amorfos con aspecto globular (Figura 2). Los individuos de esta cepa presentan la constitución genética *flr*³/*In* (3LR) *TM3*, *Bd*⁶. El marcador *Bd*⁶ es dominante y de origen espontáneo, afectando el borde del ala y dándole un fenotipo aserrado. La inversión múltiple *TM3* incluye inversiones paracéntricas en ambos brazos del cromosoma 3 y una inversión pericéntrica que impide la aparición de fenotipos recombinantes en la zona, lo que afecta a los individuos heterocigotos.

La cepa *flr*³/*In* (3LR) *TM3*, *Bd*⁶ es transheterocigótica, de manera que la inversión evita la posibilidad de que los marcadores puedan aparecer en posición *cis*. El hecho de que las mutaciones sean letales en homocigosis posibilita el mantenimiento de la heterocigosidad de la cepa, ya que los individuos homocigotos para estas mutaciones no son viables.

Ambas cepas fueron proporcionadas inicialmente por el Prof. F. E. Würzler (Universidad de Zürich, Suiza) en el año 1990 y se han mantenido desde entonces en nuestro laboratorio, bajo las mismas condiciones de mantenimiento. Es decir, empleando frascos de vidrio de 125 mL de capacidad, con 25 mL de medio de cultivo convencional compuesto de harina de maíz, levadura, cloruro sódico y agar. La temperatura de mantenimiento fue de 25 ± 1 °C y una humedad relativa de ~ 60%.

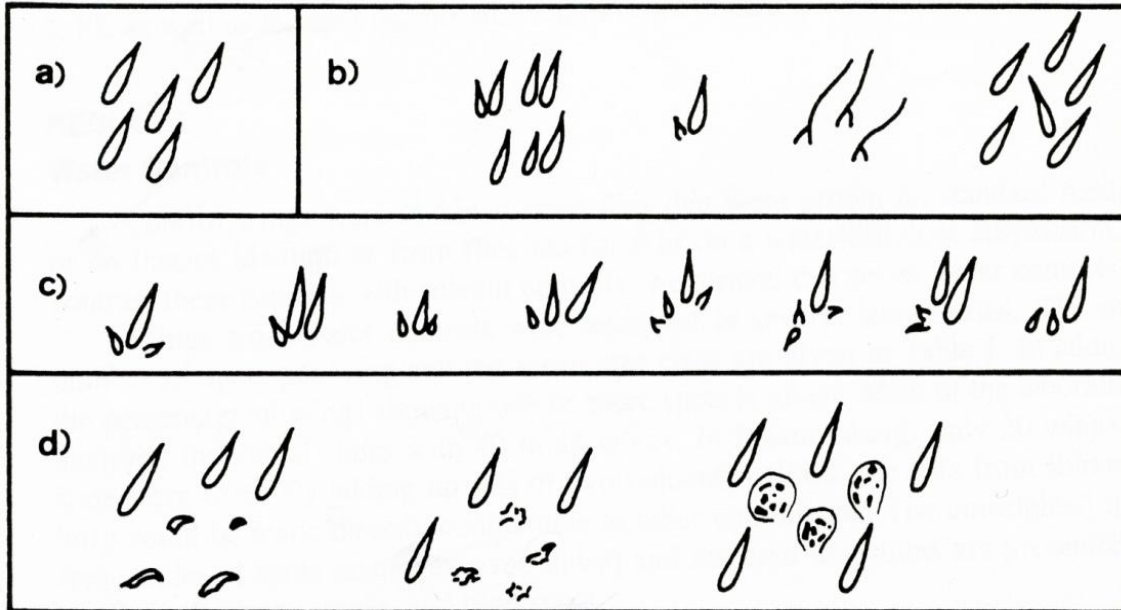


Figura 2. Esquema de los tricomas en la superficie del ala: a) fenotipo normal; b) diferentes tipos de tricomas no considerados *mwh* ni *flr³*; c) diferentes manifestaciones fenotípicas del genotipo *mwh*; d) manifestaciones fenotípicas del genotipo *flr³* (Tomado de Graf *et al.*, 1984).

3.1.3. Cruzamientos

En el ensayo *SMART* en alas se pueden llevar a cabo los siguientes tipos de cruzamientos:

1º Cruzamiento estándar: ♀ *mwh/mwh* x ♂ *flr³/TM3, Bd^f*

2º Cruzamiento recíproco: ♀ *flr³/TM3, Bd^f* x ♂ *mwh/mwh*

Ambos cruzamientos dan lugar a una descendencia idéntica en relación a su constitución genética. Sin embargo, en este trabajo se ha optado por utilizar el cruzamiento recíproco debido a que, en nuestro laboratorio, las hembras de la cepa *flr³* son más fértiles que las de la cepa *mwh*. De esta manera, con este cruce es más fácil obtener un número de larvas suficientemente elevado para poder realizar los distintos tratamientos.

3.1.4. Tratamiento de larvas

En el ensayo *SMART* de alas se pueden realizar diferentes tipos de tratamientos, según el tiempo de exposición y la edad de la larva, clasificándose en tratamientos agudos (exposición de corta duración) y crónicos (exposición de larga duración) (Figura 3).

En el presente estudio se optó por escoger un tratamiento crónico de larvas (de tercer estadio), debido a que este tipo de tratamiento es ampliamente utilizado y recomendado para evaluar compuestos cuya genotoxicidad es desconocida (Graf *et al.*, 1984). Para esto, se recogieron huevos durante períodos de 8 horas en botes de cultivo con medio estándar. Luego, las larvas de 72 ± 2 horas de edad fueron extraídas, lavadas y transferidas a tubos de plástico desechables conteniendo 4,5 g de medio instantáneo de *Drosophila* (Carolina Biological Supply Co., Burlington, NC, EEUU) hidratado con 10 mL de las diferentes concentraciones de los metales a evaluar. En cada serie se trataron entre 50 y 100 larvas. Paralelamente a la realización de los tratamientos, se llevaron a cabo los respectivos controles negativos y positivos.

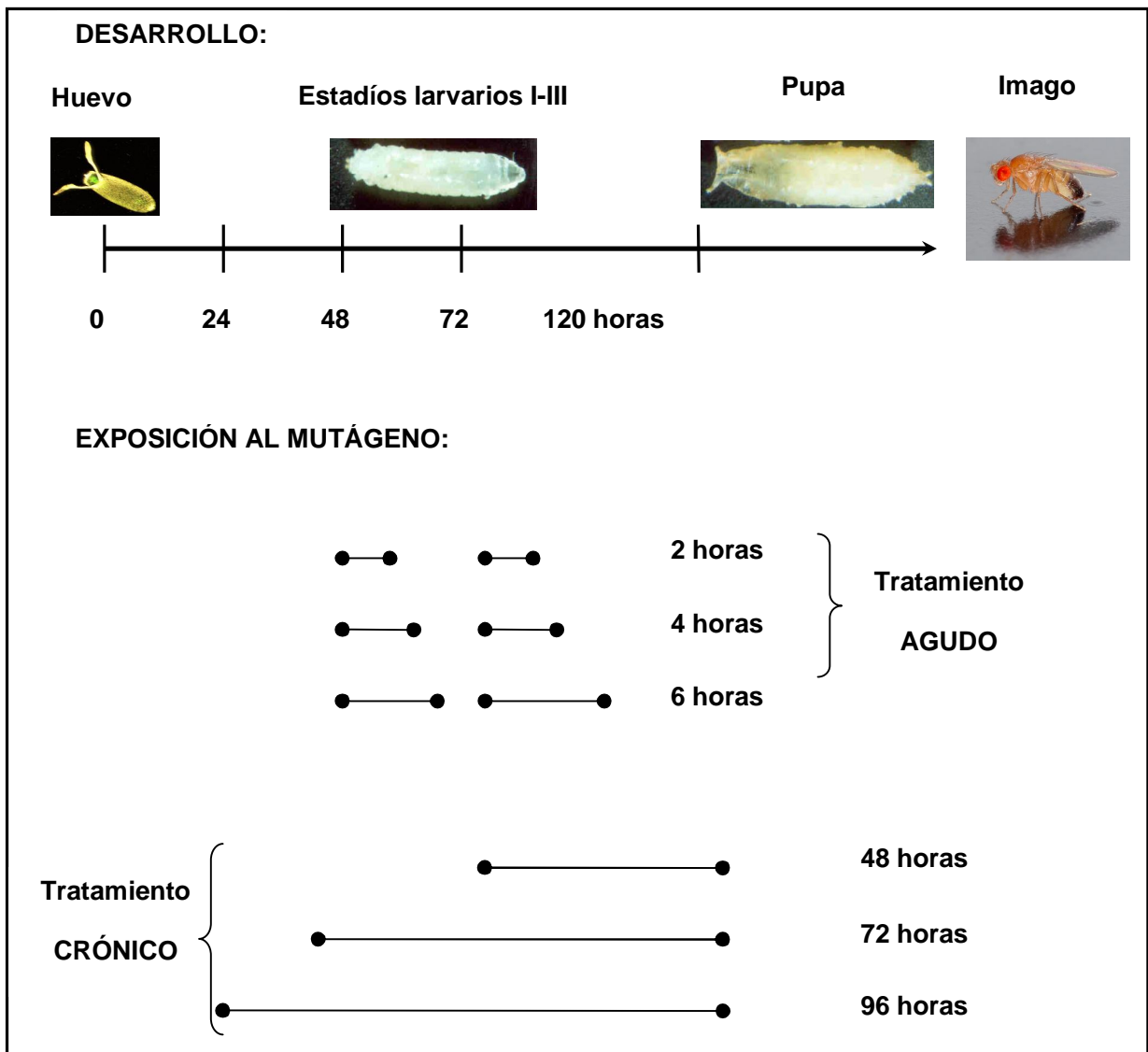


Figura 3. Tipos de tratamientos posibles, según el tiempo de exposición y la edad de las larvas tratadas. Adaptado de Graf *et al.* (1984).

3.1.5. Cotratamientos de larvas

El cotratamiento supone tratar con dos agentes distintos a los mismos individuos para ver sus posibles interacciones. Para este tipo de tratamiento se utilizaron larvas de 48 ± 2 horas de edad, las cuales fueron expuestas a diferentes concentraciones de metales. Al cabo de 24 horas, las larvas fueron extraídas, lavadas y transferidas a tubos de plástico que contenían medio instantáneo de *Drosophila*, para ser posteriormente expuestas a radiación gamma (radiación- γ). Después de la irradiación, las larvas fueron extraídas nuevamente y transferidas a viales con las mismas concentraciones de metales

usadas antes de la exposición a la radiación- γ . En cada serie se trataron entre 50 y 100 larvas.

La exposición de las larvas a la radiación- γ se llevó a cabo con un irradiador ^{137}Cs Modelo IBL 437C (Schering CIS Bio international, Alemania), proporcionado por la Unitat Tècnica de Protecció Radiològica (UTPR) de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Todos los experimentos fueron realizados a una temperatura de 25 ± 1 °C con una humedad relativa de $\sim 60\%$. Finalmente, las moscas adultas sobrevivientes de cada experimento, se sacrificaron mediante tratamiento prolongado con éter etílico y se conservaron en tubos con 70% de etanol.

3.1.6. Preparación de las alas

Las moscas obtenidas del cruce mwh/flr^3 pertenecen a fenotipos perfectamente diferenciables: alas con el borde normal (mwh/flr^3) y alas con el borde aserrado (mwh/Bd^s). Las moscas analizadas rutinariamente para el ensayo SMART de alas corresponden a las transheterocigotas mwh/flr^3 ; las moscas mwh/Bd^s únicamente se analizan cuando se quiere cuantificar la proporción de actividad genotóxica debida a eventos de recombinación mitótica (Zordan *et al.*, 1991; Graf *et al.*, 1992).

Antes de la preparación de las alas, las moscas conservadas en etanol se lavan con agua destilada para retirar los restos de etanol. Después, las alas se embeben en solución Faure (30 g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 50 g de hidrato de cloral y 50 mL de agua) y con unas pinzas finas son separadas del cuerpo para luego ser montadas en forma alineada y extendida sobre un portaobjetos hasta completar 48 alas, por cada portaobjetos. Las alas montadas se dejan secar por 48 horas; posteriormente, se ponen unas gotas de solución de Faure sobre las alas y se cubren con un cubreobjetos. Finalmente, se colocan unas pesas de entre 150 y 250 g sobre los portaobjetos durante más de 24 horas, hasta que queden completamente secos. Terminado este proceso ya se puede proceder a realizar el análisis microscópico de las alas.

3.1.7. Análisis microscópico de las alas

Tanto la parte dorsal como la ventral de las alas de *D. melanogaster* fueron analizadas bajo un microscopio a 400 aumentos. El análisis microscópico consistió en la localización de clones o células individuales que manifestaran algún fenotipo mutante *mwh* o *flr*³ sobre el fondo de células de fenotipo salvaje. Para cada clon encontrado se registró el tamaño y el sector del ala en que fue encontrado. Cabe señalar que, para considerarse que dos sectores son independientes, éstos deben estar aislados por tres o más filas de células de fenotipo salvaje, según lo recomendado por Graf *et al.* (1984).

Se consideraron sólo los sectores encontrados en las siguientes regiones distales del ala: A, B, C', C, D', D, E (Graf *et al.*, 1984) (Figura 4).

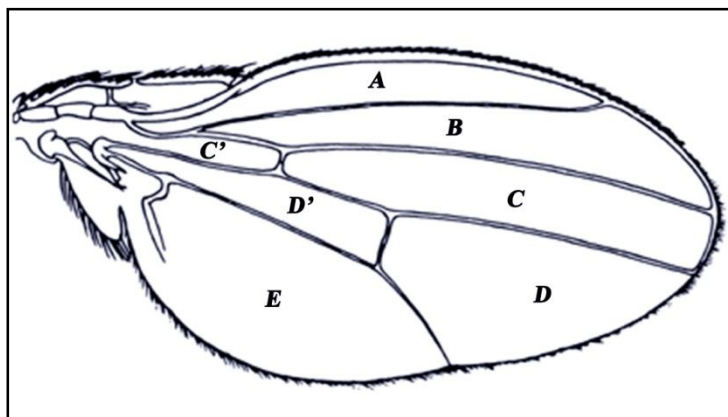


Figura 4. Vistal dorsal del ala de *D. melanogaster*. Regiones A-E analizadas en la superficie del ala. Modificado de Graf *et al.* (1984).

3.1.8. Clasificación de los sectores mutantes

Los tipos de sectores o clones mutantes encontrados se clasificaron de la siguiente manera (ver Figura 5):

a) Sectores simples *mwh*. Corresponden a aquellos cuyas células presentan tres o más pelos, a diferencia de los de fenotipo salvaje, que presentan un solo pelo o tricoma por célula. Las alteraciones genéticas que pueden originar este fenotipo son las siguientes: mutación puntual, delección, recombinación mitótica entre los loci *mwh* y *flr*³ y no disyunción (Figura 6).

b) Sectores simples *flr*³. Corresponden a aquellas células que presentan una expresión fenotípica variable, desde pelos cortos, gruesos y deformes, hasta pelos amorfos de apariencia globular. Este fenotipo no suele manifestarse completamente en sectores de menos de cuatro células. Tampoco es frecuente encontrar clones *flr*³ muy grandes, debido posiblemente a su efecto letal. Este fenotipo se debe, principalmente, a la mutación puntual o a la deleción del alelo salvaje, aunque también se origina por entrecruzamiento doble entre el locus *flr*³ y el centrómero, o entre los loci *mwh* y *flr*³ (Figura 6).

c) Sectores dobles. Están formados por células adyacentes de fenotipo *mwh* y *flr*³, respectivamente. Estos sectores se originan exclusivamente por recombinación mitótica entre el locus *flr*³ y el centrómero (Figura 6).

Como criterio general, los diversos sectores encontrados en las alas se agrupan en tres categorías distintas:

- Clones *mwh* sencillos pequeños, implican la presencia de una o dos células mutantes *mwh*.
- Clones *mwh* grandes, corresponden a tres o más células y, al igual que los primeros, están formados por células *mwh*.
- Clones dobles, formados por sectores *mwh* y *flr*³.

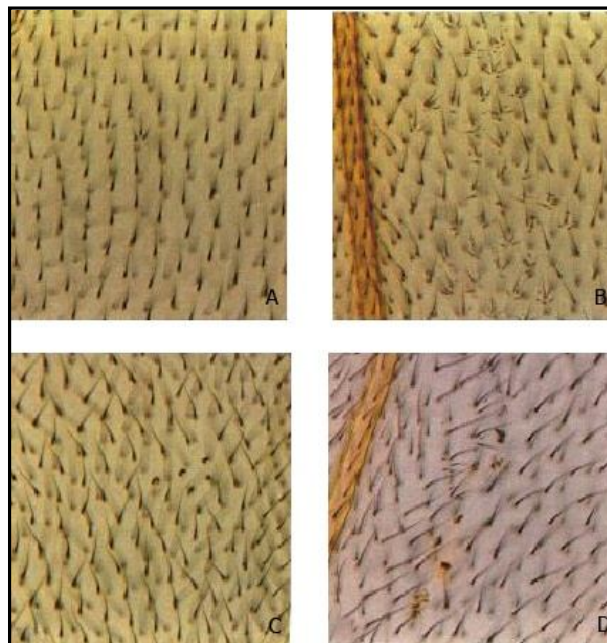


Figura 5. Trichomas de la parte dorsal de las alas en *Drosophila*. A. Sector simple pequeño *mwh*; B. Sector simple grande *mwh*; C. Sector simple *flr*³; D. Sector doble.

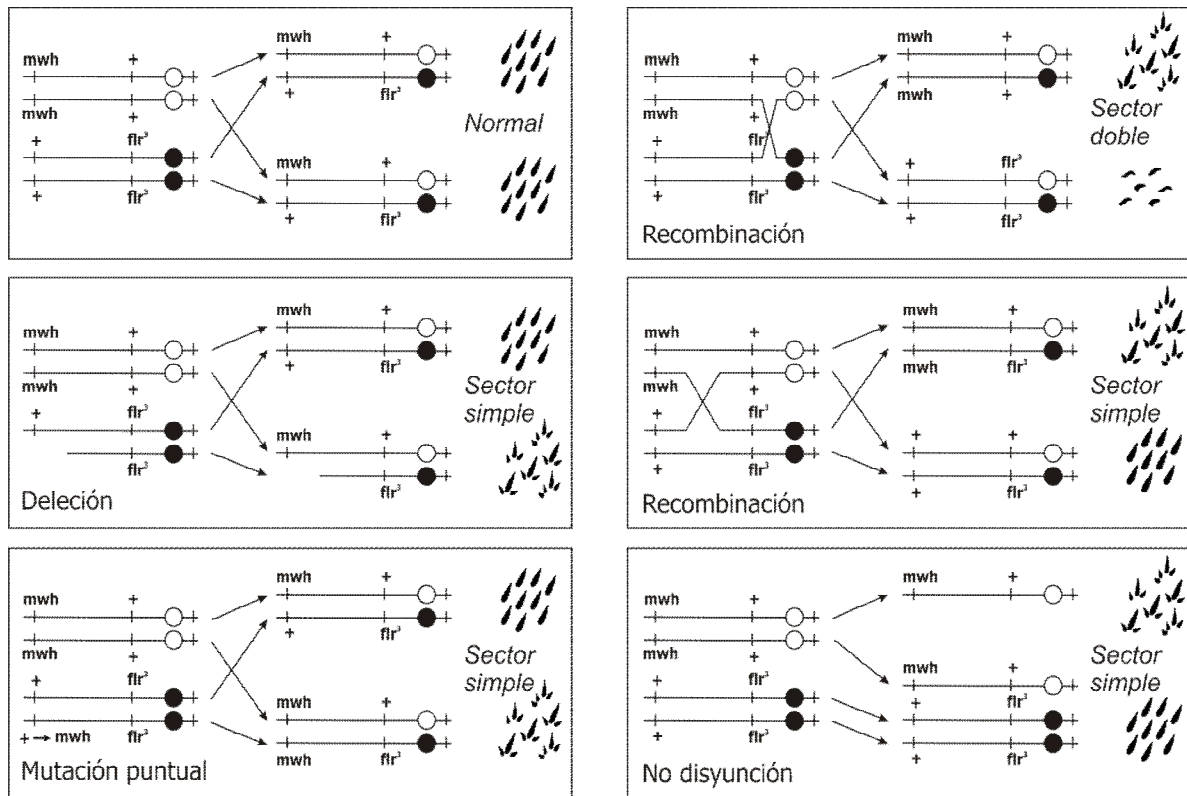


Figura 6. Anomalías genéticas detectadas en el ensayo SMART de alas (Graf *et al.*, 1984).

3.1.9. Análisis de los datos

3.1.9.1. Evaluación de la genotoxicidad

Para la evaluación de los efectos genotóxicos de los compuestos de mercurio, plomo y níquel ensayados se utilizó la prueba de la doble hipótesis propuesta por Frei y Würzler (1988). Esta prueba estadística determina si la frecuencia de mutación que se encuentra en la serie tratada difiere significativamente de la hallada en el control, que corresponde a la frecuencia espontánea de mutación. La formulación de dos hipótesis alternativas permite emitir un diagnóstico estadístico, de manera que el resultado puede clasificarse como positivo, débil positivo, negativo o inconcluyente (Selby y Olson, 1981). Estas hipótesis son:

- Hipótesis nula (H_0): no hay diferencia en la frecuencia de mutación entre el tratamiento y el control.

- Hipótesis alternativa (H_A): el tratamiento supone un incremento de m veces la frecuencia de mutación comparada con la frecuencia esperada por mutación espontánea. El factor de multiplicación m se fijó de forma empírica, en función de las frecuencias espontáneas observadas y siguiendo la práctica común en otros ensayos de genotoxicidad. Los valores de m utilizados fueron: 2 para clones pequeños y totales y 5 para clones grandes y dobles, ya que ambos tipos aparecen con una tasa de mutación espontánea muy baja.

Si se rechaza H_0 , implica que el tratamiento origina un incremento significativo de la frecuencia de mutación. Si además, se rechaza H_A , significa que el tratamiento no produce el incremento requerido para considerar el compuesto como un claro mutágeno. En este caso se clasifica como mutágeno débil.

Por otro lado, si no se rechaza ninguna de las dos hipótesis, los resultados se consideran inconcluyentes, ya que ambas hipótesis son mutuamente excluyentes y no pueden ser aceptadas a la vez.

En la Tabla 2 se resumen los cuatro posibles diagnósticos, con sus respectivas probabilidades de error, siendo α y β los niveles de significación. El nivel de significación utilizado en este estudio es de 0,05.

De acuerdo con Frei y Würzler (1988), para comprobar las dos hipótesis se pueden utilizar los métodos siguientes:

- La prueba binomial condicional (Kastenbaum y Bowman, 1970; Margolin *et al.*, 1983);
- La prueba para proporciones.

Los dos métodos son en principio equivalentes y tienen la ventaja de que no se necesita estimar la frecuencia de mutación espontánea para comprobar la hipótesis alternativa. Para analizar los datos, se ha aplicado la prueba binomial condicional.

Tabla 2. Alternativas posibles para la aceptación y rechazo de las hipótesis nula (H_0) y alternativa (H_A).

HIPÓTESIS		H_A	
		Aceptada ($1 - \beta$)	Rechazada (β)
H_0	Aceptada $(1 - \alpha)$	INCONCLUYENTE $P = (1 - \alpha)(1 - \beta) = 1 - \alpha - \beta + \alpha\beta$	NEGATIVO $P = (1 - \alpha)\beta = \beta - \alpha\beta$
	Rechazada (α)	POSITIVO $P = \alpha(1 - \beta) = \alpha - \alpha\beta$	DÉBIL POSITIVO $P = \alpha\beta$

Para cada concentración y compuesto evaluado, se calculó la frecuencia de inducción de sectores por célula. Esto permite una comparación de la actividad genotóxica de diferentes agentes o sustancias.

La frecuencia de inducción de sectores mutantes se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$f = (n \cdot 10^{-5}) / NC$$

Donde:

f = frecuencia de inducción de sectores por célula; n = N° de sectores mutantes totales; N = N° de alas analizadas; C = N° de células por ala.

Para este cálculo se consideró que cada ala analizada tiene aproximadamente unas 24.400 células (Alonso-Moraga y Graf, 1989).

3.1.9.2. Evaluación de la interacción

Para analizar las posibles interacciones entre los compuestos de mercurio, plomo y níquel con la radiación- γ , se calculó un factor de interacción (FI) de acuerdo con lo propuesto por Schlesinger *et al.* (1992) y usando la siguiente adaptación de la fórmula aplicada por Katsifis *et al.* (1996):

$$FI = (GM - \text{Control}) - [(G - \text{Control}) + (M - \text{Control})]$$

$$FI = GM - G - M + \text{Control}$$

Donde:

FI es el factor de interacción; G es el promedio de sectores mutantes inducidos por el agente genotóxico (*i.e.*, radiación- γ); M corresponde al promedio de sectores mutantes inducidos por los metales (Hg, Pb, Ni); GM el promedio de sectores mutantes inducidos por los cotratamientos; y Control el promedio de los sectores mutantes inducidos en el control negativo.

De esta manera, un valor de FI negativo indica una interacción antagónica, un FI positivo denota una interacción sinérgica y un FI igual o cercano a cero denota una aditividad de efectos.

Para establecer la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los FI de cotratamientos vs. controles, se utilizó la prueba *a posteriori* de Fisher de la mínima diferencia significativa (LSD). Además, se calcularon los intervalos de confianza del 95% de los FI. El nivel de significación utilizado en este estudio fue del 0,05.

3.2. Ensayo del cometa en *D. melanogaster*

3.2.1. Puesta a punto del ensayo del cometa en hemocitos de *D. melanogaster*

3.2.1.1. Cepa utilizada

Para el ensayo del cometa empleando hemocitos de *D. melanogaster* se utilizó la cepa de tipo salvaje Oregon R⁺, eficiente para todos los tipos de reparación, la cual fue cultivada a 25 ± 1 °C y a 60% de humedad relativa, en medio de cultivo convencional que contiene agar, harina de maíz, cloruro sódico y levadura.

3.2.1.2. Compuestos utilizados

El metanosulfonato de etilo (EMS, 100% de pureza, N° CAS 62-50-0), el dicromato potásico (PDC, CAS N° 7689-03-4, 99,9% de pureza) y la feniltiourea (PTU, $\geq 95\%$ de pureza, N° CAS 103-85-5) fueron obtenidos de la casa comercial Sigma-Aldrich S.A. (España). La agarosa de bajo punto de fusión (LMA) y de punto de fusión normal (NMA) fueron suministradas por Gibco BRL, Life Technologies (Paisley, R.U.); la solución salina de tampón fosfato (PBS), el bromuro de etidio (EtBr), el diacetato de fluoresceína (FDA) y el 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St Louis, EE.UU.); el lauril sarcosinato de sodio y el Triton X-100 fueron obtenidos de Fluka Chemical AG (Buchs, Suiza); el hidróxido de sodio fue suministrado por Carlo Erba Reagenti (Milán, Italia); el cloruro de sodio por Panreac Química SA (Barcelona, España) y el Tris buffer salino fue obtenido de US Biochemical (Cleveland, EE.UU.).

3.2.1.3. Exposición a los agentes mutagénicos

Las larvas de 72 ± 2 h de edad (tercer estadio) fueron transferidas a tubos de plástico que contenían 4,5 g de medio instantáneo de *Drosophila* (Carolina Biological Supply, Burlington, NC), preparados con diferentes concentraciones

de EMS (1, 2 y 4 mM), y PDC (0,5; 1 y 2,5 mM). Los compuestos fueron disueltos en agua destilada y las larvas se alimentaron de este medio durante 24 ± 2 h.

Las larvas de 96 ± 2 h de edad fueron expuestas a radiación- γ en viales de plástico que contenían medio normal de *Drosophila*. Las larvas fueron irradiadas con las siguientes dosis: 2, 4 y 8 Gy.

Todos los experimentos fueron realizados a 25 ± 1 °C y con una humedad relativa de ~ 60%.

3.2.1.4. Extracción y aislamiento de células de la hemolinfa

La extracción de las células de la hemolinfa o hemocitos se llevó a cabo de acuerdo con la metodología propuesta por Irving *et al.* (2005), con ligeras modificaciones. Las larvas de tercer estadio fueron extraídas del medio, lavadas, esterilizadas con 5% de hipoclorito sódico y secadas con papel filtro. Para extraer la hemolinfa, la cutícula de cada larva fue desprendida utilizando dos pinzas finas, evitando dañar los órganos internos. El procedimiento se realizó dentro de una gota de solución salina fría de PBS y 0,07% de PTU (~ 40 μ L) depositada en el pocillo de un portaobjetos de diagnóstico. Luego, las gotas de solución salina con hemolinfa fueron extraídas utilizando una pipeta y transferidas a un tubo eppendorf para microcentrífuga (1,5 mL).

Los tubos obtenidos de cada tratamiento fueron centrifugados a 300 g durante 10 min a 4 °C. Finalmente, se extrajo el sobrenadante y el material sedimentado fue resuspendido en PBS frío (20 μ L).

3.2.1.5. Ensayo del cometa en hemocitos

El ensayo del cometa se llevó a cabo de acuerdo con la metodología propuesta por Singh *et al.* (1988), con mínimas modificaciones. Las muestras de células de cada tratamiento fueron cuidadosamente resuspendidas en 120 μ L de agarosa LMA 0,75% a 37 °C y depositadas en portaobjetos previamente cubiertos con un 1% de NMA (secadas a temperatura ambiente). Se colocaron

dos gotas en cada portaobjetos y fueron cubiertas con cubreobjetos de 22 x 22 mm. Tras la solidificación de la agarosa (durante 10 min a 4 °C) los cubreobjetos fueron retirados y los portaobjetos se sumergieron en una solución de lisis fría y recién preparada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris pH 10 y 1% Triton X-100, pH 10) durante 2 horas a 4 °C.

Luego, los portaobjetos fueron transferidos y puestos en una unidad de electroforesis rellena con tampón de electroforesis fresco y frío (1 mM Na₂EDTA y 300 mM NaOH, pH >13). Los portas fueron mantenidos en esta unidad de electroforesis durante 25 min a 4 °C. La electroforesis se llevó a cabo durante 20 min a 0,7 V/cm y a 300 mA en 4 °C. Finalmente, los portas fueron neutralizados con dos lavados de 5 min (0,4 M Tris, pH 7,5). Los portaobjetos fueron teñidos con DAPI (1 µg/mL, 20 µL por gel). Las imágenes fueron analizadas a 400X aumentos con el sistema de análisis de imagen Komet 5.5 (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, R.U.) acoplado a un microscopio de fluorescencia Olympus modelo BX50, equipado con un filtro de excitación de 480-550 nm y con un filtro de barrera de 590 nm. Cada experimento fue realizado por triplicado. Se analizaron 100 células al azar (50 células por dos réplicas), por tratamiento. Se utilizó el porcentaje de DNA en la cola (% DNA cola) como medida del daño genético, debido a que este parámetro es ampliamente usado y recomendado para el análisis de los resultados del ensayo del cometa (Kumaravel y Jha, 2006; Lovell y Omori, 2008). El % de DNA en la cola fue calculado con el software Komet versión 5.5.

3.2.1.6. Análisis de los datos

Para determinar diferencias significativas en los resultados obtenidos con el ensayo del cometa, se utilizó un modelo lineal generalizado (GLM). La prueba *a posteriori* de Fisher (LSD) fue utilizada para comparar y establecer diferencias significativas de los tratamientos vs. controles, en cada experimento. Los resultados obtenidos fueron considerados estadísticamente significativos utilizando un nivel de significación del 0,05.

Se procedió al cálculo de la media aritmética ± error estándar, con un intervalo de confianza del 95%.

Todos los análisis de los datos fueron llevados a cabo empleando el paquete estadístico Statgraphics plus 5.1. (Statistical Graphics Corporation, 2001, Rockville, EE.UU.)

*3.2.2. Genotoxicidad de metales pesados con el ensayo del cometa en hemocitos de *D. melanogaster**

3.2.2.1. Compuestos químicos utilizados

Para este estudio se utilizaron los siguientes compuestos: cloruro de mercurio (HgCl_2 , $\geq 99,5\%$ de pureza, N° CAS 7487-94-7), cloruro de metilmercurio (CH_3ClHg , $\geq 98\%$ de pureza, N° CAS 115-09-3), cloruro de plomo (PbCl_2 , 98% de pureza, N° CAS 7758-95-4), nitrato de plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\geq 99\%$ de pureza, N° CAS 10099-74-8), cloruro de níquel (NiCl_2 , 98% de pureza, N° CAS 7718-54-9), sulfato de níquel ($\text{NiSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, $\geq 99\%$ de pureza, N° CAS 10101-97-0), feniltiourea (PTU, $\geq 95\%$ de pureza, N° CAS 103-85-5) y metanosulfonato de etilo (EMS, 100% de pureza, N° CAS 62-50-0). Todos estos compuestos fueron obtenidos de la casa comercial Sigma-Aldrich S.A. (España).

3.2.2.2. Tratamiento de larvas

En el ensayo del cometa se realizaron tratamientos a larvas de tercer estadio de la cepa salvaje Oregon R⁺. Para ello, larvas de 72 ± 2 horas de edad fueron extraídas, lavadas y transferidas a tubos de plástico desechables con 4.5 g de medio instantáneo de *Drosophila* hidratado con 10 mL de las diferentes concentraciones de los compuestos a evaluar. El tratamiento se realizó durante 24 ± 2 horas. Se trataron entre 50 y 100 larvas en cada serie.

Todos los experimentos fueron realizados a una temperatura de 25 ± 1 °C y con una humedad relativa de $\sim 60\%$.

3.2.2.3. *Análisis de los datos*

Para establecer diferencias significativas entre los distintos resultados obtenidos con el ensayo del cometa para cada uno de los compuestos evaluados, se utilizó un modelo lineal generalizado (GLM). La prueba *a posteriori* de Fisher (LSD) fue utilizada para comparar y establecer diferencias significativas entre tratamientos y controles en cada experimento. Los resultados obtenidos fueron considerados estadísticamente significativos a un nivel de significación menor o igual a 0,05.

Todos los datos fueron presentados en función de la media aritmética \pm error estándar, y con intervalos de confianza del 95%.

Finalmente, todos los análisis fueron llevados a cabo con el paquete estadístico Statgraphics plus 5.1. (Statistical Graphics Corporation, 2001, Rockville, EE.UU.).

4. RESULTADOS

4.1 Toxicidad de los metales pesados

El paso inicial de todo estudio de evaluación de la actividad genotóxica es la selección de las concentraciones adecuadas del compuesto a evaluar. Para ello, se ha realizado un análisis de la toxicidad, utilizando una serie creciente de concentraciones, para determinar la viabilidad de los individuos de las cepas *mwh/flr³* y Oregon R⁺ frente a los compuestos utilizados. Esto nos permite seleccionar las dosis adecuadas para realizar las pruebas de genotoxicidad, teniendo en cuenta que es necesario obtener un número mínimo de individuos en cada concentración para que la muestra sea suficientemente grande y los resultados puedan tener validez estadística. De esta manera, el criterio utilizado para seleccionar las dosis adecuadas está basado en dos razones: primera, la reducción en el porcentaje de larvas tratadas supervivientes es un claro indicio de que los compuestos afectan a las larvas y, segunda, el número de adultos que emergen debe ser lo suficientemente grande como para poder llevar a cabo satisfactoriamente los experimentos de genotoxicidad.

Debido a que en este estudio no pretendemos establecer curvas de mortalidad en función de la dosis, sino sólo determinar un rango de dosis que permita obtener un número suficiente de individuos para los ensayos de genotoxicidad, no se ha procedido a obtener datos exhaustivos sobre la toxicidad de los metales pesados utilizados.

4.1.1 Toxicidad de los compuestos de mercurio

Dada la elevada toxicidad de los compuestos de mercurio, fueron necesarios varios experimentos para obtener rangos de dosis efectivas para el HgCl₂ y para el CH₃HgCl (Tabla 3). Las dosis aplicadas de los compuestos oscilaron entre 0,5 y 2000 µM. En general, dentro de este rango de concentraciones se pudo observar una elevada toxicidad, reflejada en una alta mortalidad en las fases de larva y de pupa y también en el retraso del desarrollo larvario. Cabe señalar que el CH₃HgCl presentó mayor toxicidad que el HgCl₂; así, mientras

que con el HgCl_2 se obtuvo una viabilidad suficiente a la concentración de 50 μM , el CH_3HgCl ya no pudo ser evaluado a 5 μM . Por tanto, el rango de dosis finalmente escogido para llevar a cabo los estudios de genotoxicidad en *Drosophila* fue de 1, 5 y 50 μM para el HgCl_2 y de 0,5, 1 y 5 μM para el CH_3HgCl .

Tabla 3. Experimentos de viabilidad realizados con *Drosophila* para cada compuesto de mercurio.

Compuesto	Experimento (disolvente)	Dosis seleccionadas (μM)
HgCl_2	I (H_2O)	0,5; 50, 100, 500, 1000, 2000
	II (H_2O)	1, 5, 50, 100
CH_3HgCl	I (2% DMSO)	0,5; 50, 100, 500, 1000, 2000
	II (2% DMSO)	0,5; 1, 5, 50, 100
	III (3% etanol)	0,5; 1, 5, 50, 100

4.1.2. Toxicidad de los compuestos de plomo

En comparación y a diferencia de los compuestos de mercurio, los compuestos de plomo no presentaron una elevada toxicidad en *Drosophila*. De esta manera, sólo fueron necesarios dos experimentos de viabilidad para obtener los valores de dosis efectivas para el PbCl_2 y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Tabla 4). Al inicio, las dosis aplicadas de los compuestos oscilaron entre 2 y 10 mM. En general, dentro de este rango de concentraciones se pudo observar una elevada toxicidad en las dosis más altas (*i.e.* 8 y 10 mM), reflejada en una alta mortalidad en las fases de larva y de pupa y en el retraso del desarrollo larvario. Cabe señalar que ni el PbCl_2 ni el $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ mostraron diferencias de toxicidad, así que en ambos compuestos se obtuvo una viabilidad suficiente a

partir de 8 mM (> 50%), y ya no pudieron ser evaluados a una concentración de 10 mM. Por lo tanto, el rango de dosis finalmente escogido para llevar a cabo los estudios de genotoxicidad en *Drosophila* fue de 2, 4 y 8 mM, tanto para el PbCl₂ como para el Pb(NO₃)₂.

Tabla 4. Experimentos de viabilidad realizados con *Drosophila* para cada compuesto de plomo.

Compuesto	Experimento (disolvente)	Dosis (mM)
PbCl ₂	I (H ₂ O)	2, 4, 6, 8, 10
	II (H ₂ O)	2, 4, 8
Pb(NO ₃) ₂	I (H ₂ O)	2, 4, 6, 8, 10
	II (H ₂ O)	2, 4, 8

4.1.3. Toxicidad de los compuestos de níquel

Los rangos de dosis seleccionados fueron obtenidos en base a los ensayos de toxicidad y viabilidad previamente obtenidos para *Drosophila* por Ogawa *et al.* (1994). Así, y de acuerdo a lo recomendado en este trabajo, se estableció un rango de dosis que osciló desde 5 a 20 mM, tanto para el NiCl₂ como para el NiSO₄ (Tabla 5). Al aplicar este rango de concentraciones se pudo observar una alta viabilidad (> 70%) en las concentraciones de 5 y 10 mM para ambos compuestos de níquel, mientras que a 20 mM la viabilidad fue menor (> 50%), pero suficiente para llevar a cabo los experimentos de genotoxicidad. Cabe señalar que los dos compuestos de níquel seleccionados no mostraron diferencias en toxicidad entre sí. Además, los compuestos de níquel mostraron un nivel menor de toxicidad, en comparación a los compuestos de mercurio y de plomo. Por tanto, el rango de dosis finalmente escogido para llevar a cabo

Resultados

los estudios de genotoxicidad fue de 5, 10 y 20 mM, para ambos compuestos de níquel.

Tabla 5. Experimentos de viabilidad realizados en *Drosophila* para cada compuesto de níquel.

Compuesto	Experimento (disolvente)	Dosis (mM)
NiCl ₂	I (H ₂ O)	5, 10, 20
NiSO ₄	I (H ₂ O)	5, 10, 20

4.2. Resultados de los ensayos *SMART* en alas

El ensayo *SMART* en alas permite conocer tanto la frecuencia de mutación y/o recombinación somática espontánea, como la inducida por diferentes tratamientos de un determinado agente genotóxico mediante el análisis microscópico de las alas de *D. melanogaster*. Los resultados de genotoxicidad obtenidos con cada agente estudiado, y medidos como la frecuencia de clones mutantes, se presentan resumidos en tablas que contienen la siguiente información:

- Concentraciones o dosis aplicadas del agente estudiado, con su respectivo control negativo y positivo.
- Número de alas analizadas.
- Clasificación y número de los diferentes tipos de sectores mutantes, es decir: sectores *mwh* pequeños (1-2 células), sectores *mwh* grandes (> 2 células), sectores dobles y sectores totales *mwh*. Los sectores *flr*³ no fueron incluidos en las tablas debido a que no fueron observados en los recuentos realizados en este estudio.
- Frecuencia de sectores obtenidos en cada concentración.
- Diagnóstico estadístico.
- Frecuencia de inducción de mutación por célula.

Además de las tablas, los resultados también se presentan de forma gráfica para facilitar la visualización e interpretación de los mismos.

4.2.1 Genotoxicidad de los compuestos de mercurio

En la Tablas 6 y 7 se presentan los resultados obtenidos en el recuento de clones mutantes inducidos por el HgCl₂ y el CH₃HgCl en las células de las alas de moscas transheterocigotas para los marcadores *mwh* y *flr*³. Tanto el HgCl₂ como el CH₃HgCl fueron administrados a larvas de 72 horas de vida (tercer estadio) en concentraciones comprendidas entre 1 y 50 µM, y entre 0,5 y 5 µM,

respectivamente. En ambos casos los tratamientos fueron administrados a las larvas hasta que completaron su desarrollo.

Los resultados obtenidos indican que tanto el mercurio inorgánico (HgCl_2), como el mercurio orgánico (CH_3HgCl), independientemente de las concentraciones aplicadas, no indujeron un incremento significativo en la frecuencia de ninguna de las tres categorías de clones mutantes (*i. e.* sectores simples, grandes y dobles), con respecto a sus controles negativos. En este estudio, los valores promedio de la frecuencia de mutaciones de los controles negativos (0,50 y 0,55, respectivamente) fueron concordantes con el promedio histórico correspondiente a nuestro laboratorio, y no difieren significativamente de los resultados obtenidos por otros autores (Frei y Würigler, 1995). Por otro lado, el control positivo realizado con una concentración de 500 μM de EMS ofreció una clara respuesta positiva, lo que avala la buena realización de los experimentos y refuerza la validez de los valores negativos observados.

Estos mismos resultados se presentan de manera gráfica en las Figuras 7 y 8. En estas figuras se representan las frecuencias de sectores mutantes totales y de las tres categorías de sectores mutantes, por separado (*i.e.* sectores pequeños, grandes y dobles) inducidos por los tratamientos con el HgCl_2 y CH_3HgCl , además de sus respectivos controles negativos y positivos. Por un lado, al analizar las gráficas se puede observar claramente que ninguna de las frecuencias de los tres tipos de sectores mutantes inducidos por los tratamientos con los compuestos de mercurio supera la de los controles negativos, indicando que no existen diferencias significativas entre las series tratadas vs. los controles negativos. Por otro lado, el control positivo con 500 μM de EMS mostró una clara respuesta positiva, aumentando la frecuencia de todas las categorías de sectores mutantes.

Tabla 6. Sectores mutantes inducidos por el HgCl₂.

Comp. Conc. (μ M)	N ^o alas	mwh pequeños (1-2 cél.) (m = 2)				mwh grandes (>2 cél.) (m = 5)				Sectores dobles (m = 5)				Total (m = 2)				Frecuencia sectores inducidos 10 ⁵ células
		N ^o	Fr	D	N ^o	Fr	D	N ^o	Fr	D	N ^o	Fr	D	N ^o	Fr	D		
HgCl ₂																		
Control	40	17	0,43		2	0,05		1	0,03		20	0,50					2,05	
1	40	23	0,58	i	3	0,08	i	0	0,00	i	26	0,65	i				2,66	
5	40	23	0,58	i	1	0,03	i	2	0,05	i	26	0,65	i				2,66	
50	40	15	0,38	-	2	0,05	i	1	0,03	i	18	0,45	-				1,84	
EMS																		
500	40	117	2,92	+	43	1,07	+	9	0,22	+	169	4,22	+				17,31	

N^o, número; Fr, frecuencia; D: Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würgler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconcluyente; m, factor multiplicativo; nivel de probabilidad $\alpha = \beta = 0,05$.

Tabla 7. Sectores mutantes inducidos por el CH₃HgCl.

Comp. Conc. (µM)	Nº alas	mwh pequeños (1-2 cél.) (m = 2)				mwh grandes (>2 cél.) (m = 5)				Sectores dobles (m = 5)				Total (m = 2)				Frecuencia sectores inducidos 10 ⁵ células
		Nº	Fr	D	Nº	Fr	D	Nº	Fr	D	Nº	Fr	D	Nº	Fr	D		
CH ₃ HgCl																		
Control	40	20	0,50	1	0,03	1	0,03	1	0,03	22	0,55	2,25						
0,5	40	17	0,43	-	2	0,05	i	0	0,00	-	19	0,48	-	1,95				
1	40	12	0,30	-	1	0,03	i	4	0,10	i	17	0,43	-	1,74				
5	40	15	0,38	-	5	0,13	i	0	0,00	-	20	0,50	-	2,05				
EMS																		
500	40	117	2,92	+	43	1,07	+	9	0,22	+	169	4,22	+	17,31				

Nº, número; Fr, frecuencia; D: Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconcluyente; m, factor multiplicativo; nivel de probabilidad $\alpha = \beta = 0,05$.

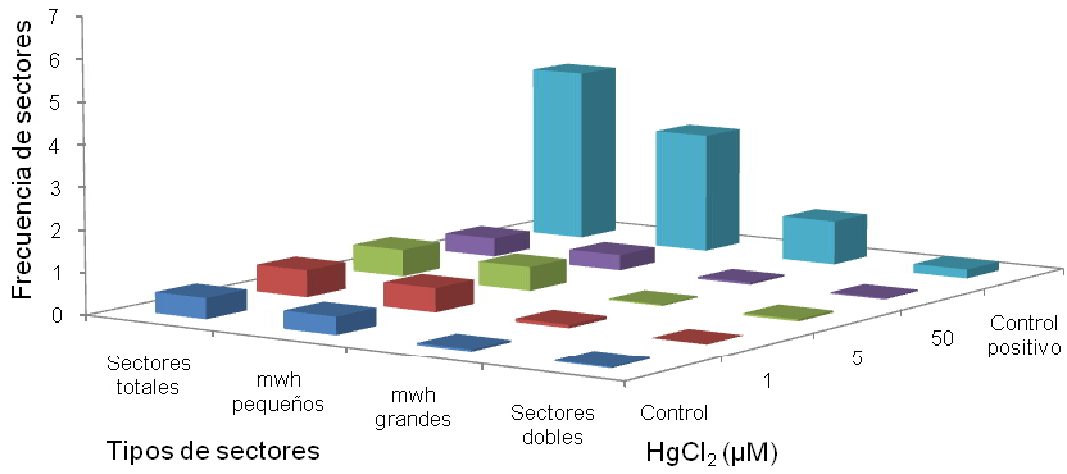


Figura 7. Frecuencia de sectores mutantes inducidos por los tratamientos con HgCl₂.

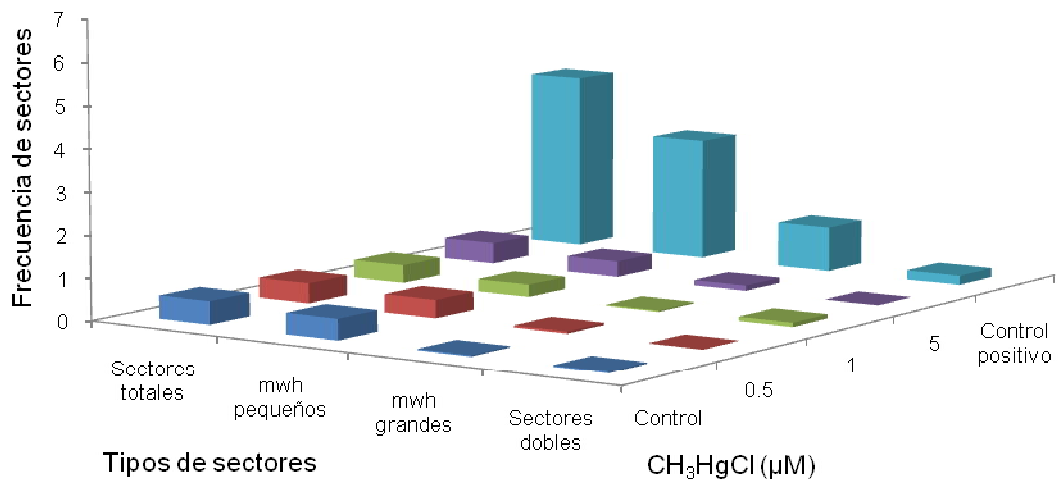


Figura 8. Frecuencia de sectores inducidos por los tratamientos con CH₃HgCl.

4.2.2. Genotoxicidad de los compuestos de plomo

En la Tabla 8 se resumen los resultados obtenidos en el recuento de los sectores mutantes inducidos por el PbCl_2 . El compuesto fue administrado a larvas de 72 horas de vida (tercer estadio) en concentraciones comprendidas entre 2 y 8 mM.

Los resultados indican que el PbCl_2 , independientemente de las concentraciones aplicadas, no fue capaz de inducir un incremento significativo en la frecuencia de ninguna de las tres categorías de clones mutantes (*i. e.* sectores simples, grandes y dobles), con respecto a su control negativo. En este estudio, el promedio de la frecuencia de mutaciones del control negativo (0,58) fue concordante con el promedio histórico de nuestro laboratorio, y no difieren de los resultados obtenidos por otros autores (Frei y Würigler, 1995). Por otro lado, el control positivo llevado a cabo con una concentración de 1 mM de EMS ofreció una clara respuesta positiva, lo que avala la buena realización del estudio y refuerza la validez de los valores negativos encontrados.

Estos mismos resultados se presentan de manera gráfica en la Figura 9, donde no se observa un incremento significativo en ninguna de las tres categorías de clones mutantes analizados, indicando que no existen diferencias significativas entre los valores de los tratamientos y controles.

En la Tabla 9 se muestran los datos obtenidos en el recuento de clones mutantes inducidos por el $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$; como en el caso anterior, el compuesto fue administrado a larvas de 72 horas de edad (tercer estadio) en concentraciones comprendidas entre 2 y 8 mM.

Al igual que lo obtenido con el PbCl_2 , los resultados indican que el $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ no indujo un incremento significativo en ninguno de los tres tipos de sectores mutantes, en comparación a su control negativo. Así pues, como se puede observar claramente en la Figura 10, el $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ no demuestra una actividad genotóxica detectable con el ensayo *SMART* en alas.

A pesar de que el promedio de la frecuencia de mutaciones obtenido en el control negativo fue algo elevado (0,70), una comparación entre los controles negativos de este estudio, mostró que las diferencias no llegan a ser

estadísticamente significativas (prueba binomial condicional, $P > 0,05$). Al igual que en el caso anterior, la inducción de clones mutantes por el agente utilizado como control positivo (EMS, 1 mM) confirma la bondad del estudio y la validez de los resultados negativos obtenidos.

Tabla 8. Sectores mutantes inducidos por el PbCl₂.

Comp. Conc. (mM)	Nº alas	mwh pequeños (1-2 cél.) (m = 2)				mwh grandes (>2 cél.) (m = 5)				Sectores dobles (m = 5)				Total (m = 2)				Frecuencia sectores inducidos 10 ⁵ células
		Nº	Fr	D	Nº	Fr	D	Nº	Fr	D	Nº	Fr	D	Nº	Fr	D		
PbCl ₂																		
Control	40	22	0,55	1	0,03	0	0,00	23	0,58	2,38								
2	40	17	0,43	-	2	0,05	-	0	0,00	-	19	0,48	-	1,96				
4	40	14	0,35	-	2	0,05	-	2	0,05	I	18	0,45	-	1,84				
8	40	10	0,25	-	2	0,05	-	0	0,00	-	12	0,30	-	1,23				
EMS																		
1	40	122	3,05	+	33	0,83	+	15	0,38	+	181	4,53	+	18,6				

Nº, número; Fr, frecuencia; D: Diagnóstico estadístico de acuerdo con Freiy Würgler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconcluyente; m, factor multiplicativo; nivel de probabilidad $\alpha = \beta = 0,05$.

Tabla 9. Sectores mutantes inducidos por el $Pb(NO_3)_2$.

Comp. Conc. (mM)	Nº alías	mwh pequeños (1-2 cél.) (m = 2)			mwh grandes (>2 cél.) (m = 5)			Sectores dobles (m = 5)			Total (m = 2)			Frecuencia sectores inducidos 10 ⁵ células
		Nº	Fr	D	Nº	Fr	D	Nº	Fr	D	Nº	Fr	D	
Pb(NO₃)₂														
Control	40	27	0,68	1	0,03	0	0,00	28	0,70	2,87				
2	40	10	0,25	-	1	0,03	-	1	0,03	-	12	0,30	-	1,23
4	40	12	0,30	-	2	0,05	i	1	0,03	-	15	0,38	-	1,56
8	40	12	0,30	-	2	0,05	i	2	0,05	i	16	0,40	-	1,64
EMS														
1	40	122	3,05	+	33	0,83	+	15	0,38	+	181	4,53	+	18,6

Nº, número; Fr, frecuencia; D: Diagnóstico estadístico de acuerdo con Freiy Würglér (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconcluyente; m, factor multiplicativo; nivel de probabilidad $\alpha = \beta = 0,05$.

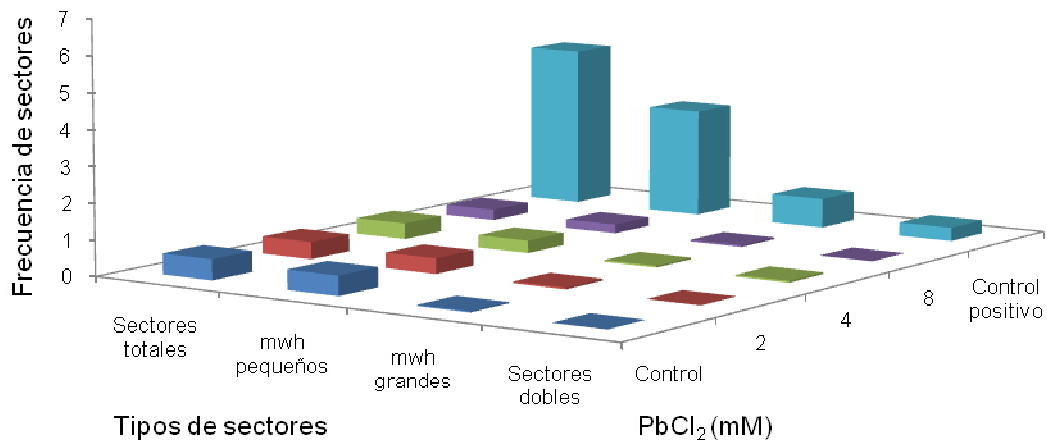


Figura 9. Frecuencia de sectores inducidos por los tratamientos con $PbCl_2$.

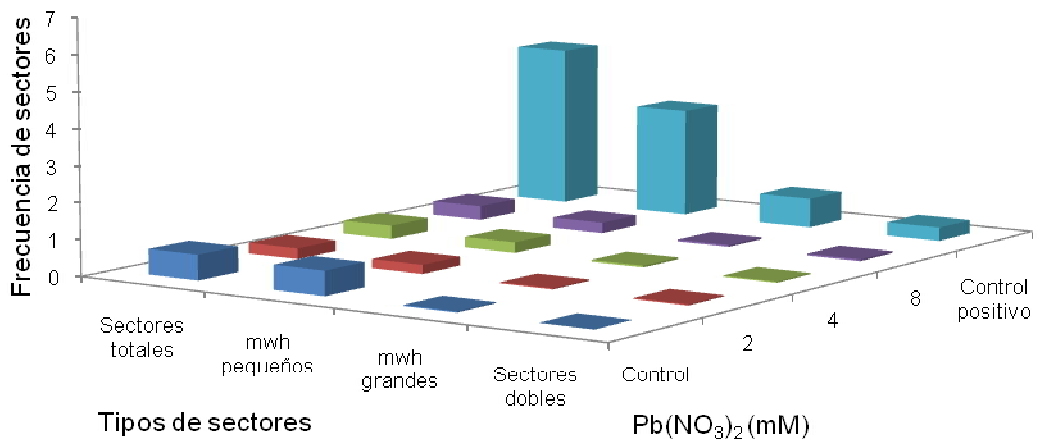


Figura 10. Frecuencia de sectores inducidos por los tratamientos con $Pb(NO_3)_2$.

4.2.3. Genotoxicidad de los compuestos de níquel

En las Tablas 10 y 11 se muestran los resultados obtenidos en el recuento de sectores mutantes inducidos por el NiCl_2 y el NiSO_4 . Los compuestos fueron administrados por ingestión a larvas de 72 horas de vida (tercer estadio) en concentraciones comprendidas entre 5 y 20 mM, para ambos compuestos.

Los resultados indican que tanto el NiCl_2 como el NiSO_4 , independientemente de las concentraciones aplicadas, no indujeron un incremento significativo en la frecuencia de ninguna de las tres categorías de clones mutantes (i. e. sectores simples, grandes y dobles). En este estudio, los promedios de la frecuencia de mutaciones de los controles negativos (0,60 y 0,43) son concordantes con el promedio histórico observado en nuestro laboratorio, y no difieren de los resultados obtenidos por otros autores (Frei y Würzler, 1995). El control positivo llevado a cabo con una concentración de 1 mM de EMS ofreció una clara respuesta positiva, lo que avala la buena realización del estudio y refuerza la validez de los valores negativos observados.

Las Figuras 11 y 12 muestran estos mismos resultados, pero de manera gráfica, donde se observa que las frecuencias de sectores mutantes totales y de las tres categorías de sectores mutantes (i.e. sectores pequeños, grandes y dobles) inducidos por los tratamientos con el NiCl_2 y NiSO_4 no superan a las de los controles negativos, indicando que no existen diferencias significativas entre las series tratadas vs. los correspondientes controles negativos.

Tabla 10. Sectores mutantes inducidos por el NiCl₂.

Comp. Conc (mM)	Nº alas	mwh pequeños (1-2 cél.) (m = 2)			mwh grandes (>2 cél.) (m = 5)			Sectores dobles (m = 5)			Total (m = 2)			Frecuencia sectores inducidos 10 ⁵ células
		Nº	Fr	D	Nº	Fr	D	Nº	Fr	D	Nº	Fr	D	
NiCl ₂														
Control	40	20	0,50	4	0,10	0	0,00	0	0,00	24	0,60	2,46		
5	40	14	0,35	-	3	0,08	-	1	0,03	18	0,45	1,84		
10	40	23	0,58	i	2	0,05	-	0	0,00	25	0,63	2,58		
20	40	19	0,48	-	4	0,10	-	0	0,00	23	0,58	2,38		
EMS														
1	40	198	4,95	+	40	1,00	+	38	0,95	+	276	6,90	+	28,30

Nº, número; Fr, frecuencia; D: Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würgler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconcluyente; m, factor multiplicativo; nivel de probabilidad $\alpha = \beta = 0,05$.

Tabla 11. Sectores mutantes inducidos por el NiSO₄.

Comp. Conc (mM)	Nº alías	mwh pequeños (1-2 cél.) (m = 2)			mwh grandes (>2 cél.) (m = 5)			Sectores dobles (m = 5)			Total (m = 2)			Frecuencia sectores inducidos 10 ⁵ células
		Nº	Fr	D	Nº	Fr	D	Nº	Fr	D	Nº	Fr	D	
NiSO ₄														
Control	40	16	0,40	1	0,03	0	0,00	0	0,00	17	0,43	1,76		
5	40	14	0,35	-	2	0,05	-	1	0,03	-	17	0,43	-	1,76
10	40	21	0,53	i	0	0,00	-	4	0,10	i	25	0,63	i	2,58
20	40	21	0,53	i	1	0,03	-	2	0,05	i	24	0,60	i	2,46
EMS														
1	40	198	4,95	+	40	1,00	+	38	0,95	+	276	6,90	+	28,30

Nº, número; Fr, frecuencia; D: Diagnóstico estadístico de acuerdo con Freiy Würglér (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconcluyente; m, factor multiplicativo; nivel de probabilidad $\alpha = \beta = 0,05$.

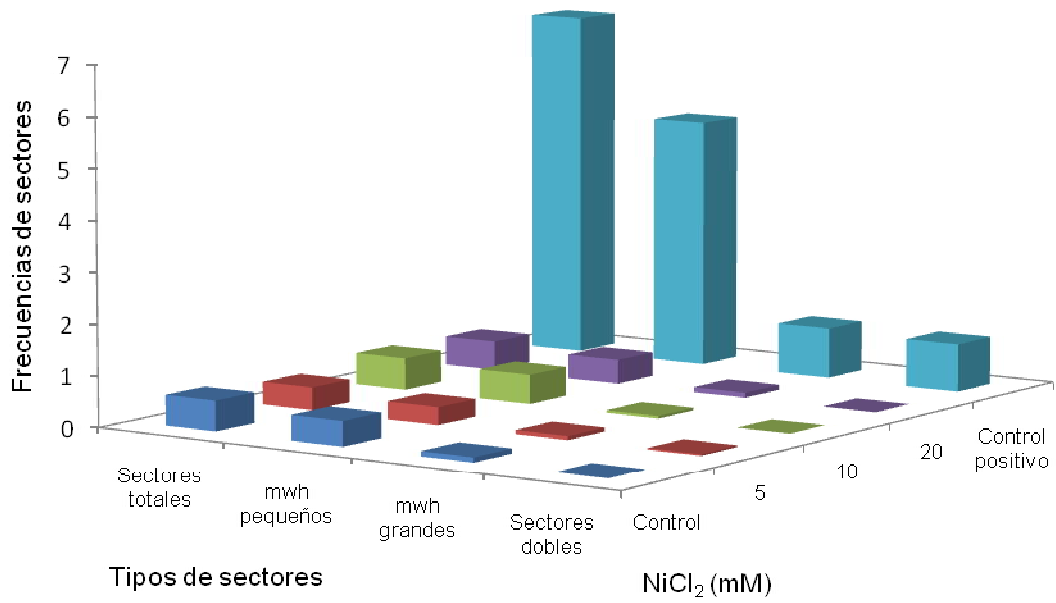


Figura 11. Frecuencia de sectores inducidos por los tratamientos con NiCl₂.

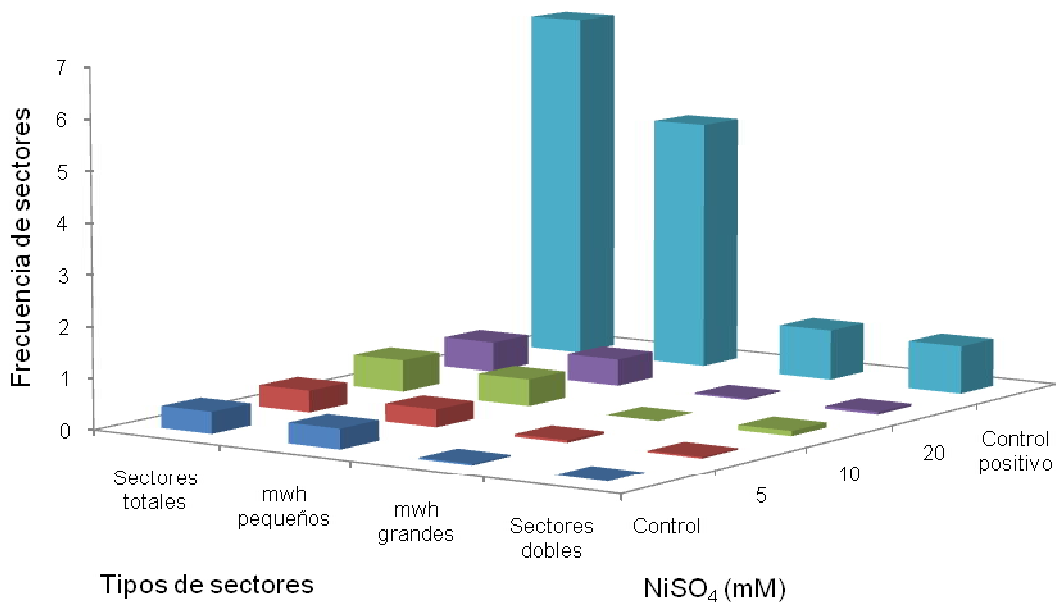


Figura 12. Frecuencia de sectores inducidos por los tratamientos con NiSO₄.

4.2.4. Resultados de interacción en el ensayo SMART en alas

Con el objetivo de estudiar las posibles interacciones de los metales pesados frente a un agente genotóxico de acción conocida, se han realizado tratamientos combinados de los metales pesados seleccionados con la radiación- γ . Para ello, se han seleccionado tres concentraciones de cada metal y una dosis fija de radiación- γ (6 Gy), la cual fue establecida previamente y produce un efecto genotóxico claramente detectable en el ensayo SMART en alas (Kossatz, 2003). Cabe señalar que la viabilidad de las larvas de *Drosophila* obtenida después de cada tratamiento combinado fue suficiente para poder llevar a cabo los experimentos de genotoxicidad (> 50%).

Los resultados de genotoxicidad obtenidos de los tratamientos combinados con cada agente estudiado, y medidos como la frecuencia de clones mutantes, se presentan resumidos en las correspondientes tablas.

Además, se ha realizado el cálculo de los factores de interacción (FI) de cada tratamiento combinado, que nos permite clasificar el tipo de interacción entre la radiación- γ y los compuestos de mercurio, plomo y níquel. Estos resultados se presentan en tablas que contienen la siguiente información:

- Concentraciones y/o dosis aplicadas de los tratamientos combinados, con sus respectivos controles negativo y positivo.
- Frecuencia de sectores totales obtenidos en el tratamiento combinado
- Cálculo del factor de interacción (FI).
- Intervalos de confianza del 95% de los FI.
- Diagnóstico estadístico.

4.2.4.1. Interacción de los compuestos de mercurio con radiación- γ

En las Tablas 12 y 13 se muestran los resultados obtenidos en el recuento de sectores mutantes inducidos por los tratamientos realizados con el HgCl_2 y CH_3HgCl en combinación con la radiación- γ .

Los resultados obtenidos indican que la dosis de 6 Gy de radiación- γ fue claramente genotóxica, incrementando la frecuencia de las tres categorías de

clones mutantes analizados. En este estudio, el promedio de la frecuencia de sectores mutantes totales obtenidos con 6 Gy de radiación- γ (2,15) fue concordante con el promedio observado previamente en nuestro laboratorio (Kossatz, 2003). Al combinar esta dosis de radiación- γ con tres concentraciones diferentes de HgCl_2 (1, 5, 50 μM), y CH_3HgCl (0,5; 1, 5 μM), los resultados indicaron que los tratamientos combinados no alteraron los efectos genotóxicos causados por la radiación- γ por sí sola (Tabla 14). De esta manera, tanto el mercurio inorgánico como el orgánico, muestran un comportamiento aditivo frente al efecto genotóxico de la radiación- γ .

Tabla 12. Sectores mutantes inducidos por tratamientos con radiación-y y cotratamientos con HgCl₂.

Comp. Conc. (μ M)	N ^o alas	<i>mwh</i> pequeños (1-2 cél.) (m = 2)				<i>mwh</i> grandes (>2 cél.) (m = 5)				Sectores dobles (m = 5)				Total (m = 2)		Frecuencia sectores inducidos 10 ⁵ células	
		N ^o	Fr	D	N ^o	Fr	D	N ^o	Fr	D	N ^o	Fr	D	N ^o	Fr		D
		Control	40	17	0,43	2	0,05	1	0,03	20	0,50	2,05					
1 HgCl ₂ +6 Gy	40	28	0,70	+	47	1,18	+	18	0,45	+	93	2,33	+	9,54			
5 HgCl ₂ +6 Gy	40	28	0,70	+	43	1,08	+	15	0,38	+	86	2,15	+	8,81			
50 HgCl ₂ +6 Gy	40	27	0,68	+	44	1,10	+	14	0,35	+	85	2,13	+	8,72			
6 Gy	40	34	0,85	+	40	1,00	+	12	0,30	+	86	2,15	+	8,81			

N^o, número; Fr, frecuencia; D: Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconcluyente; m, factor multiplicativo; nivel de probabilidad $\alpha = \beta = 0,05$.

Tabla 13. Sectores mutantes inducidos por tratamientos con radiación- γ y cotratamientos con CH_3HgCl .

Comp. Conc (μM)	N ^o alas	<i>mwh</i> pequeños (1-2 cél.) (m = 2)						<i>mwh</i> grandes (>2 cél.) (m = 5)						Sectores dobles (m = 5)			Total (m = 2)			Frecuencia sectores inducidos 10 ⁵ células
		Fr		D		N ^o		Fr		D		N ^o		Fr	D	N ^o	Fr	D	N ^o	
		N ^o	Fr	N ^o	Fr	N ^o	Fr	N ^o	Fr	N ^o	Fr	N ^o	Fr	N ^o	Fr	N ^o	Fr	N ^o	Fr	
Control	40	20	0,50	1	0,03	1	0,03	1	0,03	1	0,03	22	0,55			22	0,55			2,25
0,5 CH_3HgCl + 6 Gy	40	30	0,75	+	49	1,23	+	13	0,33	+	92	2,30	+			92	2,30	+		9,42
1 CH_3HgCl + 6 Gy	40	18	0,45	i	44	1,10	+	10	0,25	+	72	1,80	+			72	1,80	+		7,37
5 CH_3HgCl + 6 Gy	40	38	0,95	+	62	1,55	+	20	0,50	+	120	3,00	+			120	3,00	+		12,30
6 Gy	40	34	0,85	+	40	1,00	+	12	0,30	+	86	2,15	+			86	2,15	+		8,81

N^o, número; Fr, frecuencia; D: Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconcluyente; m, factor multiplicativo; nivel de probabilidad $\alpha = \beta = 0,05$.

Tabla 14. Factores de interacción calculados a partir de los resultados de experimentos de cotratamiento^a

Cotratamiento		Sectores totales		
Compuesto, Concentración (μM)	Fr \pm EE	FI \pm EE *	95% IC de FI	
Control	0,50 \pm 0,13			
1 HgCl ₂ + 6 Gy	2,33 \pm 0,27	0,03 \pm 0,40	-0,65	0,65
5 HgCl ₂ + 6 Gy	2,15 \pm 0,27	-0,15 \pm 0,36	-0,82	0,52
50 HgCl ₂ + 6 Gy	2,13 \pm 0,24	0,05 \pm 0,41	-0,62	0,72
Control	0,55 \pm 0,12			
0,5 CH ₃ HgCl + 6 Gy	2,30 \pm 0,29	0,23 \pm 0,39	-0,40	0,85
1 CH ₃ HgCl + 6 Gy	1,80 \pm 0,27	-0,23 \pm 0,32	-0,85	0,40
5 CH ₃ HgCl + 6 Gy	3,00 \pm 0,26	0,90 \pm 0,39	0,27	1,53
6 Gy	2,15 \pm 0,26			

^a Fr, frecuencia de sectores totales; EE, error estándar; FI, factor de interacción; IC, intervalos de confianza del 95%.

* No se encontraron diferencias significativas en los valores de FI

4.2.4.2. Interacción de los compuestos de plomo con la radiación-γ

En las Tablas 15 y 16 se resumen los resultados obtenidos en el recuento de sectores mutantes inducidos por tratamientos combinados con los compuestos de plomo (PbCl_2 y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) y radiación-γ.

Los resultados obtenidos indican que una dosis de 6 Gy de radiación-γ muestra una clara respuesta positiva, incrementando la frecuencia de todas las categorías de clones mutantes analizados. En este estudio, el promedio de la frecuencia de sectores mutantes totales obtenidos con 6 Gy de radiación-γ (2,13) fue concordante con el promedio observado en el estudio anterior con mercurio. Al realizar los tratamientos combinados de radiación-γ con tres concentraciones diferentes de PbCl_2 y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, se puede observar que no existe una variación significativa en la frecuencia de las tres categorías de sectores mutantes, en comparación a la producida por la radiación-γ por si sola (Tabla 17). Así, tanto el PbCl_2 como $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, parecen tener un comportamiento aditivo frente a la radiación-γ.

Tabla 15. Sectores mutantes inducidos por tratamientos con radiación-y y cotratamientos con PbCl₂.

Comp. Conc (mM)	Nº alas	<i>mwh</i> pequeños (1-2 cél.) (m = 2)						<i>mwh</i> grandes (>2 cél.) (m = 5)				Sectores dobles (m = 5)				Total (m = 2)				Frecuencia sectores inducidos 10 ⁵ células						
		Fr		D		Nº		Fr		D		Nº		Fr		D		Nº			Fr		D			
		Nº	Fr	Nº	Fr	Nº	Fr	Nº	Fr	Nº	Fr	Nº	Fr	Nº	Fr	Nº	Fr	Nº	Fr		Nº	Fr	Nº	Fr	D	
Control	40	22	0,55	1	0,03	0	0,00	23	0,58	23	0,58	0	0,00	23	0,58	23	0,58	23	0,58	23	0,58	23	0,58	23	0,58	2,38
2 PbCl ₂ + 6 Gy	40	14	0,35	-	49	1,23	+	29	0,73	+	92	2,30	+	92	2,30	+	92	2,30	+	92	2,30	+	92	2,30	+	9,43
4 PbCl ₂ + 6 Gy	40	17	0,43	-	43	1,08	+	19	0,48	+	79	1,98	+	79	1,98	+	79	1,98	+	79	1,98	+	79	1,98	+	8,11
8 PbCl ₂ + 6 Gy	40	17	0,43	-	41	1,03	+	23	0,58	+	81	2,03	+	81	2,03	+	81	2,03	+	81	2,03	+	81	2,03	+	8,32
6 Gy	40	24	0,60	-	45	1,13	+	16	0,40	+	85	2,13	+	85	2,13	+	85	2,13	+	85	2,13	+	85	2,13	+	8,73

Nº, número; Fr, frecuencia; D: Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconcluyente; m, factor multiplicativo; nivel de probabilidad $\alpha = \beta = 0,05$.

Tabla 16. Sectores mutantes inducidos por tratamientos con radiación-y y cotratamientos con Pb(NO₃)₂.

Comp. Conc (mM)	Nº alas	mwh pequeños (1-2 cél.) (m = 2)						mwh grandes (>2 cél.) (m = 5)						Sectores dobles (m = 5)			Total (m = 2)			Frecuencia sectores inducidos 10 ⁵ célula
		Nº		Fr		D		Nº		Fr		D		Nº		Fr		D		
		Nº	Fr	D	Nº	Fr	D	Nº	Fr	D	Nº	Fr	D	Nº	Fr	D	Nº	Fr	D	
Control	40	27	0,68	1	0,03	0	0,00	28	0,70	2,87										
2 Pb(NO ₃) ₂ + 6 Gy	40	24	0,60	-	47	1,78	+	19	0,48	+	90	2,25	+	9,22						
4 Pb(NO ₃) ₂ + 6 Gy	40	27	0,68	-	67	1,68	+	32	0,80	+	126	3,15	+	12,90						
8 Pb(NO ₃) ₂ + 6 Gy	40	23	0,58	-	56	1,40	+	16	0,40	+	95	2,38	+	9,75						
6 Gy	40	24	0,60	-	45	1,13	+	16	0,40	+	85	2,13	+	8,73						

Nº, número; Fr, frecuencia; D: Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconcluyente; m, factor multiplicativo; nivel de probabilidad $\alpha = \beta = 0,05$.

Tabla 17. Factores de interacción calculados desde los experimentos de cotratamiento

a

Cotratamiento Compuesto, Concentración (mM)	Sectores totales			
	Fr ± EE	FI ± EE*	95% IC de FI	
Control	0,58 ± 0,22			
2 PbCl ₂ + 6 Gy	2,30 ± 0,12	0,28 ± 0,40	-0,47	1,02
4 PbCl ₂ + 6 Gy	1,98 ± 0,11	-0,03 ± 0,50	-0,77	0,72
8 PbCl ₂ + 6 Gy	2,03 ± 0,10	0,18 ± 0,42	-0,57	0,92
Control	0,70 ± 0,18			
2 Pb(NO ₃) ₂ + 6 Gy	2,25 ± 0,10	0,53 ± 0,43	-0,22	1,27
4 Pb(NO ₃) ₂ + 6 Gy	3,15 ± 0,12	1,35 ± 0,43	0,60	2,10
8 Pb(NO ₃) ₂ + 6 Gy	2,38 ± 0,10	0,65 ± 0,45	-0,10	1,40
6 Gy	2,13 ± 0,28			

^a Fr, frecuencia de sectores totales; EE, error estándar; FI, factor de interacción.; IC, intervalos de confianza

* No se encontraron diferencias significativas en los valores de FI.

4.2.4.3. *Interacción de los compuestos de níquel con la radiación-γ*

En las Tablas 18 y 19 se muestran los resultados obtenidos en el recuento de sectores mutantes inducidos por tratamientos combinados con los compuestos de níquel (NiCl_2 y NiSO_4) y la radiación- γ .

Los resultados obtenidos indican que la radiación- γ muestra una clara respuesta positiva a una dosis de 6 Gy, al incrementar la frecuencia de las tres categorías de clones mutantes analizados. Sin embargo, el promedio de la frecuencia de sectores mutantes totales obtenidos (1,75), fue menor que el obtenido en los dos experimentos previos (2,15 y 2,13, respectivamente). Con el propósito de corregir las diferencias entre experimentos y su posible efecto en los cálculos de los FI, se optó por utilizar un promedio de la frecuencia de sectores mutantes producidos por la radiación- γ de todos los experimentos realizados. Así, al analizar los tratamientos combinados llevados a cabo con tres diferentes concentraciones de NiCl_2 y NiSO_4 (5, 10 y 20 mM, respectivamente), los resultados indicaron que los compuestos de níquel modifican significativamente los efectos genotóxicos producidos por la radiación- γ (Tabla 20). Por un lado, el NiCl_2 muestra un claro incremento dosis-respuesta de la frecuencia de todas las categorías de sectores mutantes. Sin embargo, este incremento no fue significativo a la mínima concentración de NiCl_2 aplicada (5 mM). Por otro lado, el NiSO_4 también muestra un incremento significativo de la frecuencia de los tres tipos de clones mutantes en las tres concentraciones aplicadas en este estudio. Sin embargo, y a diferencia del NiCl_2 , el NiSO_4 no muestra una diferencia significativa a la máxima concentración aplicada.

Así, los resultados obtenidos muestran que el NiCl_2 y NiSO_4 presentan un comportamiento de tipo sinérgico en tratamientos combinados con radiación- γ .

Tabla 18. Sectores mutantes inducidos por tratamientos con radiación-γ y cotratamientos con NiCl₂.

Comp. Conc (mM)	Nº	<i>mwh</i> pequeños (1-2 cél.) (m = 2)						<i>mwh</i> grandes (>2 cél.) (m = 5)						Sectores dobles (m = 5)			Total (m = 2)			Frecuencia sectores inducidos 10 ⁵ células			
		Nº	Fr	D	Nº	Fr	D	Nº	Fr	D	Nº	Fr	D	Nº	Fr	D	Nº	Fr	D				
		alas																					
Control	40	20	0,50		4	0,10		0	0,00		24	0,60		2,46									
5 NiCl ₂ + 6 Gy	40	33	0,83	+	57	1,43	+	29	0,73	+	119	2,98	+	12,21									
10 NiCl ₂ + 6 Gy	40	25	0,63	i	62	1,55	+	43	1,08	+	130	3,25	+	13,31									
20 NiCl ₂ + 6 Gy	40	36	0,90	+	58	1,45	+	50	1,25	+	144	3,60	+	14,75									
6 Gy	40	15	0,38	-	43	1,08	+	12	0,30	+	70	1,75	+	7,17									

Nº, número; Fr, frecuencia; D: Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconcluyente; m, factor multiplicativo; nivel de probabilidad $\alpha = \beta = 0,05$.

Tabla 19. Sectores mutantes inducidos por tratamientos con radiación-y y cotratamientos con NiSO₄.

Comp. Conc (mM)	Nº alas	mwh pequeños (1-2 cels) (m = 2)						mwh grandes (>2 cels) (m = 5)						Sectores dobles (m = 5)			Total (m = 2)			Frecuencia sectores inducidos 10 ⁵ células				
		Fr		D		Nº		Fr		D		Nº		Fr		D		Fr			D			
		Nº	Fr	Nº	Fr	Nº	Fr	Nº	Fr	Nº	Fr	Nº	Fr	Nº	Fr	Nº	Fr	Nº	Fr		Nº	Fr	D	
Control	40	16	0,40	1	0,03	0	0,00	17	0,43	0	0,00	17	0,43	0	0,00	17	0,43	17	0,43	0	0,00	17	0,43	1,76
5 NiSO ₄ + 6 Gy	40	31	0,78	+	71	1,78	+	20	0,50	+	122	3,05	+	145	3,63	+	12,50	12,50	12,50	+	12,50	12,50	12,50	14,87
10 NiSO ₄ + 6 Gy	40	33	0,83	+	65	1,63	+	47	1,18	+	145	3,63	+	145	3,63	+	14,87	14,87	14,87	+	14,87	14,87	14,87	14,87
20 NiSO ₄ + 6 Gy	40	26	0,65	+	59	1,48	+	27	0,68	+	124	3,10	+	124	3,10	+	12,70	12,70	12,70	+	12,70	12,70	12,70	12,70
6 Gy	40	15	0,38	-	43	1,08	+	12	0,30	+	70	1,75	+	70	1,75	+	7,17	7,17	7,17	+	7,17	7,17	7,17	7,17

Nº, número; Fr, frecuencia; D: Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconcluyente; m, factor multiplicativo; nivel de probabilidad $\alpha = \beta = 0,05$.

Tabla 20. Factores de interacción calculados a partir de los resultados de experimentos de cotratamiento ^a

Cotratamiento		Sectoros totales			
Compuesto, Concentración (mM)	Fr ± EE	FI ± EE	95% IC de FI		
Control	0,48 ± 0,11				
5 NiCl ₂ + 6 Gy	2,98 ± 0,34	1,12 ± 0,35	0,32	1,91	
10 NiCl ₂ + 6 Gy	3,25 ± 0,29	1,22 ± 0,38	0,42	2,01 *	
20 NiCl ₂ + 6 Gy	3,60 ± 0,55	1,62 ± 0,62	0,82	2,41 *	
Control	0,43 ± 0,11				
5 NiSO ₄ + 6 Gy	3,05 ± 0,36	1,09 ± 0,43	0,35	1,83 *	
10 NiSO ₄ + 6 Gy	3,63 ± 0,46	1,47 ± 0,52	0,73	2,20 *	
20 NiSO ₄ + 6 Gy	3,10 ± 0,27	0,97 ± 0,31	0,23	1,70	
6 Gy	2,01 ± 0,17 ^b				

^a Fr, frecuencia de sectores totales; EE, error estándar; FI, factor de interacción.

^b Promedio ± error estándar de tres experimentos (120 alas).

* FI significativos con intervalos de confianza del 95% (nivel de significación, 0,05).

4.3. Resultados del ensayo del cometa en *D. melanogaster*

El ensayo del cometa permite conocer el daño genético primario a nivel de células individuales causado por un determinado agente genotóxico. Esta técnica está basada en el análisis de la migración de los fragmentos rotos de DNA, resultado de la desestructuración de los bucles de DNA debidos a roturas de simple cadena durante la electroforesis. Los resultados de genotoxicidad obtenidos con cada agente estudiado, y medidos como el porcentaje de DNA en la cola (% DNA cola), se presentan resumidos en tablas que contienen la siguiente información:

- Concentraciones y/o dosis aplicadas de los tratamientos, con sus respectivos controles negativo y positivo.
- Porcentaje de DNA en la cola obtenido de cada tratamiento.
- Intervalos de confianza del 95% para el % de DNA en la cola.
- Diagnóstico estadístico.

Además de las tablas, los resultados también se presentan de forma gráfica para facilitar la visualización e interpretación de los mismos.

4.3.1. Puesta a punto del ensayo del cometa en hemocitos de *D. melanogaster*

Con el objetivo de desarrollar y validar el ensayo del cometa *in vivo* en células de la hemolinfa de *D. melanogaster*, se han realizado estudios de genotoxicidad previos con tres mutágenos estándar de acción bien conocida: EMS, PDC y radiación- γ . Para ello, se han seleccionado tres concentraciones de cada agente genotóxico, las cuales no resultaron tóxicas y nos permitieron obtener una viabilidad suficiente de larvas (> 50%) para llevar a cabo los experimentos de genotoxicidad. Estas concentraciones fueron seleccionadas de acuerdo a estudios genotóxicos previos realizados en nuestro laboratorio.

En la Tabla 21 se resumen los resultados obtenidos en el ensayo del cometa *in vivo* en hemocitos de *D. melanogaster* por tratamientos con tres

genotóxicos de acción conocida: EMS, PDC y radiación- γ . Por un lado, tanto el EMS como el PDC fueron administrados a larvas de 72 horas de vida (tercer estadio), durante 24 horas con concentraciones comprendidas entre 1 y 4 mM para el EMS, y entre 0,5 y 2,5 mM para el PDC. Por otro lado, larvas de 96 horas de vida (tercer estadio) fueron expuestas de manera aguda a la radiación- γ a dosis que oscilaron entre 2 y 8 Gy. Inmediatamente después de los tratamientos, las larvas fueron extraídas del medio de cultivo, para luego obtener y aislar los hemocitos de la hemolinfa de las larvas, para su posterior análisis en el ensayo del cometa.

Los resultados indicaron que las larvas de *D. melanogaster* expuestas a los tres genotóxicos, muestran un claro incremento dosis-respuesta en el daño del DNA como lo demuestran los valores obtenidos del % de DNA en la cola. Los tres agentes genotóxicos analizados, a las concentraciones y dosis evaluadas más bajas, no mostraron un daño genético significativo en las células de los individuos expuestos (Tabla 21).

Estos mismos resultados se pueden visualizar en la Figura 13 A-C, donde se puede observar que el promedio del parámetro % DNA cola en hemocitos causado por los diferentes tratamientos con EMS, PDC y radiación- γ , aumenta en función a la concentración o dosis aplicada, indicando que a una mayor concentración o dosis, mayor es el daño genético causado por los agentes genotóxicos. Así, en el presente estudio, los tres agentes genotóxicos evaluados inducen un daño genético detectable con el ensayo del cometa en hemocitos de *Drosophila*, lo que demuestra la bondad del ensayo desarrollado.

Tabla 21. Daño genético producido por el EMS, el PDC y la radiación-γ en hemocitos de *D. melanogaster*.

Agentes	% DNA cola ^a	95% IC de % DNA cola ^b
Controles agrupados	15,40 ± 0,48	14,50 16,35
1 mM EMS	18,87 ± 0,87	17,09 20,65
2 mM EMS	21,34 ± 0,86 **	19,56 23,12
4 mM EMS	29,08 ± 0,88 **	27,30 30,86
0,5 mM PDC	17,96 ± 0,81	16,43 19,50
1 mM PDC	19,22 ± 0,66 **	17,68 20,76
2,5 mM PDC	19,55 ± 0,80 **	18,02 21,09
2 Gy	15,43 ± 0,70	13,92 16,94
4 Gy	16,94 ± 0,85 **	15,43 18,45
8 Gy	22,64 ± 0,79 **	21,13 24,15

^a Promedio ± error estándar de tres experimentos (300 células). ^b Intervalos de confianza del 95% para % de DNA cola. ** P < 0,01 vs. control.

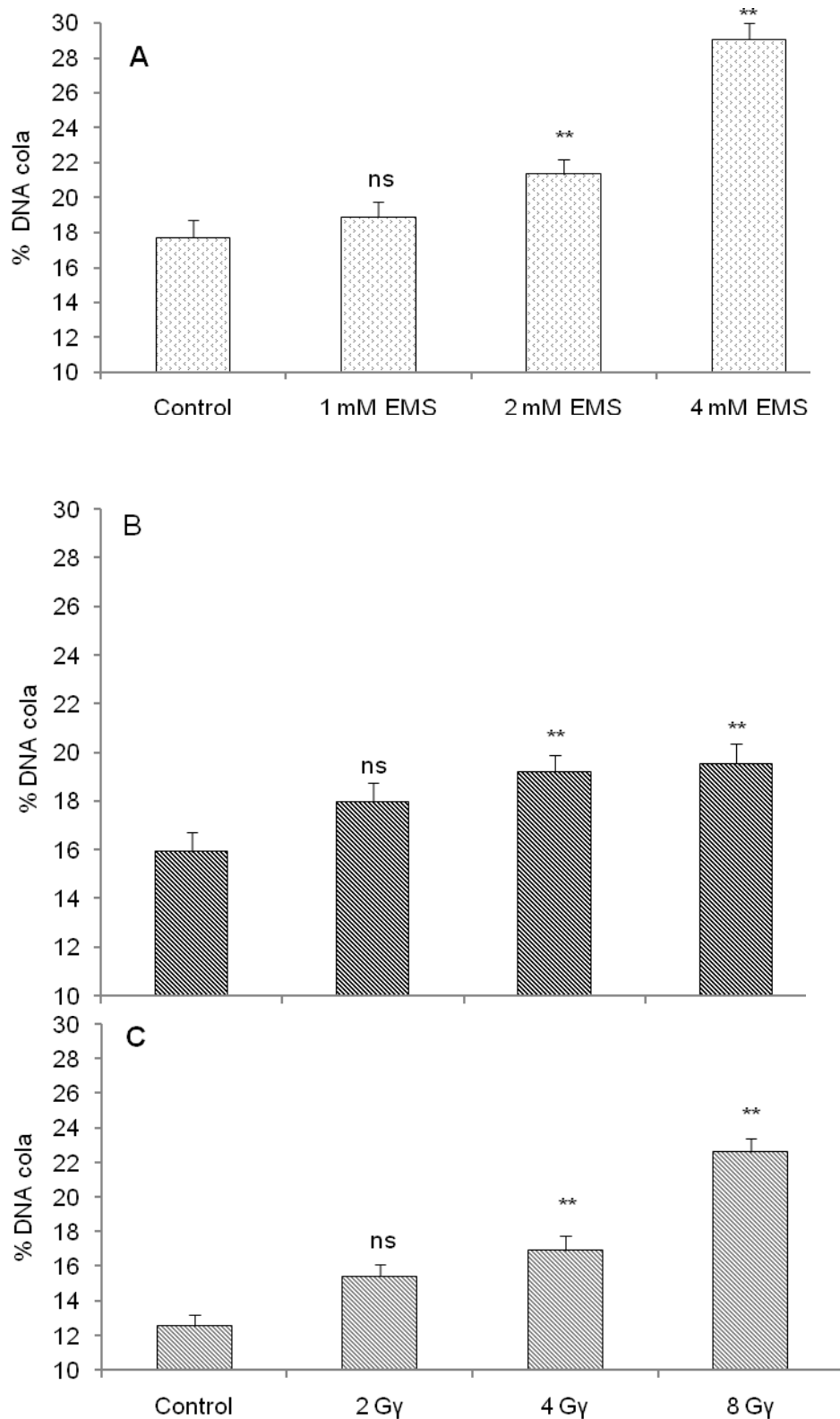


Figura 13. Daño genético producido por EMS (A), PDC,(B) y radiación- γ (C) en hemocitos de *D. melanogaster*, medido como % DNA cola (promedio \pm error estándar). ns, no significativo; **, $P < 0,01$ en comparación con el control .

4.3.2. Resultados de la genotoxicidad de metales pesados con el ensayo del cometa en hemocitos de *D. melanogaster*

4.3.2.1. Genotoxicidad de los compuestos de mercurio

En la Tabla 22, se resumen los resultados obtenidos con el ensayo del cometa en hemocitos de larvas de *D. melanogaster* expuestas a HgCl_2 . El compuesto fue administrado a larvas de 72 horas de vida (tercer estadio) en concentraciones que fluctuaron entre 1 y 50 μM . Los tratamientos fueron administrados por ingestión durante un período de 24 horas. Después de los tratamientos, se extrajo la hemolinfa de las larvas y se procedió a la obtención y aislamiento de los hemocitos, para su posterior análisis en el ensayo del cometa.

Los resultados obtenidos indican que de los tratamientos realizados con tres diferentes concentraciones de HgCl_2 (1, 5 y 50 μM) no indujeron un incremento significativo en el daño genético expresado como el % de DNA en la cola en hemocitos de larvas de *D. melanogaster*, con respecto al control negativo. Por otro lado, el control positivo realizado en paralelo con 4 mM de EMS mostró una clara respuesta positiva, lo que avala la bondad de los resultados negativos observados.

Estos mismos resultados se pueden visualizar en la Figura 14, donde se observa que el promedio del % de DNA en la cola inducido por diferentes tratamientos con HgCl_2 , no supera al del control negativo, indicando que no existen diferencias significativas entre los valores de las series tratadas vs. el control negativo.

En la Tabla 23, se resumen los resultados obtenidos con el ensayo del cometa en hemocitos de larvas de *D. melanogaster* expuestas al CH_3HgCl . El compuesto fue administrado a larvas de 72 horas de vida (tercer estadio) en concentraciones que fluctuaron entre 0,5 y 5 μM . Después de 24 horas de exposición, la hemolinfa de las larvas tratadas fue extraída y procesada para obtener hemocitos aislados, para así llevar a cabo el ensayo del cometa.

A diferencia de los resultados obtenidos con el mercurio inorgánico, los tratamientos realizados con tres concentraciones de CH_3HgCl (0,5, 1 y 5 μM)

indujeron un incremento significativo en el daño genético expresado como el % de DNA en la cola en hemocitos, a la máxima concentración ensayada (5 μ M) con respecto a lo observado en el control negativo.

Por otro lado, el control positivo realizado en paralelo con 4 mM de EMS mostró una clara respuesta positiva, lo que avala los resultados positivos observados y la bondad del protocolo seguido.

Los mismos resultados se pueden visualizar en la Figura 15, donde se observa que el promedio del % de DNA en la cola inducido por diferentes tratamientos con CH_3HgCl , supera al del control negativo, indicando que existen diferencias significativas entre los valores de las series tratadas vs. control negativo.

Tabla 22. Efectos genotóxicos producidos por el HgCl_2 en hemocitos de *D. melanogaster*.

Compuesto	% DNA cola ^a	95% IC de % DNA cola ^b
Control	17,32 ± 1,13	15,24 19,40
1 μM HgCl_2	17,04 ± 1,09	14,96 19,12
5 μM HgCl_2	18,41 ± 1,03	16,33 20,49
50 μM HgCl_2	18,54 ± 1,05	16,46 20,62
EMS 4 mM	27,92 ± 1,01 ^{**}	25,84 30,00

^a Promedio ± error estándar de tres experimentos (300 células). ^b Intervalos de confianza del 95% para % de DNA cola.

** P < 0,01 vs. control negativo.

Tabla 23. Efectos genotóxicos producidos por el CH₃HgCl en hemocitos de *D. melanogaster*.

Compuesto	% DNA cola ^a	95% IC de % DNA cola ^b
Control	14,93 ± 0,84	12,96 16,90
0,5 µM CH ₃ HgCl	17,97 ± 1,00	16,00 19,95
1 µM CH ₃ HgCl	17,20 ± 1,00	15,23 19,18
5 µM CH ₃ HgCl	19,74 ± 0,90 ^{**}	17,76 21,71
EMS 4 mM	27,15 ± 1,24 ^{**}	25,18 29,12

^a Promedio ± error estándar de tres experimentos (300 células). ^b Intervalos de confianza del 95% para % de DNA cola.

^{**} P < 0,01 vs. control negativo.

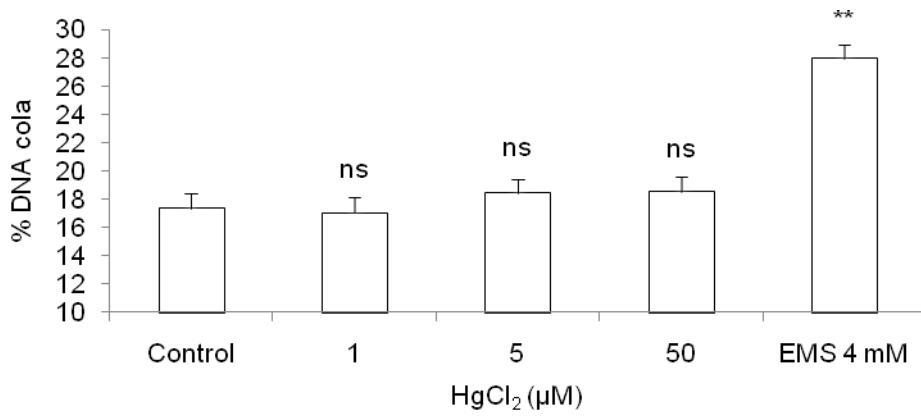


Figura 14. Daño genético producido por el HgCl₂ en hemocitos de *D. melanogaster*, medidos como el % DNA cola (promedio ± error estándar). ns, no significativo; ** P < 0,01 en comparación con el control negativo.

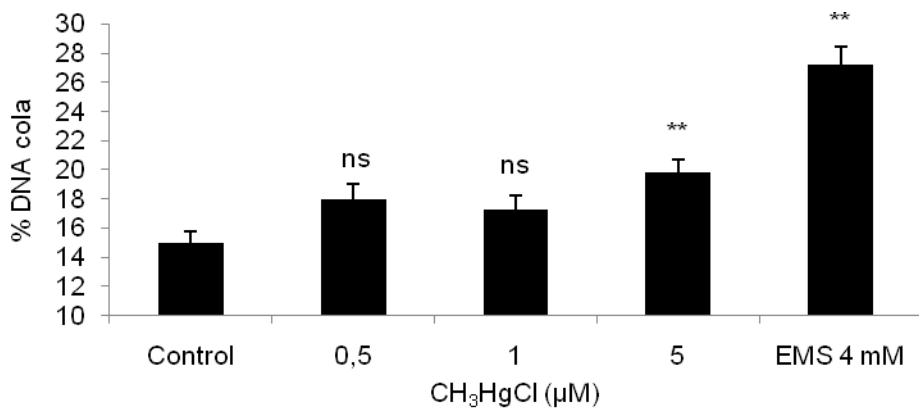


Figura 15. Daño genético producido por el CH₃HgCl en hemocitos de *D. melanogaster*, medidos como el % DNA cola (promedio ± error estándar). ns, no significativo; ** P < 0,01 en comparación con el control negativo.

4.3.2.2. Genotoxicidad de los compuestos de plomo

En la Tabla 24 se resumen los resultados obtenidos con el ensayo del cometa en hemocitos de larvas de *D. melanogaster* expuestas a PbCl_2 . El compuesto fue administrado a larvas de 72 horas de vida (tercer estadio) a concentraciones comprendidas entre 2 y 8 mM. Los tratamientos fueron administrados por ingestión durante un período de 24 horas. Después de los tratamientos, se extrajo la hemolinfa de las larvas y se procedió a la obtención y aislamiento de los hemocitos, para su posterior análisis en el ensayo del cometa.

Los resultados obtenidos indican que los tratamientos realizados con tres concentraciones de PbCl_2 (2, 4 y 8 mM) no indujeron un incremento significativo en el daño genético expresado como el % de DNA en la cola en hemocitos de larvas de *D. melanogaster*, en comparación con el control negativo. Por otro lado, el control positivo realizado en paralelo con 4 mM de EMS mostró una clara respuesta positiva, al incrementar notablemente el daño genético en hemocitos, lo que avala los resultados negativos observados.

Estos mismos resultados se pueden visualizar en la Figura 16, donde se observa que el promedio del % de DNA en la cola inducido por diferentes tratamientos con PbCl_2 , no supera al del control negativo, indicando que no existen diferencias significativas entre los valores de las series tratadas vs. el control negativo.

En la Tabla 25 se presenta el daño genético producido por el $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ medido como % de DNA en la cola en hemocitos de larvas de *D. melanogaster*. El compuesto fue administrado a larvas de 72 horas de vida (tercer estadio) en concentraciones comprendidas entre 2 y 8 mM. Después de 24 horas de exposición, se llevó a cabo el ensayo del cometa en hemocitos previamente aislados de la hemolinfa de las larvas tratadas.

Los tratamientos realizados con tres diferentes concentraciones $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (2, 4 y 8 mM) indujeron un incremento significativo en el daño genético expresado como % de DNA en la cola en hemocitos de *Drosophila*, con respecto al control negativo. Este incremento en el daño genético fue

significativo para las tres concentraciones evaluadas. Por otro lado, el control positivo realizado en paralelo con 4 mM de EMS mostró una clara respuesta positiva, lo que avala los resultados positivos observados y la bondad del protocolo seguido.

Los mismos resultados se pueden visualizar en la Figura 17, donde se observa que el promedio del % DNA en la cola inducido por diferentes tratamientos con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, supera al del control negativo, indicando que existen diferencias significativas entre los valores de las series tratadas vs. el control negativo.

Tabla 24. Efectos genotóxicos producidos por el PbCl₂ en hemocitos de *D. melanogaster*.

Compuestos	% DNA cola ^a	95% IC de % DNA cola ^b
Control	15,34 ± 0,80	14,20 16,48
2 mM PbCl ₂	14,12 ± 0,77	12,98 15,26
4 mM PbCl ₂	14,36 ± 0,84	13,22 15,50
8 mM PbCl ₂	14,65 ± 0,86	13,50 15,79
4 mM EMS	26,85 ± 0,84 ^{**}	25,71 27,99

^a Promedio ± error estándar de tres experimentos (300 células). ^b Intervalos de confianza del 95% para % de DNA cola.

^{**} P < 0,01 vs. control negativo.

Tabla 25. Efectos genotóxicos producidos por el $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en hemocitos de *D. melanogaster*.

Compuestos	% DNA cola ^a	95% IC de % DNA cola ^b
Control	15,07 ± 0,67	13,29
2 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	18,42 ± 0,79 **	16,64
4 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	17,64 ± 0,86 *	15,85
8 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	21,68 ± 1,16 **	19,90
4 mM EMS	26,52 ± 0,98 **	24,74
		16,86
		20,21
		19,42
		23,46
		28,31

^a Promedio ± error estándar de tres experimentos (300 células). ^b Intervalos de confianza del 95% para % de DNA cola.

* $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ vs. control negativo.

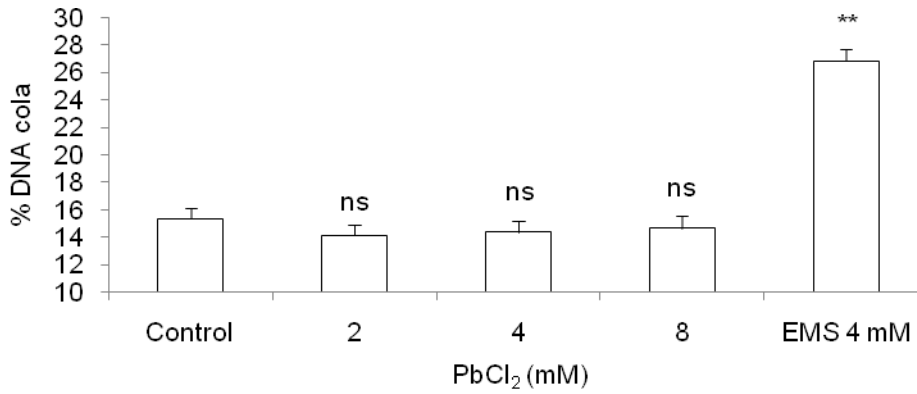


Figura 16. Daño genético producido por el PbCl_2 en hemocitos de *D. melanogaster*, medidos como el % DNA cola (promedio \pm error estándar). ns, no significativo; ** $P < 0,01$ en comparación con el control negativo.

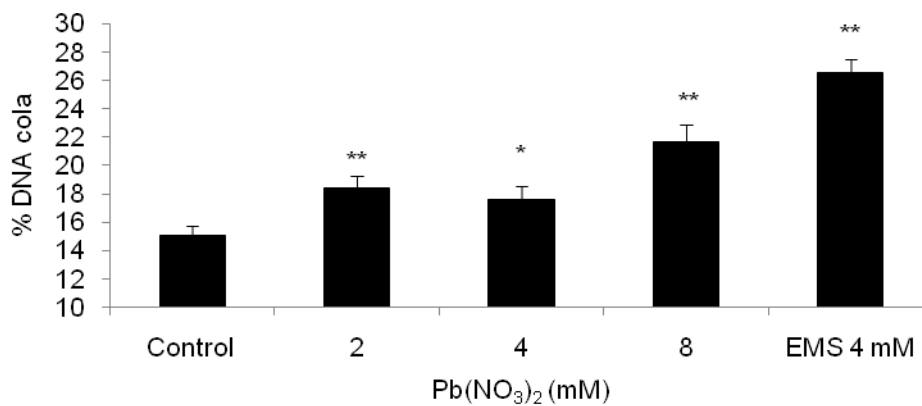


Figura 17. Daño genético producido por el $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en hemocitos de *D. melanogaster*, medidos como el % DNA cola (promedio \pm error estándar). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ en comparación con el control negativo.

4.3.2.3. Genotoxicidad de los compuestos de níquel

En la Tabla 26 se resumen los resultados obtenidos en el ensayo del cometa en hemocitos de larvas de *D. melanogaster* expuestas a NiCl_2 . El compuesto fue administrado a larvas de 72 horas de vida (tercer estadio) en concentraciones que fluctuaron entre 5 y 20 mM. El ensayo del cometa fue aplicado a hemocitos aislados de la hemolinfa de las larvas tratadas en cada experimento.

Los resultados obtenidos indican que los tratamientos realizados con tres diferentes concentraciones de NiCl_2 (5, 10 y 20 mM) no indujeron un incremento significativo en el daño genético expresado como el % de DNA en la cola en hemocitos de *D. melanogaster*, en comparación al control negativo. Por otro lado, el control positivo realizado en paralelo con 4 mM de EMS mostró una clara respuesta positiva, lo que avala los resultados negativos observados.

Estos mismos resultados se pueden visualizar en la Figura 18, donde se observa que el promedio del % de DNA en la cola inducido por diferentes tratamientos con NiCl_2 , no supera al del control negativo, indicando que no existen diferencias significativas entre los valores de las series tratadas vs. el control negativo.

En la Tabla 27 se resumen los resultados obtenidos con el ensayo del cometa en hemocitos de larvas de *D. melanogaster* expuestas al NiSO_4 . El compuesto fue administrado a larvas de 72 horas de vida (tercer estadio) en concentraciones que fluctuaron entre los 0,5 y los 5 μM . Después de 24 horas de exposición, se realizó el ensayo del cometa en hemocitos de larvas de *Drosophila*.

A diferencia de los resultados hallados con el NiCl_2 , los tratamientos con NiSO_4 indujeron un incremento significativo en el daño genético expresado en el % de DNA en la cola en hemocitos, con respecto al control negativo. El NiSO_4 mostró un incremento significativo del daño genético en todas las concentraciones evaluadas. Además, este incremento mostró una clara relación dosis-respuesta. Cabe señalar que, a la máxima concentración

evaluada (20 mM de NiSO₄), se obtuvo un nivel de daño genético similar al hallado con el control positivo llevado a cabo con 4 mM de EMS.

Los mismos resultados se pueden visualizar en la Figura 19, donde se puede observar claramente que, a medida que aumenta la dosis de NiSO₄, el daño genético expresado como % DNA en la cola también aumenta, alcanzando un valor máximo a la concentración de 20 mM.

Tabla 26. Efectos genotóxicos producidos por el NiCl₂ en hemocitos de *D. melanogaster*.

Compuesto	% DNA cola ^a	95% IC de % DNA cola ^b
Control	18,71 ± 0,81	17,04 20,40
5 mM NiCl ₂	16,79 ± 0,83	15,11 18,47
10 mM NiCl ₂	16,68 ± 0,85	15,00 18,36
20 mM NiCl ₂	13,63 ± 0,66	11,95 15,30
4 mM EMS	34,75 ± 1,07 ^{**}	33,07 36,42

^a Promedio ± error estándar de tres experimentos (300 células). ^b Intervalos de confianza del 95% para % de DNA cola.

^{**} P < 0,01 vs. control negativo.

Tabla 27. Efectos genotóxicos producidos por el NiSO₄ en hemocitos de *D. melanogaster*.

Compuesto	% DNA cola ^a	95% IC de % DNA cola ^b
Control	18,93 ± 0,84	16,94 20,93
5 mM NiSO ₄	20,43 ± 0,94 *	18,43 22,42
10 mM NiSO ₄	22,26 ± 0,95 **	20,27 24,26
20 mM NiSO ₄	34,63 ± 1,27 **	32,64 36,63
4 mM EMS	33,90 ± 1,04 **	31,90 35,90

^a Promedio ± error estándar de tres experimentos (300 células). ^b Intervalos de confianza del 95% para % de DNA cola.

* P < 0,05 y ** P < 0,01 vs. control negativo.

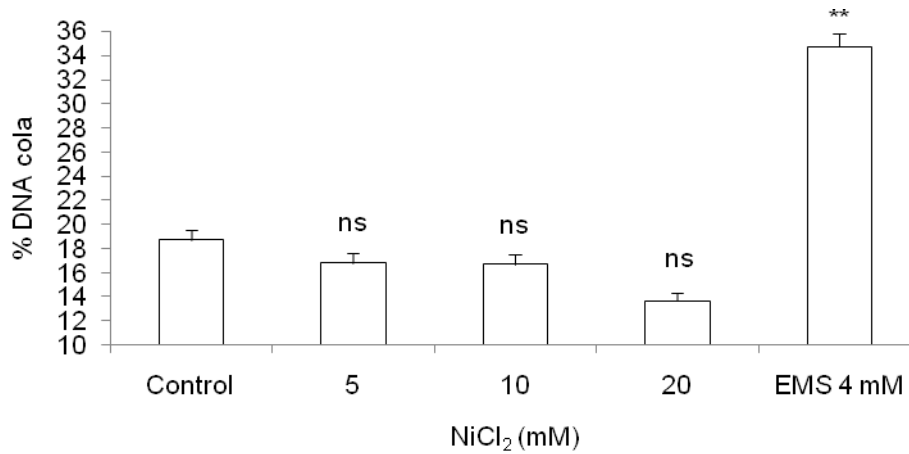


Figura 18. Daño genético producido por el NiCl_2 en hemocitos de *D. melanogaster*, medidos como el % DNA cola (promedio \pm error estándar). ns, no significativo; ** $P < 0,01$ en comparación con el control negativo.

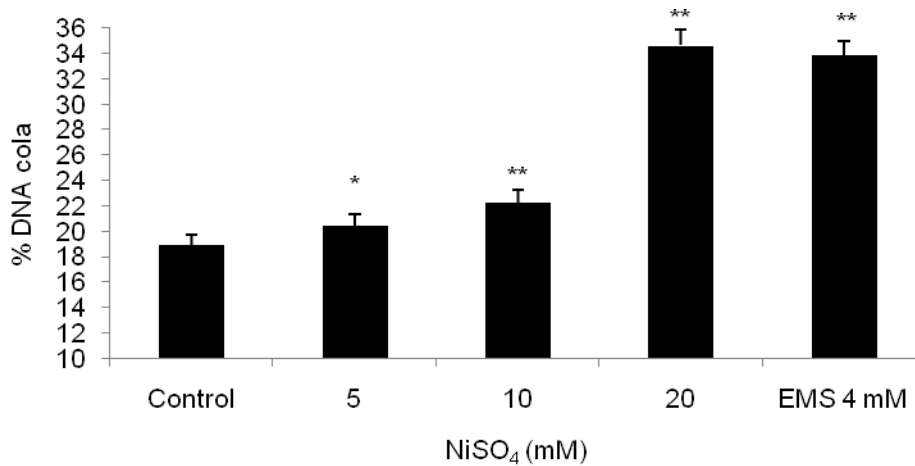


Figura 19. Daño genético producido por el NiSO_4 en hemocitos de *D. melanogaster*, medidos como el % DNA cola (promedio \pm error estándar). ns, no significativo; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ en comparación con el control negativo.

5. DISCUSIÓN

Ante todo, conviene señalar que el presente trabajo de tesis doctoral se enmarca dentro de la línea de investigación implementada desde hace más de 10 años por el Grupo de Mutagénesis de la Universitat Autònoma de Barcelona, y que tiene como objetivo principal el estudio de los mecanismos de acción genotóxica de los metales pesados mediante ensayos *in vivo*, utilizando *D. melanogaster* como organismo de estudio.

Diversas actividades humanas tales como la metalurgia y la quema de combustibles fósiles constituyen las principales fuentes de emisión de metales pesados al medio, por lo que han incrementado de forma notable las concentraciones de los metales pesados en los diferentes compartimentos medioambientales. Esta contaminación ha traído como consecuencia efectos nocivos tanto para el medioambiente como para los organismos vivos que en él se desarrollan, debido a sus altos niveles de bioacumulación y toxicidad. Dada esta doble problemática de creciente contaminación y elevada toxicidad, los metales pesados han sido objeto de estudio durante años, especialmente desde el punto de vista toxicológico, genotóxico y carcinogénico.

Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio han demostrado que *Drosophila* es un buen modelo de trabajo para el estudio de los mecanismos de acción genotóxica de algunos metales, tales como el cromo, selenio, cadmio y arsénico (Amrani *et al.*, 1999; Rizki *et al.*, 2001; 2004; 2006). Sin embargo, los mecanismos de acción genotóxica de muchos metales pesados siguen aún sin ser conocidos. De esta manera, en el presente trabajo nos planteamos contribuir a llenar este vacío, centrando nuestros esfuerzos en estudiar los efectos genotóxicos de tres metales pesados considerados actualmente como contaminantes importantes: el mercurio, el plomo y el níquel.

5.1. Genotoxicidad de los metales pesados con el ensayo SMART de alas en *Drosophila*

Cabe señalar que el ensayo *SMART* utilizado en este estudio presenta una serie de ventajas a la hora de evaluar la actividad genotóxica de diferentes tipos de agentes, tanto físicos como químicos. Una de las principales ventajas radica en que es una prueba de corta duración, lo cual implica una evaluación rápida, sencilla y económica de cualquier agente. Además, se trata de un ensayo *in vivo* que utiliza un organismo eucariota no mamífero, evitando así los problemas de limitación en el número de individuos utilizados que lógicamente conllevan los ensayos con mamíferos. Y, por último, se trata de un ensayo que puede detectar un amplio rango de daño genético, entre ellos la recombinación mitótica, la cual es de mucho interés para la detección de compuestos potencialmente carcinogénicos, ya que se ha señalado que este proceso puede estar relacionado con el desarrollo de cánceres en humanos (Stettler y Sengstag, 2001; Wijnhoven *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006).

Como ya se ha mencionado anteriormente, este ensayo presenta una gran versatilidad, lo cual permite que su uso y aplicación sean muy variados. Así, los trabajos realizados hasta ahora involucran diversas áreas como, por ejemplo, el estudio sobre la relación estructura-actividad de distintos grupos de compuestos químicos, la evaluación genotóxica de compuestos simples y mezclas complejas, estudios sobre antimutagénesis, tanto de compuestos específicos como de mezclas y la evaluación genotóxica de contaminantes ambientales, entre otros.

5.1.1. Compuestos de mercurio

Actualmente, se considera que el mercurio es uno de los contaminantes medioambientales más importantes, hallándose en aguas superficiales, y subterráneas, así como en suelos y aire (Nriagu y Pacyma, 1988; Slemr y Langer, 1992). La contaminación por este metal se produce principalmente por la quema de combustibles fósiles y vertidos industriales.

En los sedimentos, el mercurio inorgánico puede ser convertido en formas de metilmercurio por bacterias metanorgánicas. Esta biotransformación constituye un serio riesgo ambiental, ya que el metilmercurio es el compuesto de mercurio más tóxico y puede acumularse en la cadena trófica acuática, eventualmente alcanzando la dieta de los humanos (Tchounwou *et al.*, 2003).

En el presente trabajo, los tratamientos realizados con diferentes concentraciones de mercurio, tanto inorgánico como orgánico, no fueron capaces de inducir incrementos significativos en la frecuencia de ninguna de las tres categorías de clones mutantes analizados. Por un lado, estos resultados podrían ser explicados por las bajas dosis aplicadas en este estudio, dado que los individuos de la cepa *mwh/flr³* presentaron una alta sensibilidad a bajas dosis de mercurio. Por otro lado, deficiencias en procesos metabólicos y de bioacumulación del mercurio también podrían contribuir a explicar los resultados negativos encontrados en este estudio. Aunque, obviamente, también puede ocurrir que ninguno de los dos compuestos de mercurio empleados sea genotóxico en este ensayo.

De acuerdo con la IARC, los compuestos orgánicos de mercurio están clasificados en el grupo 2B, es decir, como posibles carcinógenos en humanos. En cambio, los compuestos inorgánicos de mercurio están clasificados en el grupo 3 como agentes no carcinógenos en humanos (Boffeta, 1993).

Según diferentes estudios realizados sobre la genotoxicidad del mercurio, ésta es altamente dependiente del tipo de ensayo usado y los resultados obtenidos son muy variados. En ensayos con bacterias, los compuestos de mercurio no inducen mutaciones puntuales o génicas (Shirasu *et al.*, 1976; Brown *et al.*, 1978; Bruce y Heddle, 1979; Kanematsu *et al.*, 1980; Brandi *et al.*, 1990); sin embargo, pueden ejercer efectos genotóxicos sobre los cromosomas de las células eucariotas, provocando clastogenicidad y

aneuploidía (Migliore *et al.*, 1999; Thier *et al.*, 2003; Bonacker *et al.*, 2004). En humanos, los estudios de biomonitorización de colectivos expuestos al mercurio muestran tanto resultados negativos como positivos e inconcluyentes, por lo que no permiten establecer un comportamiento bien definido de la genotoxicidad de este metal en exposición *in vivo* (De Flora *et al.*, 1994; Franchi *et al.*, 1994; Amorim *et al.*, 2000; Cebulska-Wasilewska *et al.*, 2005).

De acuerdo con numerosas investigaciones realizadas sobre la genotoxicidad del mercurio, especialmente en estudios con cultivos celulares, se ha reconocido que el daño típico que produce este metal a nivel cromosómico corresponde a alteraciones en la segregación de los cromosomas (Betti *et al.*, 1992; Migliore *et al.*, 1999; Akiyama *et al.*, 2001). Este tipo de daño se debe a que el mercurio es capaz de alterar la formación del huso mitótico durante la división celular, ya que tiene una alta afinidad por los grupos sulfhidrilo presentes en las proteínas de las fibras del huso mitótico (De Flora *et al.*, 1994). En investigaciones recientes se ha detectado que el mercurio actúa específicamente sobre las proteínas del citoesqueleto, tales como la quinesina y la tubulina, las cuales están relacionadas con la segregación de los cromosomas, entre otras funciones celulares (Thier *et al.*, 2003; Bonacker *et al.*, 2004; Stoiber *et al.*, 2004). Otro tipo de daño genético producido por este metal es el causado por la acumulación de especies reactivas de oxígeno en las células, acompañado por una reducción del glutatión, uno de los principales antioxidantes celulares (De Flora *et al.*, 1994). Por lo tanto, todos estos estudios parecieran indicar que el mercurio no interacciona directamente sobre el DNA y que los efectos observados serían el resultado de acciones indirectas. Este comportamiento explicaría la complejidad de los resultados observados en los estudios realizados para detectar la posible genotoxicidad de los compuestos de mercurio.

A pesar de que existe información previa sobre los efectos genotóxicos del mercurio en ensayos somáticos en *D. melanogaster*, ésta es escasa y no permite una conclusión clara sobre la actividad genotóxica del mercurio en *Drosophila*, debido a que sólo se han evaluado pocos compuestos y los efectos genotóxicos obtenidos han sido negativos y/o débilmente positivos (Rasmuson, 1985; Yesilada, 2001). Sin embargo, una contribución relevante al estudio de los efectos genotóxicos de los compuestos orgánicos e inorgánicos de mercurio

ha sido proporcionada por sistemas de ensayo *in vivo* con células germinales de *Drosophila*, evaluando diferentes efectos genéticos. En general, los resultados obtenidos por diferentes investigadores no han sido concordantes y, por lo tanto, resultan difíciles de interpretar.

Así, los compuestos orgánicos de mercurio han demostrado ser capaces de inducir mutaciones letales recesivas ligadas al cromosoma X en *D. melanogaster* (Mathew y Al-Doori, 1976; Gayathri y Krishnamurthy, 1985; Magnusson y Ramel, 1986); en cambio, el mercurio inorgánico no ha mostrado una actividad genotóxica en el mismo ensayo (National Toxicology Program, 1993). Los ensayos realizados para la detección de inducción de letales dominantes en *Drosophila* también dieron resultados negativos para compuestos orgánicos (Gayathri y Krishnamurthy, 1985); sin embargo, tratamientos realizados con larvas y adultos con mercurio inorgánico aportaron resultados positivos en ensayos de aneuploidía (Magnusson y Ramel, 1986; Osgood *et al.*, 1991).

De acuerdo con lo anteriormente mencionado, en *D. melanogaster* la genotoxicidad del mercurio podría depender altamente del compuesto, del blanco genético y del tipo celular utilizado; no obstante, hay que señalar que los resultados positivos obtenidos nunca han sido muy relevantes en cuanto su magnitud. A pesar de que se han evidenciado procesos de metabolización y de bioacumulación de compuestos de mercurio en *Drosophila* (Ramel y Magnusson, 1969), la diferente actividad de estas funciones entre distintas cepas podría influir también sobre los resultados discordantes encontrados en la literatura respecto de la actividad genotóxica (Osgood *et al.*, 1991). En relación a lo mencionado, estudios recientes llevados a cabo en nuestro laboratorio han demostrado que *Drosophila* es incapaz de metabolizar el arsénico, es decir, que no puede transformar el arsénico en sus formas metiladas. Esto determinaría notablemente la falta de actividad genotóxica de los compuestos inorgánicos de este metal pesado en el ensayo SMART en alas de *D. melanogaster* (Rizki *et al.*, 2006). Esto sugiere que los resultados negativos obtenidos en el presente trabajo podrían estar determinados también por una falta de biometilación de los compuestos de mercurio, lo que explicaría en buena parte la respuesta negativa hallada con el mercurio inorgánico, así como su menor toxicidad. Los análisis de toxicidad de los compuestos de

mercurio realizados en este estudio mostraron una baja resistencia de los individuos de la cepa *mwh/flr³* a dosis bajas de este metal, permitiendo sólo una evaluación genotóxica a dosis bajas y, presuntamente, con un menor potencial genotóxico. Por tanto, podría ser que la elevada toxicidad del mercurio en *Drosophila* encubriese su potencial genotóxico, y éste no se pudiera manifestar, dado que las células con daño en el DNA no serían viables.

5.1.2. Compuestos de plomo

El plomo es un contaminante ambiental importante, el cual puede inducir efectos tóxicos en los sistemas biológicos. Se sabe que puede ocasionar efectos deletéreos en muchos tejidos y órganos, entre los cuales los más afectados son el sistema nervioso, el renal y el reproductivo. Las principales fuentes de exposición en humanos son por inhalación y por ingestión. (Skerfving y Bergdahl, 2007).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sobre evaluación de los compuestos de plomo con el ensayo *SMART* en alas, muestran una clara respuesta negativa. Cabe señalar que los resultados aquí obtenidos no difieren mucho de los hallados por otros investigadores, ya que los compuestos de plomo son considerados mutágenos débiles y sus propiedades genotóxicas dependen altamente de las características químicas del compuesto de plomo analizado y del sistema de ensayo utilizado para medir su potencial mutagénico. Sin embargo, dada la baja toxicidad general observada, puede ser que los compuestos de plomo evaluados en el presente trabajo no posean genotoxicidad demostrable con el ensayo *SMART* en alas.

Los efectos genotóxicos de los compuestos de plomo han sido bien documentados en sistemas de ensayo *in vitro*, así como en experimentos con animales y humanos expuestos al plomo (Beyersmann y Hartwing, 2008). En general, los compuestos de plomo han mostrado ser mutágenos débiles en ensayos realizados con bacterias. A pesar de que en estudios recientes se han documentado efectos significativos del plomo en células humanas, como por ejemplo, la inducción de clastogénesis, aneuploidía y roturas de simple y doble cadena en el DNA de células humanas (Thier *et al.*, 2003; Wozniak y Blasiak, 2003; Bonacker *et al.*, 2004; Holmes *et al.*, 2006; Pasha Shaik *et al.*, 2006),

estos efectos genotóxicos parecen estar restringidos sólo a algunos compuestos de plomo que presentan poca solubilidad tales como el acetato de plomo y el cromato de plomo, mientras que los compuestos solubles (p. ej. nitrato y cloruro de plomo) muestran efectos negativos o débilmente positivos en algunos casos, sugiriendo que la solubilidad de los diferentes compuestos de plomo es un factor importante y que podría determinar su genotoxicidad, o que ésta podría ser un resultado de su insolubilidad (Winder y Bonin, 1993; Hartwig, 1998).

Existe un número importante de estudios llevados a cabo en relación a los efectos genotóxicos en humanos expuestos al plomo y la mayoría de ellos corresponden a exposiciones medioambientales u ocupacionales. Los resultados obtenidos son bastantes consistentes, indicando que una exposición laboral al plomo puede suponer un riesgo genético (Duydu *et al.*, 2001; Vaglenov *et al.*, 2001; Palus *et al.*, 2003). Esto confirmaría los resultados obtenidos *in vitro* con compuestos inorgánicos, que muestran efectos genotóxicos basados principalmente en el daño a los cromosomas, por ejemplo, clastogénesis y aneuploidía (Hartwing, 1994; Johnson, 1998). A pesar de que los mecanismos de estos efectos genotóxicos aún no están del todo claros, algunos investigadores han sugerido que los posibles mecanismos de acción más relevantes serían la producción de EROs y/o la inhibición de los mecanismos de reparación del DNA (Beyermann y Hartwing, 2008).

Estas variaciones de los efectos genotóxicos, en función del tipo de compuesto estarían de acuerdo con lo descrito por la IARC, que clasifica los compuestos inorgánicos de plomo como posibles carcinógenos en humanos (grupo 2B), mientras que los compuestos orgánicos de plomo los clasifica en el grupo 3, como agentes no carcinógenos en humanos (Boffeta, 1993). Estudios recientes demuestran que los compuestos inorgánicos de plomo presentan una débil asociación con la formación de algunos tipos de cánceres, como de pulmón y de estómago, pero esta evidencia epidemiológica es aún limitada (Steenland y Boffeta, 2000).

La información disponible actualmente sobre la genotoxicidad del plomo en sistemas de ensayo que utilizan *Drosophila* como organismo modelo es escasa y sólo incluye el análisis de algunos compuestos. En resumen, estos

estudios han analizado los efectos genotóxicos del plomo en células germinales y somáticas, pero los resultados obtenidos son poco concluyentes y no muestran una tendencia clara. Por un lado, un estudio llevado a cabo en células germinales demostró que los compuestos orgánicos e inorgánicos de plomo no inducen aneuploidía en *Drosophila* (Ramel y Magnusson, 1979). Por otro lado, en pruebas realizadas con el ensayo *SMART* en ojos de *Drosophila* los resultados obtenidos fueron negativos para el cloruro de plomo y el nitrato de plomo (Rasmuson, 1985), mientras que en estudios llevados a cabo con el ensayo *SMART* en alas, el nitrato de plomo indujo efectos débilmente positivos (Yesilada, 2001).

De acuerdo con lo anterior, parece ser que la genotoxicidad del plomo en *Drosophila* depende altamente de los compuestos evaluados y del ensayo utilizado para medir el daño genético. Sin embargo, es importante mencionar que la información existente es limitada y no permite una valoración general apropiada; por lo tanto, es difícil extraer conclusiones definitivas sobre los efectos genotóxicos de este metal en *Drosophila*, aunque en caso de producirse, han de ser muy débiles.

5.1.3. Compuestos de níquel

El níquel es un metal tóxico que puede producir efectos adversos en el sistema inmunitario, neurológico, reproductivo, además de generar cáncer en personas expuestas a dicho agente (Das *et al.*, 2008). Las principales fuentes de emisión de níquel provienen mayoritariamente de las actividades antropogénicas relacionadas con la metalurgia, la minería y la quema de combustibles fósiles y desechos industriales. Actualmente, el níquel es considerado un metal contaminante importante, por lo cual ha sido muy estudiado desde el punto de vista toxicológico y carcinogénico (Klein y Costa, 2007).

Por lo que respecta a la genotoxicidad del níquel, ésta ha sido objeto de una reciente revisión (Beyersmann y Hartwig, 2008). En humanos expuestos a compuestos solubles o pocos solubles de níquel, se han observado ligeros incrementos (no significativos) en la frecuencia de intercambios entre

cromátidas hermanas en linfocitos de sangre periférica (Waksvik *et al.*, 1984; Deng *et al.*, 1988) y resultados negativos en la inducción de micronúcleos en células de la mucosa bucal (Kiilunen *et al.*, 1997). En experimentos con animales, los tratamientos con sales solubles de níquel han causado aberraciones cromosómicas y micronúcleos (Sunderman *et al.*, 1990; Dhir *et al.*, 1991). En cultivos de células de mamífero, los iones de níquel (II) provocaron aberraciones cromosómicas, intercambios entre cromátidas hermanas, roturas del DNA, enlaces DNA-proteína, pero tan sólo a concentraciones bajas y no citotóxicas. Además, las sales solubles de níquel mostraron ser débilmente mutagénicas en células de mamíferos, pero inactivas en la mayoría de las pruebas mutagénicas con bacterias. Al menos, se han propuesto tres mecanismos principales de acción genotóxica para explicar los efectos del níquel: la generación de EROs, la interferencia con los procesos de reparación del DNA y los mecanismos epigenéticos que inducen un aumento en la proliferación celular.

Por lo que respecta al posible riesgo carcinogénico de níquel, la IARC ha considerado que los compuestos de níquel presentan evidencias suficientes de carcinogenicidad, tanto en humanos como en animales de experimentación, (grupo 1A). Sin embargo, los compuestos metálicos de níquel no han mostrado evidencias suficientes de cáncer en humanos, por lo cual han sido clasificados en el grupo 2B como posibles carcinógenos (Boffeta, 1993).

En el presente estudio hemos observado que el níquel no ha mostrado tener una actividad mutagénica y recombinogénica detectable en el ensayo *SMART* en alas. Posibles explicaciones a los resultados negativos hallados podrían estar relacionadas con el tipo de compuesto evaluado o con el blanco genético utilizado.

El níquel es un metal pesado que, aunque presenta actividad carcinogénica en humanos y en experimentos con animales, su potencial mutagénico es débil (Kasprzak *et al.*, 2003). El hecho de que los compuestos de níquel pueden aumentar la genotoxicidad en combinación con otros agentes que dañan el DNA hace suponer una acción indirecta de los compuestos de níquel en los procesos genotóxicos y/o cancerígenos. De esta manera, y

aunque los mecanismos de acción genotóxica del níquel no están completamente aclarados, los datos existentes parecen indicar que la inhibición de diferentes procesos de reparación del DNA podrían ser un mecanismo importante a la hora de explicar la genotoxicidad y carcinogenicidad del níquel (Hartwig y Schwerdtle, 2002).

En general, la información disponible sobre los efectos mutagénicos del níquel en *Drosophila* es escasa y se limita a datos basados mayoritariamente en estudios realizados a nivel somático. Por un lado, en el ensayo *SMART* en ojos de *Drosophila* (sistema UZ), los compuestos solubles de níquel no mostraron una actividad mutagénica (Rasmuson, 1985). Sin embargo, el níquel presentó una actividad genotóxica débil en el ensayo *SMART* en alas, aunque tan sólo a concentraciones altas y con compuestos de níquel que son poco solubles en agua (Ogawa *et al.*, 1994; Yesilada, 2001; Chiu *et al.*, 2004). Por otro lado, las escasas aproximaciones utilizando ensayos con células germinales indican que el sulfato de níquel, un compuesto poco soluble, puede ser un genotóxico débil en los ensayos *SLRLT* y de aneuploidía (Rodríguez-Arnaiz y Ramos, 1986). No existe información previa sobre la interacción del níquel con otros agentes mutagénicos en *D. melanogaster*, lo cual impide saber si el níquel puede ser comutágeno, o producir otros efectos en el DNA; por lo tanto, son necesarios nuevos estudios que involucren tratamientos combinados del níquel en un mismo diseño experimental a la hora de establecer efectos moduladores de la genotoxicidad del níquel en *Drosophila*.

Los resultados débiles e inconcluyentes obtenidos en la determinación de la genotoxicidad del níquel en *D. melanogaster* podrían estar relacionados con el tipo de compuesto, el sistema de ensayo y el tipo celular utilizado; sin embargo, hay que señalar que los resultados obtenidos por diferentes autores muestran que el níquel presenta una actividad genotóxica débil o una falta de genotoxicidad. Por lo tanto, con genotóxicos muy débiles es normal encontrar ya sea resultados ligeramente positivos como negativos, independientemente del ensayo utilizado y/o del blanco genético seleccionado.

5.2. Interacción de los metales pesados con la radiación- γ

El desarrollo de los ensayos *SMART* ha proporcionado técnicas sensibles, económicas y rápidas para la investigación de las propiedades mutagénicas y recombinogénicas de una gran variedad de compuestos químicos. En este sentido, cabe destacar la eficacia de los tratamientos combinados con agentes químicos y físicos a fin de estudiar propiedades antimutagénicas y otros efectos moduladores. Este tipo de estudios son muy importantes en la evaluación de las propiedades genotóxicas de los metales, ya que se estima que muchos de ellos pueden interferir con los mecanismos de reparación, modulando los efectos de otros agentes de probada actividad genotóxica.

Así, los estudios de interacción tienen como objetivo conocer si un determinado compuesto muestra algún tipo de interacción en tratamientos combinados con un mutágeno conocido (p. ej. EMS o radiación- γ). Por tanto, si un compuesto tiene la capacidad de aumentar significativamente los efectos mutagénicos del mutágeno estándar, se le puede clasificar como comutagénico o con efecto sinérgico; en cambio, si este compuesto muestra una reducción de los efectos mutagénicos, quiere decir que es un compuesto antimutagénico o de comportamiento antagónico. Finalmente, si un agente no es capaz de alterar estos efectos, tiene un comportamiento aditivo; es decir, no interfiere con ninguno de los mecanismos por los cuales el genotóxico estándar utilizado ejerce su acción genotóxica.

En general, los estudios de interacción llevados a cabo son escasos, debido quizás a la dificultad que conlleva realizarlos y/o a la falta de ensayos adecuados que permitan este tipo de evaluaciones. Sin embargo, en los últimos años ha habido un creciente interés por estos estudios, sobre todo por el hecho de que se pueden conocer posibles alteraciones en los mecanismos de reparación y/o determinar el efecto protector de algunos compuestos químicos sobre el DNA.

Como ya se ha mencionado anteriormente, los metales pesados pueden inducir daño en el DNA por diferentes mecanismos indirectos. Entre ellos, los que han tomado más fuerza a la hora de explicar la genotoxicidad de los

metales son los que conducen a la generación de EROs, que pueden producir daño oxidativo en el DNA y la inhibición de la mayoría de los sistemas de reparación como resultado de la inestabilidad genómica y la acumulación de mutaciones críticas. Este último mecanismo de acción puede ser una vía exclusiva por la cual algunos metales con efecto mutagénico débil (p. ej. Pb y Ni) puedan causar efectos nocivos en el material genético.

Es por estas razones que en el presente estudio nos hemos centrado en conocer las posibles interacciones de los metales Hg, Pb y Ni con la radiación- γ para obtener información sobre posibles efectos moduladores de estos metales en la reparación del DNA en *Drosophila*. Se ha escogido la radiación- γ en lugar de compuestos químicos para evitar interferencias desconocidas entre estos, lo que podría dificultar la interpretación de los resultados. Así, la radiación sería un agente genotóxico “limpio” en el sentido de que el agente como tal desaparecería tras la irradiación, permaneciendo sólo sus efectos genotóxicos. De esta manera, cualquier alteración en los efectos causados por el cotratamiento, indicaría que éste afecta directamente sobre el daño inducido o los mecanismos celulares necesarios para procesar dicho daño.

5.2.1. Mercurio vs radiación- γ

En primer lugar hay que destacar que los compuestos de mercurio ensayados han resultado ser negativos en cuanto a su actividad genotóxica en el ensayo *SMART* en alas de *D. melanogaster*. La información sobre los efectos genotóxicos a nivel somático y germinal del mercurio en *Drosophila* muestra resultados diversos y difíciles de interpretar, lo cual sugiere que la genotoxicidad del mercurio depende del tipo de compuesto utilizado, del tipo celular y del ensayo empleado. Además, los resultados obtenidos previamente por Rasmuson (1985) en el ensayo *SMART* en ojos y Yesilada (2001) en el ensayo *SMART* en alas, están de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio.

Los efectos moduladores del mercurio se han estudiado en diferentes organismos y empleando diversos sistemas de ensayo, tanto *in vitro* como *in*

vivo. Estos estudios han puesto de manifiesto diferentes efectos; sin embargo, una evaluación general de los resultados obtenidos indica que los compuestos de mercurio presentan una actividad comutagénica débil en comparación con otros metales pesados (Hartwig, 1994). Así, en sistemas de ensayos que utilizan bacterias, el mercurio inorgánico no mostró efectos comutagénicos en tratamientos combinados con la radiación UV (Rossman y Molina, 1986). En estudios realizados con células de mamíferos en cultivo se han encontrado resultados ambiguos. Así, por un lado, el mercurio orgánico puede aumentar la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducidas por la 4-NQO y el MMS, mientras que el mercurio inorgánico no mostró una interacción significativa con estos compuestos (Yamada *et al.*, 1993). Por otro lado, el mercurio inorgánico no indujo un aumento de roturas en el DNA en tratamientos combinados con radiación ionizante (rayos X) en cultivos de células de mamífero (Burkart y Ogorek, 1986). Además, estudios *in vivo* realizados en roedores no mostraron efectos sinérgicos entre la combinación del mercurio inorgánico y el EMS, ni en células somáticas ni en germinales (Poma *et al.*, 1984). Así pues, los resultados existentes en la literatura sobre el papel comutagénico del mercurio son variables, en función del tipo del compuesto y del agente genotóxico analizado en los cotratamientos, así como en función del sistema de ensayo y del organismo utilizado.

En el presente trabajo, los resultados obtenidos sobre la interacción del mercurio con la radiación- γ indican que, dentro del total de concentraciones aplicadas, ninguno de los compuestos de mercurio aumentó la genotoxicidad inducida por la radiación- γ . Resultados similares se han encontrado en el ensayo *SMART* en ojos de *Drosophila* (Rasmuson, 1985), donde el mercurio orgánico no mostró efectos comutagénicos en tratamientos combinados con radiación ionizante (rayos X). Sin embargo, cuando este mismo compuesto se combinó con el MMS, el mercurio incrementó la formación de clones mutantes en ojos de *Drosophila*, sugiriendo que la interacción del mercurio podría depender del agente mutagénico utilizado en los estudios de interacción.

De todos los datos obtenidos se desprende que los mecanismos de genotoxicidad del mercurio son complejos y la información disponible dificulta el poder llegar a conclusiones definitivas, por lo que se necesitan estudios más

profundos para entender el papel que tiene el mercurio en los procesos genotóxicos. Sin embargo, hay que enfatizar la elevada toxicidad mostrada por el mercurio en *Drosophila*, lo que dificulta detectar, si los hubiera, posibles efectos mutagénicos o comutagénicos.

5.2.2. Plomo vs radiación-γ

La genotoxicidad del plomo, como sucede con otros metales, se ha asociado principalmente a mecanismos indirectos, como son la inducción de daño oxidativo a través de la generación de EROs y la interacción con procesos de reparación del DNA (Hartwig, 1995). La posible interferencia con los mecanismos de reparación es una propuesta que está ganando adeptos, debido a que el plomo es un mutágeno débil, pero en estudios *in vitro* ha demostrado que puede interferir en los procesos de reparación del DNA y puede actuar sinérgicamente con otros mutágenos (Steenland y Boffeta, 2000). Sin embargo, la inducción de daño oxidativo en el DNA por el plomo es un tema discutido, debido a que tiene lugar con compuestos de plomo más insolubles y con exposiciones que incluyen concentraciones más elevadas y citotóxicas.

En general, existen pocos datos disponibles acerca de los efectos del plomo sobre la inhibición de la reparación del DNA, y la mayoría de ellos se centran en resultados obtenidos en estudios *in vitro* con células de mamífero. Aunque no existe información previa sobre los posibles efectos moduladores del plomo en sistemas de ensayos en bacterias, los compuestos de plomo muestran un incremento de los efectos genotóxicos de la radiación UV y de los agentes alquilantes en células de mamífero, sugiriendo que la interferencia con los sistemas de reparación parece ser la causa más probable (Hartwig *et al.*, 1990; Roy y Rossman, 1992). Sin embargo, algunos estudios realizados *in vivo* muestran que pueden haber efectos aditivos cuando existe una coexposición del plomo con el humo de tabaco (Rajah y Ahuja, 1995) y con la radiación ionizante (Restrepo *et al.*, 2000). No obstante, hay que recordar que existen distintos mecanismos involucrados en la reparación del DNA y que estos se pueden activar en función del daño producido. Así, no debería resultar extraño

encontrar efectos sinérgicos frente a la acción de determinadas genotoxinas y aditivos. Esto podría aportar información acerca de la ruta de reparación sobre la que actúa el compuesto seleccionado, en este caso el plomo.

Se debe señalar que los compuestos de plomo evaluados en este estudio no han presentado una actividad genotóxica detectable en el ensayo *in vivo SMART* en alas de *D. melanogaster*, lo cual va de acuerdo con los resultados observados previamente por diferentes autores en *D. melanogaster* tanto a nivel germinal (Ramel y Magnusson, 1979) como a nivel somático (Rasmuson, 1985; Yesilada, 2001).

En nuestro estudio de interacción entre el plomo y la radiación- γ , observamos que ninguno de los dos compuestos de plomo analizados incrementa los efectos genotóxicos de la radiación- γ , indicando que el plomo tiene un claro efecto aditivo. A pesar de que no existen aproximaciones sobre la interacción del plomo con agentes mutagénicos en *Drosophila*, lo cual nos impide hacer posibles comparaciones, estudios *in vivo* previos realizados con linfocitos humanos expuestos simultáneamente al plomo y al humo de tabaco muestran que este metal no incrementa la frecuencia de intercambios entre cromátidas hermanas (Rajah y Ahuja, 1995). Además, Restrepo *et al.* (2000) también obtuvieron resultados similares cuando observaron que no había diferencias significativas entre las roturas de cadena simple causadas por una exposición al plomo y las roturas generadas después de una irradiación de las mismas células con radiación ionizante (rayos X). Esto sugiere que, en estudios *in vivo*, el plomo no muestra un comportamiento sinérgico con otros agentes mutagénicos, en comparación a los estudios *in vitro*, lo cual parecería indicar que el plomo no interfiere en la reparación del DNA. Posibles explicaciones a estas diferencias son difíciles de establecer dada la poca información existente sobre los efectos moduladores del plomo en sistemas de ensayos *in vivo*. Sin embargo, estos resultados abren la posibilidad de que otros mecanismos, fuera de la interferencia con los mecanismos de reparación, puedan estar involucrados en la genotoxicidad del plomo. Se necesita llevar a cabo nuevos estudios que involucren otros ensayos *in vivo* para dilucidar el papel que juega el plomo en la reparación del DNA.

5.2.3. Níquel vs radiación- γ

A diferencia de lo que sucede con los otros dos metales evaluados, la actividad comutagénica del níquel ha sido ampliamente estudiada en diferentes sistemas de ensayo *in vivo* e *in vitro*; sin embargo, de los resultados se desprende la existencia de claros efectos comutagénicos del níquel en sistemas *in vivo*. Es en este contexto que el presente estudio se diseñó para poder clasificar los efectos del níquel sobre la genotoxicidad de la radiación- γ , y en nuestro caso utilizamos el ensayo *in vivo* SMART de alas de *Drosophila*.

En estudios *in vitro*, el níquel ha mostrado poseer un claro efecto comutagénico, interfiriendo con varias vías de reparación del DNA. Así, los iones de níquel pueden aumentar la genotoxicidad producida por el MMS, la radiación UV y otros agentes genotóxicos (Hartwig, 1995), como se ha demostrado en bacterias donde los compuestos de níquel pueden aumentar la frecuencia de mutaciones puntuales en combinación con la radiación UV (Rossman, 1981). Efectos similares se han encontrado en células de mamífero donde el níquel puede provocar el aumento de mutaciones y de intercambios entre cromátidas hermanas, cuando se combina con el benzo[α]pireno, la radiación UV y la radiación- γ (Rivedal y Sanner, 1980; Lee-Chen *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 2000). Por otro lado, también se han documentado efectos comutagénicos del níquel, a concentraciones no citotóxicas, en linfocitos humanos coexpuestos *in vitro* a la radiación UV y al compuesto alquilante MNNG (Wozniak y Blasiak, 2004).

En resumen, la interferencia de los mecanismos de reparación del DNA por el níquel parece estar bien documentada y puede ser un buen argumento para explicar el aumento de los efectos mutagénicos observados en combinación con otros agentes que dañan el DNA (Hartwig *et al.*, 1994a; Hartmann y Hartwig, 1998; Iwitzki *et al.*, 1998).

A pesar de que los mecanismos precisos por los cuales el níquel puede inhibir la reparación del DNA no están claros, algunos datos sugieren que, en general, los procesos de reparación por escisión se ven afectados (Hartwig, 1994). El hecho de que tanto el aumento del daño genético como la inhibición

de la reparación ocurra a concentraciones no citotóxicas indica su posible relevancia en la genotoxicidad de los compuestos de níquel (Hartwig, 1995).

En nuestro estudio, los resultados obtenidos indican que los compuestos de níquel modifican significativamente los efectos genotóxicos producidos por la radiación- γ , lo que avalaría lo antes indicado. Por un lado, el cotratamiento con NiCl_2 muestra un claro incremento dosis-respuesta de la frecuencia de todas las categorías de sectores mutantes. Por otro lado, el NiSO_4 también induce un incremento significativo de la frecuencia de los tres tipos de clones mutantes bajo las tres concentraciones aplicadas. Así, los resultados obtenidos muestran que tanto el NiCl_2 como el NiSO_4 presentan un comportamiento de tipo sinérgico en tratamientos combinados con la radiación- γ .

A pesar de que no existe información sobre la interacción del níquel con agentes mutagénicos en *Drosophila*, lo que nos impide hacer posibles comparaciones, estudios realizados con células de hámster chino muestran que el níquel inhibe la reparación de las roturas de doble cadena de DNA causadas por la radiación- γ (Takahashi *et al.*, 2000). Por lo tanto, la acción sinérgica de los compuestos de níquel observada en nuestro estudio puede estar relacionada con la capacidad de este metal de inhibir los procesos de reparación de las dobles roturas del DNA causadas por la radiación- γ en *Drosophila*.

5.3. Ensayo del cometa en hemocitos de *Drosophila*

Uno de los aspectos más relevantes de nuestro trabajo ha sido el diseñar y poner a punto el ensayo del cometa en *Drosophila* con un tipo celular no utilizado hasta ahora, como lo son los hemocitos.

Como ya se ha comentado, el ensayo del cometa es una de las técnicas más sensibles, rápidas y económicas para la evaluación genotóxica, que permite la evaluación tanto cuantitativa como cualitativa del daño en el DNA, en cualquier tipo de célula eucariota. Estas características han conducido a que esta técnica sea una de las más populares para la evaluación genotóxica, aplicándose en diferentes áreas como, por ejemplo, toxicología genética, monitorización ambiental y biomonitorización de poblaciones humanas expuestas accidental, laboral o clínicamente. A pesar de esta creciente expansión del ensayo del cometa, su aplicación en *Drosophila* ha sido más bien modesta, lo que plantea el reto de su optimización con un protocolo fácil que permita extender su uso.

Una de las ventajas del ensayo del cometa para los estudios de genotoxicidad *in vivo* es la posibilidad de emplear cualquier tipo de tejido como material de análisis, lo que ha hecho que este ensayo sea versátil y pueda ser adaptado y aplicado a diferentes organismos modelo, incluyendo levaduras, moluscos y anélidos, entre otros. Aunque teóricamente cualquier tipo de célula puede ser utilizado, parece obvio que aquellas que supongan un protocolo más simple constituyan la primera opción a la hora de realizar este ensayo. Sin embargo, la sencillez no debiera ser único requisito, ya que su relevancia en toxicología genética, debería ser el factor selectivo al escoger uno u otro tipo celular. Así, aquellas células/tejidos que supongan una mayor exposición deberían ser las utilizadas en estudios de genotoxicidad.

Recientemente, el ensayo de cometa ha sido adaptado y aplicado en *D. melanogaster* para la evaluación de diferentes compuestos químicos y contaminantes ambientales (Mukhopadhyay *et al.*, 2004; Siddique *et al.*, 2005a; b; 2008). Estos estudios, que utilizan como blanco células de ganglios cerebrales e intestinales, han demostrado que *Drosophila* es un modelo

adecuado para la evaluación genotóxica *in vivo* utilizando esta técnica. Además, este ensayo ofrece la posibilidad de detectar mecanismos de mutagénesis, relacionados con efectos en la reparación del DNA en *D. melanogaster* como se ha observado frente a la exposición con MMS, EMS y ENU utilizando neuroblastos (Bilbao *et al.*, 2002).

Dado que en los estudios *in vivo* que utilizan mamíferos o humanos los linfocitos de sangre periférica constituyen el material generalmente utilizado, parece lógico plantearse utilizar un sistema equivalente en *Drosophila*. Aunque en invertebrados no existe un sistema circulatorio similar al de los mamíferos, y la circulación es abierta, sí que existe un sistema celular equivalente al de los linfocitos en mamíferos: los hemocitos presentes en la hemolinfa.

5.3.1. Puesta a punto del ensayo del cometa en hemocitos de Drosophila

La hemolinfa de los invertebrados ha sido considerada como uno de los tejidos más apropiados para la evaluación de genotoxicidad de diferentes compuestos químicos y contaminantes ambientales, debido a su papel fisiológico en el transporte de sustancias tóxicas y en los mecanismos de defensa, estando expuesta directamente a los distintos agentes químicos (Mersch *et al.*, 1996; Rigonato *et al.*, 2005; Villela *et al.*, 2006, 2007). Además, ha demostrado ser un tejido muy sensible al daño producido por diferentes agentes, tales como el MMS y el H₂O₂ (Rigonato *et al.*, 2005; Cheung *et al.*, 2006) y a contaminantes ambientales como el sulfato de cobre y el pentaclorofenol (Villela *et al.*, 2006). En comparación a otros tejidos de invertebrados (e.g. branquias) la hemolinfa es mejor a la hora de realizar estudios *in vivo* con el ensayo del cometa, ya que es mucho más fácil de extraer, manipular y obtener células aisladas (Rank y Jensen, 2003).

Recientemente, el ensayo del cometa *in vivo* se ha desarrollado y aplicado en diversas células somáticas de *Drosophila*. Sin embargo, en estos estudios el ensayo del cometa se ha aplicado sólo a algunos tejidos del sistema nervioso y del intestino, mientras que las células sanguíneas o hemocitos de

Drosophila no han sido objeto de estudio con este sistema de ensayo, lo que da una especial relevancia a nuestro estudio.

El desarrollo del ensayo del cometa utilizando un nuevo sistema celular requiere: a) una fácil obtención y en cantidades suficientes de las células deseadas, b) unos valores basales de daño genético similares a los observados en otros sistemas celulares, y c) una demostración de que estas células son sensibles a la acción genotóxica de mutágenos estándar. Estos tres aspectos los cumple satisfactoriamente el protocolo desarrollado con hemocitos.

Respecto al primer punto, tanto el número de células obtenido como su calidad son más que suficientes para llevar a cabo los estudios con el ensayo del cometa. En este punto, hay que resaltar que al estar los hemocitos en suspensión, no requieren ninguna manipulación agresiva para su obtención. El procedimiento para disgregar un tejido puede dañar el DNA, lo que se manifestaría en unos niveles basales de daño elevados, resultado de la manipulación. Esto no sucede con nuestra propuesta de protocolo, por lo que los niveles observados de daño son bastante bajos. Por lo que respecta al tercer aspecto, a continuación se discuten los resultados obtenidos en el estudio piloto.

El estudio piloto para conocer la sensibilidad de los hemocitos consistió en la primera evaluación de los efectos genotóxicos del EMS, PDC y la radiación- γ . Los tratamientos realizados por 24 ± 2 horas a las larvas de tercer estadio, con dosis mutagénicas de EMS, PDC y radiación- γ , claramente indujeron daño en el DNA de los hemocitos; además, los análisis sugieren que los hemocitos muestran un evidente efecto dosis-respuesta entre el incremento de las dosis de los tres agentes mutagénicos aplicados y el incremento de lesiones en el DNA medidos con el % de DNA en la cola, demostrando que *D. melanogaster* es un buen bioindicador de exposición a agentes genotóxicos por medio de este tipo de células y ensayo.

A pesar de que las células del intestino (otro tipo de células propuesto) son el objetivo primario de los genotóxicos cuando son administrados a los organismos a través de la comida por vía oral, los hemocitos que circulan por la hemolinfa también pueden ser afectados, debido a que estas sustancias tóxicas ingresan y son transportadas a través de este líquido circulatorio en el

organismo (Mersch *et al.*, 1996). Así, y junto a las facilidades que ofrece trabajar con este tipo de tejido, consideramos que los hemocitos constituyen una buena alternativa para la evaluación del potencial genotóxico de los agentes seleccionados en el presente estudio.

Las razones por las cuales fueron seleccionados el EMS, el PDC y la radiación- γ radican en que son agentes con efectos mutagénicos bien demostrados, los cuales pueden causar diferentes tipos de daño en el DNA y sus mecanismos de acción están bien establecidos. Además, estos agentes pueden causar efectos genotóxicos en diferentes tejidos de *Drosophila*. El EMS es un agente alquilante que puede causar diferentes tipos de lesiones en el DNA, provocando distintos tipos de daños a nivel cromosómico, tales como aberraciones cromosómicas, clastogénesis y aneuploidía. El PDC es un metal que ha mostrado efectos genotóxicos a través de la producción de EROs y la inhibición de mecanismos de reparación; y, finalmente, la radiación- γ es un agente físico que puede producir roturas de simple y doble cadena, los que pueden conducir a aberraciones cromosómicas. Por lo tanto, al seleccionar tres agentes con modos de acción bien diferenciados, nos aseguramos de que el ensayo propuesto no es específico de un único tipo de lesión genotóxica, sino que sea capaz de detectar un amplio abanico de daños en el DNA.

En el presente estudio, las dosis de los tres agentes mutagénicos fueron seleccionadas debido a que mostraron efectos genotóxicos claros bajo condiciones de reparación normales (cepa Oregon R) y sin mostrar efectos tóxicos importantes. Como se ha indicado, los mutágenos evaluados son diferentes desde el punto de vista de su naturaleza (física y química) y propiedades genotóxicas; no obstante, los resultados indican que el EMS y la radiación- γ presentan una buena correlación entre las dosis aplicadas y el daño genético producido, sugiriendo que estos agentes podrían ser mutágenos más efectivos para ser considerados como controles positivos cuando se lleva a cabo el ensayo del cometa en hemocitos de *Drosophila*.

En general, los resultados obtenidos con el ensayo del cometa están de acuerdo con lo encontrado por otros autores en *Drosophila*, en donde diferentes sistemas de ensayos y tejidos muestran un daño genético claro con estos tres tipos de agentes (de la Rosa *et al.*, 1994; Bilbao *et al.*, 2002;

Siddique *et al.*, 2005a), lo que demuestra la amplia sensibilidad del ensayo propuesto.

Finalmente, y como conclusión general, podemos decir que los resultados del estudio piloto claramente demuestran que el ensayo del cometa *in vivo* en hemocitos de *D. melanogaster* es adecuado para detectar efectos mutagénicos de agentes químicos y físicos, sugiriendo al mismo tiempo que esta técnica puede ser utilizada para evaluar otros tipos de agentes genotóxicos.

5.3.2. Genotoxicidad de los metales pesados con el ensayo del cometa en hemocitos de *Drosophila*

Como ya se ha comentado varias veces, los metales pesados han mostrado diversos efectos y los resultados obtenidos en la mayoría de los ensayos de genotoxicidad son ambiguos. Estas razones podrían estar relacionadas con problemas de solubilidad, toxicidad e interferencias químicas de los metales evaluados, pero también podrían estar asociadas con que muchas veces no se utilizan los ensayos mutagénicos adecuados. De esta manera, a la hora de establecer y conocer los efectos de los metales o metaloides sobre el material genético se deberían utilizar ensayos sensibles, específicos y capaces de detectar un amplio rango de mutaciones.

Como se ha mencionado anteriormente, el ensayo del cometa es una técnica muy versátil y muy sensible, ya que permite evaluar el daño genético primario de forma rápida, sencilla y en cualquier tipo de célula eucariota con un número reducido de células. Estas características, además de su alta sensibilidad han llevado a que este ensayo sea ampliamente utilizado en estudios *in vivo* e *in vitro*, con diferentes tipos de organismos y tejidos (Tice *et al.*, 2000).

Por lo que respecta a la evaluación genotóxica *in vivo* de muchos metales pesados, el ensayo del cometa ha sido muy utilizado, demostrando ser un método sensible y rápido para detectar el daño genético en diferentes

organismos modelo (Devi *et al.*, 2001, 2003, 2004; Guecheva *et al.*, 2001; Gichner *et al.*, 2006; Reinecke y Reinecke, 2004).

Los protocolos hasta ahora descritos sobre el uso del ensayo del cometa en *Drosophila*, con neuroblastos o células del tubo digestivo, se han aplicado con pocos compuestos, no estando los metales representados en estos estudios hasta ahora.

Así, y vista la eficacia del ensayo del cometa con hemocitos de *Drosophila* para detectar genotóxicos, tanto químicos como físicos, en el presente apartado queremos establecer si este ensayo presenta una mayor sensibilidad en comparación a la mostrada por el ensayo *SMART* de alas, evaluando los diferentes metales pesados seleccionados.

5.3.2.1. *Compuestos de mercurio*

En el presente trabajo, los tratamientos realizados con diferentes concentraciones de mercurio inorgánico no indujeron efectos genotóxicos *in vivo* en hemocitos de las larvas de *Drosophila* evaluados con el ensayo del cometa. Sin embargo, los resultados obtenidos con el mercurio orgánico indican que este compuesto induce efectos genotóxicos en hemocitos de *Drosophila* bajo la mayor concentración evaluada.

Cabe señalar que a pesar de que existe abundante información sobre la genotoxicidad de los compuestos de mercurio en diferentes sistemas de ensayos y en diferentes organismos modelo la información disponible en la literatura es poca, compleja y por lo tanto difícil de interpretar.

Los compuestos de mercurio por lo general no producen mutaciones puntuales en bacterias, pero pueden producir efectos clastogénicos en ciertos sistemas eucariotas. Los estudios citogenéticos llevados a cabo con personas expuestas al mercurio muestran resultados ambiguos y difíciles de interpretar. El daño más típico causado por el mercurio es la alteración de los mecanismos del huso mitótico, debido a su alta afinidad por los grupos sulfhidrilo presentes en las proteínas del huso mitótico. No obstante, la genotoxicidad de los

compuestos inorgánicos podría estar relacionada más bien con la generación de EROs y la reducción de glutathion en las células de los mamíferos.

El ensayo del cometa ha sido poco aplicado en el estudio de la actividad genotóxica del mercurio. Sin embargo, la información disponible pone de manifiesto que esta técnica es adecuada a la hora de detectar el daño genético producido por este tipo de metal. Así, el ensayo del cometa parece tener una alta sensibilidad al detectar daño genético producido por el cloruro de mercurio y del metilmercurio en linfocitos humanos *in vitro* a bajas concentraciones (Silva-Pereira *et al.*, 2005). Además, este ensayo es capaz de detectar las deficiencias en la reparación del DNA en células sanguíneas de trabajadores expuestos a vapores de mercurio (Cebulska-Wasilewska *et al.*, 2005). Así, parece ser que este ensayo muestra una amplia sensibilidad y es capaz de detectar un amplio rango de daños en el DNA causados por el mercurio, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*.

En nuestro estudio, nos hemos visto en la obligación de utilizar concentraciones muy bajas de ambos compuestos de mercurio (μM), debido a que estos compuestos fueron altamente tóxicos para las larvas de *Drosophila*. Sin embargo, esta cuestión no fue impedimento para detectar el daño genético inducido por concentraciones bajas de metilmercurio en hemocitos de la mosca de la fruta, lo cual confirma la sensibilidad del ensayo del cometa para detectar daño primario. Hay que destacar que de los distintos compuestos de mercurio, es el metilmercurio el más peligroso desde el punto de vista tóxico y genotóxico, lo que da una especial relevancia a los resultados encontrados mediante la utilización del ensayo del cometa.

Por lo tanto, podemos concluir que el ensayo propuesto es mucho más sensible que el ensayo *SMART* de alas y, gracias a esta mayor sensibilidad, hemos podido identificar la existencia de efectos genotóxicos tras la exposición *in vivo* al metilmercurio.

5.3.2.2. Compuestos de plomo

Los compuestos de plomo evaluados en este trabajo mostraron respuestas genotóxicas diferentes con el ensayo del cometa en hemocitos de *D. melanogaster*. Así, mientras el cloruro de plomo muestra resultados negativos para todas las concentraciones ensayadas, el nitrato de plomo muestra resultados positivos para todas las concentraciones utilizadas. Esto nos indica un riesgo genotóxico diferencial, en función de la formulación química evaluada.

La genotoxicidad del plomo es motivo de abierta discusión, ya que los resultados obtenidos hasta ahora son muy variables y no permiten llegar a una conclusión definitiva. Así, aunque en la mayoría de los ensayos de genotoxicidad el plomo muestra una respuesta negativa (Winder y Bonin, 1993, Hartwig, 1994), el acetato de plomo puede inducir efectos mutagénicos en células en cultivo, pero sólo a altas concentraciones, consideradas citotóxicas (Roy y Rossman, 1992). Por otro lado el plomo, al igual que otros metales pesados, puede ser clastogénico en estudios *in vivo* e *in vitro*, ya que en células expuestas en cultivo puede inducir aberraciones cromosómicas, micronúcleos e intercambios entre cromátidas hermanas. Además, estas evidencias de alteraciones cromosómicas también se han detectado en personas expuestas laboralmente al plomo (Rajah y Ahuja, 1995; Duydu *et al.*, 2001; Vaglenov *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2002; Palus *et al.*, 2003).

Los resultados obtenidos con el ensayo de cometa en hemocitos, donde el cloruro de plomo resultó negativo y el nitrato de plomo mostró una clara respuesta genotóxica, confirmarían que la genotoxicidad del plomo en *Drosophila* depende del compuesto seleccionado, indicando que es en la forma de nitrato de plomo cuando se presenta como un claro agente genotóxico.

De acuerdo con la revisión de la literatura disponible, se puede observar que la genotoxicidad del plomo al menos parece ser clara en ensayos *in vitro* en células mamíferos, pero en estudios *in vivo* los resultados son variables y no han permitido obtener conclusiones finales sobre su potencialidad genotóxica. En este contexto, nuestros resultados vendrían a confirmar el riesgo genotóxico que puede suponer la exposición *in vivo* a algunas formas químicas de este

metal, lo que confirmaría los resultados positivos observados en los estudios de biomonitorización de poblaciones humanas expuestas laboralmente al plomo.

5.3.2.3. *Compuestos de níquel*

El níquel es un reconocido carcinógeno en humanos y en animales de experimentación; sin embargo, su potencial mutagénico en células y tejidos es considerado bajo y restringido a compuestos de níquel que son insolubles en agua (Hartwig, 1995; Kasprzak *et al.*, 2003). No obstante, numerosos estudios muestran que el níquel puede actuar como un potente comutágeno en combinación con otros agentes que dañan el DNA, incluyendo la radiación UV, la radiación ionizante, agentes alquilantes y benzo[α]pireno (Hartwig, 1995). Lo anterior sugiere que el níquel puede tener un papel importante en la alteración de la reparación del DNA, lo que se ha demostrado en los trabajos previos de interacción con el ensayo *SMART* de alas, donde el níquel muestra una acción sinérgica en combinación con la radiación- γ .

Existen diferentes trabajos que han evaluado los compuestos de níquel empleando el ensayo del cometa, y estos han sido llevados a cabo en diferentes tipos de células humanas, tanto *in vitro* (Pool-Zobel *et al.*, 1994; Zhuang *et al.*, 1996) como *in vivo* (Faccioni *et al.*, 2003; Danadevi *et al.*, 2004). Además, el ensayo del cometa también se ha aplicado para evaluar los efectos genotóxicos *in vivo* de la exposición al níquel en celomocitos de lombrices de tierra (Reinecke y Reinecke, 2004) y en leucocitos de ratones (Devi *et al.*, 2004). En general, estos estudios indican que el ensayo del cometa es una herramienta adecuada, sensible y rápida para detectar los efectos genotóxicos de diferentes compuestos níquel.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que, aunque los tratamientos realizados con NiCl₂ no indujeron incrementos significativos en el daño genético en hemocitos, los resultados encontrados con el NiCl₂ claramente mostraron que este compuesto de níquel es capaz de inducir incrementos significativos del daño genético en todas las concentraciones evaluadas, con una clara relación dosis-respuesta.

Estos resultados mejoran a los observados en el ensayo *SMART* de alas, donde no fue posible encontrar ninguna respuesta positiva y avala la bondad del ensayo propuesto como una herramienta eficaz en la detección de potenciales genotóxicos.

Este estudio de evaluación genotóxica del níquel confirma lo expuesto en el apartado anterior de que el ensayo del cometa es más sensible que el ensayo *SMART* de alas, lo que nos ha permitido observar la genotoxicidad asociada al sulfato de níquel. A parte de la mayor sensibilidad del ensayo del cometa, este estudio nos demuestra una vez más que la genotoxicidad de los metales no depende de éstos, sino de la fórmula química en que se presentan, poniendo de manifiesto que, aunque el cloruro de níquel no es genotóxico, sí que lo es el sulfato de níquel.

6. CONCLUSIONES

Del análisis y discusión de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral, y en respuesta a los objetivos planteados, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Los compuestos de mercurio, plomo y níquel evaluados no han mostrado una actividad mutagénica y recombinogénica detectable con el ensayo *SMART* en alas de *D. melanogaster*.
2. Los estudios de interacción de los compuestos metálicos seleccionados frente al daño genotóxico inducido por la radiación- γ , indican que, aunque los compuestos de mercurio y de plomo no presentan efectos sinérgicos, los compuestos de níquel sí que los presentan, actuando como comutágenos. Esto apoyaría la propuesta de que el níquel interfiere con los mecanismos involucrados en la reparación del daño inducido por la radiación- γ .
3. Los resultados obtenidos de la puesta a punto del ensayo del cometa *in vivo* en hemocitos de *D. melanogaster* con tres agentes mutagénicos de acción conocida (EMS, PDC y radiación- γ) han demostrado que este ensayo es adecuado para la evaluación genotóxica de agentes químicos y físicos.
4. De la evaluación de los compuestos de mercurio, plomo y níquel estudiados, se desprende que tanto el metilmercurio, como el nitrato de plomo y el sulfato de níquel mostraron una actividad genotóxica en el ensayo cometa *in vivo* en hemocitos de *D. melanogaster*, indicando una mayor sensibilidad de este ensayo en comparación con el ensayo *SMART* de alas.
5. Como conclusión final de este trabajo de tesis doctoral, se desprende que la genotoxicidad de los metales pesados evaluados en *D. melanogaster* podría ser considerada débil y dependiente de su formulación química.

7. REFERENCIAS

- Abraham, S. K., y Graf, U. (1996) Protection by coffee against somatic genotoxicity in *Drosophila*: role of bioactivation capacity. *Food Chem Toxicol* 34: 1-14.
- Ahlbom, A., Norell, S., Rodvall, Y., y Nylander, M. (1986) Dentists, dental nurses, and brain tumours. *Br Med J (Clin Res Ed)* 292: 662.
- Akiyama, M., Oshima, H., y Nakamura, M. (2001) Genotoxicity of mercury used in chromosome aberration tests. *Toxicol In Vitro* 15: 463-467.
- Alonso-Moraga, A., y Graf, U. (1989) Genotoxicity testing of antiparasitic nitrofurans in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. *Mutagenesis* 4: 105-110.
- Amorim, M. I., Mergler, D., Bahia, M. O., Dubeau, H., Miranda, D., Lebel, J. *et al.* (2000) Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon. *An Acad Bras Cienc* 72: 497-507.
- Amrani, S., Rizki, M., Creus, A., y Marcos, R. (1999) Genotoxic activity of different chromium compounds in larval cells of *Drosophila melanogaster*, as measured in the wing spot test. *Environ Mol Mutagen* 34: 47-51.
- Auerbach, C., y Robson, J. M. (1947) The production of mutations by chemical substances. *Proc R Soc Edinb Biol* 62: 271-283.
- Benford, D. J., Hanley, B. A., Bottrill, K., Oehlschlager, S., Balls, M., Branca, F., Castengnaro, J. J., Descotes, J., Hemminiki, K., Lindsay, D. y Schitter, B. (2000) Biomarkers as predictive tools in toxicity testing. *Altern Lab Anim* 28: 119-131.
- Betti, C., Davini, T., y Barale, R. (1992) Genotoxic activity of methyl mercury chloride and dimethyl mercury in human lymphocytes. *Mutat Res* 281: 255-260.

- Beyersmann, D., y Hartwig, A. (1994) Genotoxic effects of metal compounds. *Arch Toxicol Suppl* 16: 192-198.
- Beyersmann, D., y Hartwig, A. (2008) Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol* 82: 493-512.
- Bilbao, C., Ferreiro, J. A., Comendador, M. A., y Sierra, L. M. (2002) Influence of mus201 and mus308 mutations of *Drosophila melanogaster* on the genotoxicity of model chemicals in somatic cells *in vivo* measured with the comet assay. *Mutat Res* 503: 11-19.
- Bodenstein, D. (1965) The postembryonic development of *Drosophila*. In *Biology of Drosophila*. M. Demerec (ed). New York, Hafner Publ. Co., pp. 275-367.
- Boffetta, P. (1993) Carcinogenicity of trace elements with reference to evaluations made by the International Agency for Research on Cancer. *Scand J Work Environ Health* 19 Suppl 1: 67-70.
- Bonacker, D., Stoiber, T., Wang, M., Bohm, K. J., Prots, I., Unger, E. *et al.* (2004) Genotoxicity of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule function. *Arch Toxicol* 78: 575-583.
- Brandi, G., Schiavano, G. F., Albano, A., Cattabeni, F., y Cantoni, O. (1990) Growth delay and filamentation of *Escherichia coli* wild-type and Rec A cells in response to hexavalent chromium and other metal compounds. *Mutat Res* 245: 201-204.
- Braun, A., Hoffmann, J. A., y Meister, M. (1998) Analysis of the *Drosophila* host defense in domino mutant larvae, which are devoid of hemocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 14337-14342.
- Brehélin, M. (1982) Comparative study of structure and function of blood cells from two *Drosophila* species. *Cell Tissue Res* 221: 607-615.

- Brown, J. P., Roehm, G. W., y Brown, R. J. (1978) Mutagenicity testing of certified food colors and related azo, xanthene and triphenylmethane dyes with the *Salmonella*/microsome system. *Mutat Res* 56: 249-271.
- Bruce, W. R., y Heddle, J. A. (1979) The mutagenic activity of 61 agents as determined by the micronucleus, *Salmonella*, and sperm abnormality assays. *Can J Genet Cytol* 21: 319-334.
- Burkart, W., y Ogorek, B. (1986) Genotoxic action of cadmium and mercury in cell cultures and modulation of radiation effects. *Toxicological & Environmental Chemistry* 12: 173-183.
- Cebulska-Wasilewska, A., Panek, A., Zabinski, Z., Moszczynski, P., y Au, W. W. (2005) Occupational exposure to mercury vapour on genotoxicity and DNA repair. *Mutat Res* 586: 102-114.
- Cheung, V. V., Depledge, M. H., y Jha, A. N. (2006) An evaluation of the relative sensitivity of two marine bivalve mollusc species using the Comet assay. *Mar Environ Res* 62 Suppl: S301-5.
- Chiu, A., Katz, A. J., Beaubier, J., Chiu, N., y Shi, X. (2004) Genetic and cellular mechanisms in chromium and nickel carcinogenesis considering epidemiologic findings. *Mol Cell Biochem* 255: 181-194.
- Cohen, M. D., Bowser, D. H., y Costa, M. (1996) Carcinogenicity and genotoxicity of lead, berilium, and other metals. In *Toxicology of metals*. Louis W. Chang, L. Magos, Tsuguyoshi Suzuki (ed). CRC Press, pp. 253-286.
- Collins, A. R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26: 249-261.
- Crespo-López, M. E., Herculano, A. M., Corvelo, T. C., y Do Nascimento, J. L. (2005) Mercury and neurotoxicity. *Rev Neurol* 40: 441-447.

- Danadevi, K., Rozati, R., Banu, B. S., y Grover, P. (2004) Genotoxic evaluation of welders occupationally exposed to chromium and nickel using the Comet and micronucleus assays. *Mutagenesis* 19: 35-41.
- Das, K. K., Das, S. N., y Dhundasi, S. A. (2008) Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. *Indian J Med Res* 128: 412-425.
- De Flora, S., Bennicelli, C., y Bagnasco, M. (1994) Genotoxicity of mercury compounds. A review. *Mutat Res* 317: 57-79.
- de la Rosa, M. E., Magnusson, J., Ramel, C., y Nilsson, R. (1994) Modulating influence of inorganic arsenic on the recombinogenic and mutagenic action of ionizing radiation and alkylating agents in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 318: 65-71.
- Deng, C., Lee, H. H., Xian, H., Yao, M., Huang, J., y Ou, B. (1988) Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges of peripheral blood lymphocytes in Chinese electroplating workers: Effect of nickel and chromium. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*. 1: 57-62.
- Devi, K. D., Banu, B. S., Mahboob, M., Jamil, K., y Grover, P. (2001) *In vivo* genotoxic effect of cadmium chloride in mice leukocytes using comet assay. *Teratog Carcinog Mutagen* 21: 325-333.
- Devi, K. D., Rozati, R., Saleha Banu, B., Hanumanth Rao, P., y Grover, P. (2003) DNA damage in workers exposed to lead using comet assay. *Toxicology* 187: 183-193.
- Devi, K. D., Rozati, R., Saleha Banu, B., y Grover, P. (2004) *In vivo* genotoxic effect of nickel chloride in mice leukocytes using comet assay. *Food Chem Toxicol* 42: 751-757.
- Dhawan, A., Bajpayee, M., y Parmar, D. (2009) Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol* 25: 5-32.

- Dhir, H., Agarwal, K., Sharma, A., y Talukder, G. (1991) Modifying role of *Phyllanthus emblica* and ascorbic acid against nickel clastogenicity in mice. *Cancer Lett* 59: 9-18.
- Duydu, Y., Suzen, H. S., Aydin, A., Cander, O., Uysal, H., Isimer, A., y Vural, N. (2001) Correlation between lead exposure indicators and sister chromatid exchange (SCE) frequencies in lymphocytes from inorganic lead exposed workers. *Arch Environ Contam Toxicol* 41: 241-246.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., y Aykin-Burns, N. (2001) Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem* 1: 529-539.
- Faccioni, F., Franceschetti, P., Cerpelloni, M., y Fracasso, M. E. (2003) In vivo study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 124: 687-93.
- Fairbairn, D. W., Olive, P. L., y O'Neill, K. L. (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 339: 37-59.
- Franchi, E., Loprieno, G., Ballardini, M., Petrozzi, L., y Migliore, L. (1994) Cytogenetic monitoring of fishermen with environmental mercury exposure. *Mutat Res* 320: 23-29.
- Frei, H., y Würgler, F. E. (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat Res* 203: 297-308.
- Frei, H., y Würgler, F. E. (1995) Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutat Res* 334: 247-258.
- Gayathri, M. V., y Krishnamurthy, N. B. (1985) Investigations on the mutagenicity of two organomercurial pesticides, Ceresan and Agalol 3, in *Drosophila melanogaster*. *Environ Res* 36: 218-229.

- Gerber, G. B., Leonard, A., y Jacquet, P. (1980) Toxicity, mutagenicity and teratogenicity of lead. *Mutat Res* 76: 115-141.
- Gichner, T., Patkova, Z., Szakova, J., y Demnerova, K. (2006) Toxicity and DNA damage in tobacco and potato plants growing on soil polluted with heavy metals. *Ecotoxicol Environ Saf* 65: 420-426.
- Graf, U., Würgler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B., y Kale, P. G. (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen* 6: 153-188.
- Graf, U., Frei, H., Kagi, A., Katz, A. J., y Würgler, F. E. (1989) Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res* 222: 359-373.
- Graf, U., y Würgler, F. E. (1986) The present status of validation of the wing spot test in *Drosophila*. *Prog Clin Biol Res* 209B: 391-398.
- Graf, U., Heo, O. S., y Ramirez, O. O. (1992) The genotoxicity of chromium(VI) oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is over 90% due to mitotic recombination. *Mutat Res* 266: 197-203.
- Graf, U., Abraham, S. K., Guzman-Rincon, J., y Würgler, F. E. (1998) Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 402: 203-209.
- Green, M. M., Todo, T., Ryo, H., y Fujikawa, K. (1986) Genetic-molecular basis for a simple *Drosophila melanogaster* somatic system that detects environmental mutagens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 6667-6671.
- Guecheva, T., Henriques, J. A., y Erdtmann, B. (2001) Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian *in vivo*, studied with the single-cell gel test (comet assay). *Mutat Res* 497: 19-27.
- Hartmann, M., y Hartwig, A. (1998) Disturbance of DNA damage recognition after UV-irradiation by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells. *Carcinogenesis* 19: 617-621.

- Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P. *et al.* (2003) Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* 18: 45-51.
- Hartmann, A., Schumacher, M., Plappert-Helbig, U., Lowe, P., Suter, W., y Mueller, L. (2004) Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagenesis* 19: 51-59.
- Hartwig, A. (1994) Role of DNA repair inhibition in lead- and cadmium-induced genotoxicity: a review. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 3: 45-50.
- Hartwig, A. (1995) Current aspects in metal genotoxicity. *Biometals* 8: 3-11.
- Hartwig, A. (1998) Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition. *Toxicol Lett* 102-103: 235-239.
- Hartwig, A., y Schwerdtle, T. (2002) Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicol Lett* 127: 47-54.
- Hartwig, A., Schlepegrell, R., y Beyersmann, D. (1990) Indirect mechanism of lead-induced genotoxicity in cultured mammalian cells. *Mutat Res* 241: 75-82.
- Hartwig, A., Kruger, I., y Beyersmann, D. (1994a) Mechanisms in nickel genotoxicity: the significance of interactions with DNA repair. *Toxicol Lett* 72: 353-358.
- Hartwig, A., Mullenders, L. H., Schlepegrell, R., Kasten, U., y Beyersmann, D. (1994 b) Nickel(II) interferes with the incision step in nucleotide excision repair in mammalian cells. *Cancer Res* 54: 4045-4051.
- Holmes, A. L., Wise, S. S., Sandwick, S. J., Lingle, W. L., Negron, V. C., Thompson, W. D., y Wise JP, S. (2006) Chronic exposure to lead chromate causes centrosome abnormalities and aneuploidy in human lung cells. *Cancer Res* 66: 4041-4048.

- Holz, A., Bossinger, B., Strasser, T., Janning, W., y Klapper, R. (2003) The two origins of hemocytes in *Drosophila*. *Development* 130: 4955-4962.
- Irving, P., Ubeda, J. M., Doucet, D., Troxler, L., Lagueux, M., Zachary, D. *et al.* (2005) New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cell Microbiol* 7: 335-350.
- Iwitzki, F., Schlepegrell, R., Eichhorn, U., Kaina, B., Beyersmann, D., y Hartwig, A. (1998) Nickel(II) inhibits the repair of O6-methylguanine in mammalian cells. *Arch Toxicol* 72: 681-689.
- Johnson, F. M. (1998) The genetic effects of environmental lead. *Mutat Res* 410: 123-140.
- Kanematsu, N., Hara, M., y Kada, T. (1980) Rec assay and mutagenicity studies on metal compounds. *Mutat Res* 77: 109-116.
- Kasprzak, K. S. (1995) Possible role of oxidative damage in metal-induced carcinogenesis. *Cancer Invest* 13: 411-430.
- Kasprzak, K. S., Sunderman, F. W., Jr, y Salnikow, K. (2003) Nickel carcinogenesis. *Mutat Res* 533: 67-97.
- Kastenbaum, M. A., y Bowman, K. O. (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat Res* 9: 527-549.
- Katsifis, S. P., Kinney, P. L., Hosselet, S., Burns, F. J., y Christie, N. T. (1996) Interaction of nickel with mutagens in the induction of sister chromatid exchanges in human lymphocytes. *Mutat Res* 359: 7-15.
- Kaya, B., Creus, A., Velázquez, A., Yanikoglu, A., y Marcos, R. (2002) Genotoxicity is modulated by ascorbic acid. Studies using the wing spot test in *Drosophila*. *Mutat Res* 520: 93-101.
- Kiilunen, M., Tela, U. J., Rantanen, T., Norppa, H., Tossavainen, A., Koponen, M., y Paakkulainen, H. (1997) Exposure to soluble nickel in electrolytic nickel refining. *Ann Occup Hyg* 41: 167-188.

- Klein, C., y Costa, M. (2007) Nickel. In *Handbook of the toxicology of metals*. G. F. Nordberg, B. A. Fowler, M. Nordberg & L. T. Friberg (eds). Third Edition edn. Elsevier Inc., pp. 743-758.
- Kossatz, E. (2003) Análisis de la implicación del gen *RAD54* en la genotoxicidad de la bleomicina, del dicromato potásico y de la radiación gamma en *Drosophila melanogaster*. Pp. 109.
- Kumaravel, T. S., y Jha, A. N. (2006) Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutat Res* 605: 7-16.
- Lee-Chen, S. F., Wang, M. C., Yu, C. T., Wu, D. R., y Jan, K. Y. (1993) Nickel chloride inhibits the DNA repair of UV-treated but not methyl methanesulfonate-treated Chinese hamster ovary cells. *Biol Trace Elem Res* 37: 39-50.
- Lehmann, M., Graf, U., Reguly, M. L., y Rodrigues De Andrade, H. H. (2000) Interference of tannic acid on the genotoxicity of mitomycin C, methylmethanesulfonate, and nitrogen mustard in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ Mol Mutagen* 36: 195-200.
- Lovell, D. P., y Omori, T. (2008) Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis* 23: 171-182.
- Lu, H., Shi, X., Costa, M., y Huang, C. (2005) Carcinogenic effect of nickel compounds. *Mol Cell Biochem* 279: 45-67.
- Magnusson, J., y Ramel, C. (1986) Genetic variation in the susceptibility to mercury and other metal compounds in *Drosophila melanogaster*. *Teratog Carcinog Mutagen* 6: 289-305.
- Margolin, B. H., Collings, B. J., y Mason, J. M. (1983) Statistical analysis and sample-size determinations for mutagenicity experiments with binomial responses. *Environ Mutagen* 5: 705-716.

- Mathew, C., y Al-Doori, Z. (1976) The mutagenic effect of the mercury fungicide Ceresan M in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 40: 31-36.
- Meister, M. (2004) Blood cells of *Drosophila*: cell lineages and role in host defence. *Curr Opin Immunol* 16: 10-15.
- Meister, M., y Lagueux, M. (2003) *Drosophila* blood cells. *Cell Microbiol* 5: 573-580.
- Mersch, J., Beauvais, M. N., y Nagel, P. (1996) Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. *Mutat Res* 371: 47-55.
- Migliore, L., Cocchi, L., Nesti, C., y Sabbioni, E. (1999) Micronuclei assay and FISH analysis in human lymphocytes treated with six metal salts. *Environ Mol Mutagen* 34: 279-284.
- Mukhopadhyay, I., Chowdhuri, D. K., Bajpayee, M., y Dhawan, A. (2004) Evaluation of *in vivo* genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 19: 85-90.
- Müller, H. J. (1927) Artificial Transmutation of the Gene. *Science* 66: 84-87.
- National Toxicology Program. (1993) Toxicology and Carcinogenesis Studies of Mercuric Chloride (CAS No. 7487-94-7) in F344 Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* 408: 1-260.
- Nriagu, J. O., y Pacyna, J. M. (1988) Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333: 134-139.
- Ogawa, H. I., Shibahara, T., Iwata, H., Okada, T., Tsuruta, S., Kakimoto, K. *et al.* (1994) Genotoxic activities *in vivo* of cobaltous chloride and other metal chlorides as assayed in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res* 320: 133-140.
- Olive, P. L., y Banáth, J. P. (2006) The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* 1: 23-29.

- Osgood, C., Zimmering, S., y Mason, J. M. (1991) Aneuploidy in *Drosophila*, II. Further validation of the FIX and ZESTE genetic test systems employing female *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 259: 147-163.
- Östling, O., y Johanson, K. J. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123: 291-298.
- Palus, J., Rydzynski, K., Dziubaltowska, E., Wyszynska, K., Natarajan, A. T., y Nilsson, R. (2003) Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutat Res* 540: 19-28.
- Pasha Shaik, A., Sankar, S., Reddy, S. C., Das, P. G., y Jamil, K. (2006) Lead-induced genotoxicity in lymphocytes from peripheral blood samples of humans: *in vitro* studies. *Drug Chem Toxicol* 29: 111-124.
- Poma, K., Kirsch-Volders, M., Susanne, C., y Degraeve, N. (1984) Lack of synergistic effect between arsenic, mercury and ethyl methane sulfonate on the frequency of chromosomal aberrations in mice. *J Appl Toxicol* 4: 293-296.
- Pool-Zobel, B. L., Lotzmann, N., Knoll, M., Kuchenmeister, F., Lambertz, R., Leucht, U. *et al.* (1994) Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal mucosa cells isolated from biopsy samples. *Environ Mol Mutagen* 24: 23-45.
- Rainbow. (1993) The significance of trace metal concentrations in marine invertebrates. Proceedings of a session at the first Society of Environmental Toxicology and Chemistry-Europe Conference held in Sheffield, England, 7-10 april 1991. In *Ecotoxicology of metals in invertebrates*. R. Dallinger, y P. S. Rainbow (eds). Boca Raton, Florida, Lewis Publishers, pp. 3-23.
- Rajah, T., y Ahuja, Y. R. (1995) *In vivo* genotoxic effects of smoking and occupational lead exposure in printing press workers. *Toxicol Lett* 76: 71-75.

- Ramel, C., y Magnusson, J. (1969) Genetic effects of organic mercury compounds. II. Chromosome segregation in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas* 61: 231-254.
- Ramel, C., y Magnusson, J. (1979) Chemical induction of nondisjunction in *Drosophila*. *Environ Health Perspect* 31: 59-66.
- Rank, J., y Jensen, K. (2003) Comet assay on gill cells and hemocytes from the blue mussel *Mytilus edulis*. *Ecotoxicol Environ Saf* 54: 323-329.
- Rao, M. V., Chinoy, N. J., Suthar, M. B., y Rajvanshi, M. I. (2001) Role of ascorbic acid on mercuric chloride-induced genotoxicity in human blood cultures. *Toxicol In Vitro* 15: 649-654.
- Rasmuson, A. (1985) Mutagenic effects of some water-soluble metal compounds in a somatic eye-color test system in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 157: 157-162.
- Rasmuson, B., Svahlin, H., Rasmuson, A., Montell, I., y Olofsson, H. (1978) The use of a mutationally unstable X-chromosome in *Drosophila melanogaster* for mutagenicity testing. *Mutat Res* 54: 33-38.
- Reinecke, S. A., y Reinecke, A. J. (2004) The comet assay as biomarker of heavy metal genotoxicity in earthworms. *Arch Environ Contam Toxicol* 46: 208-215.
- Restrepo, H. G., Sicard, D., y Torres, M. M. (2000) DNA damage and repair in cells of lead exposed people. *Am J Ind Med* 38: 330-334.
- Rigonato, J., Mantovani, M. S., y Jordão, B. Q. (2005) Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. *Genetics and Molecular Biology* 28: 464-468.
- Rivedal, E., y Sanner, T. (1980) Synergistic effect on morphological transformation of hamster embryo cells by nickel sulphate and benz[a]pyrene. *Cancer Lett* 8: 203-208.

- Rizki, T. M., y Rizki, R. M. (1980) Properties of the larval hemocytes of *Drosophila melanogaster*. *Experientia* 36: 1223-1226.
- Rizki, M., Amrani, S., Creus, A., Xamena, N., y Marcos, R. (2001) Antigenotoxic properties of selenium: studies in the wing spot test in *Drosophila*. *Environ Mol Mutagen* 37: 70-75.
- Rizki, M., Kossatz, E., Creus, A., y Marcos, R. (2004) Genotoxicity modulation by cadmium treatment: studies in the *Drosophila* wing spot test. *Environ Mol Mutagen* 43: 196-203.
- Rizki, M., Kossatz, E., Xamena, N., Creus, A., y Marcos, R. (2002) Influence of sodium arsenite on the genotoxicity of potassium dichromate and ethyl methanesulfonate: studies with the wing spot test in *Drosophila*. *Environ Mol Mutagen* 39: 49-54.
- Rizki, M., Kossatz, E., Velazquez, A., Creus, A., Farina, M., Fortaner, S. *et al.* (2006) Metabolism of arsenic in *Drosophila melanogaster* and the genotoxicity of dimethylarsinic acid in the *Drosophila* wing spot test. *Environ Mol Mutagen* 47: 162-168.
- Rodriguez-Arnaiz, R., y Ramos, P. (1986) Mutagenicity of nickel sulphate in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 170: 115-117.
- Rossmann, T. G. (1981) Effect of metals on mutagenesis and DNA repair. *Environ Health Perspect* 40: 189-195.
- Rossmann, T. G., y Molina, M. (1986) The genetic toxicology of metal compounds: II. Enhancement of ultraviolet light-induced mutagenesis in *Escherichia coli* WP2. *Environ Mutagen* 8: 263-271.
- Roy, N. K., y Rossmann, T. G. (1992) Mutagenesis and comutagenesis by lead compounds. *Mutat Res* 298: 97-103.
- Salnikow, K., y Costa, M. (2000) Epigenetic mechanisms of nickel carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 19: 307-318.

- Salnikow, K., y Zhitkovich, A. (2008) Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium. *Chem Res Toxicol* 21: 28-44.
- Schlesinger, R. B., Zelikoff, J. T., Chen, L. C., y Kinney, P. L. (1992) Assessment of toxicologic interactions resulting from acute inhalation exposure to sulfuric acid and ozone mixtures. *Toxicol Appl Pharmacol* 115: 183-190.
- Selby, P. B., y Olson, W. H. (1981) Methods and criteria for deciding whether specific-locus mutation-rate data in mice indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Nutr Rev* 83: 403-418.
- Shirasu, Y., Moriya, M., Kato, K., Furuhashi, A., y Kada, T. (1976) Mutagenicity screening of pesticides in the microbial system. *Mutat Res* 40: 19-30.
- Siddique, H. R., Chowdhuri, D. K., Saxena, D. K., y Dhawan, A. (2005a) Validation of *Drosophila melanogaster* as an *in vivo* model for genotoxicity assessment using modified alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 20: 285-290.
- Siddique, H. R., Gupta, S. C., Dhawan, A., Murthy, R. C., Saxena, D. K., y Chowdhuri, D. K. (2005b) Genotoxicity of industrial solid waste leachates in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mol Mutagen* 46: 189-197.
- Siddique, H. R., Sharma, A., Gupta, S. C., Murthy, R. C., Dhawan, A., Saxena, D. K., y Chowdhuri, D. K. (2008) DNA damage induced by industrial solid waste leachates in *Drosophila melanogaster*: a mechanistic approach. *Environ Mol Mutagen* 49: 206-216.
- Silva-Pereira, L. C., Cardoso, P. C., Leite, D. S., Bahia, M. O., Bastos, W. R., Smith, M. A., y Burbano, R. R. (2005) Cytotoxicity and genotoxicity of low doses of mercury chloride and methylmercury chloride on human lymphocytes *in vitro*. *Braz J Med Biol Res* 38: 901-907.

- Singh, J., y Snow, E. T. (1998) Chromium(III) decreases the fidelity of human DNA polymerase beta. *Biochemistry* 37: 9371-9378.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., y Schneider, E. L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191.
- Skerfving, S., y Bergdahl, I. A. (2007) Lead. In Handbook of the toxicology of metals. G. Nordberg, B. Fowler, M. Nordberg y L. Friberg (eds). Third Edition edn. Elsevier Inc., pp. 599-643.
- Slemr, F., y Langer, E. (1992) Increase in global atmospheric concentrations of mercury inferred from measurements over the Atlantic Ocean. *Nature* 355: 434-437.
- Sobels, F. H., y Vogel, E. (1976a) The capacity of *Drosophila* for detecting relevant genetic damage. *Mutat Res* 41: 95-106.
- Sobels, F. H., y Vogel, E. (1976b) Assaying potential carcinogens with *Drosophila*. *Environ Health Perspect* 15: 141-146.
- Steenland, K., y Boffetta, P. (2000) Lead and cancer in humans: where are we now? *Am J Ind Med* 38: 295-299.
- Stettler, P. M., y Sengstag, C. (2001) Liver carcinogen aflatoxin B1 as an inducer of mitotic recombination in a human cell line. *Mol Carcinog* 31: 125-138.
- Stohs, S. J., y Bagchi, D. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18: 321-336.
- Stoiber, T., Bonacker, D., Bohm, K. J., Bolt, H. M., Thier, R., Degen, G. H., y Unger, E. (2004) Disturbed microtubule function and induction of micronuclei by chelate complexes of mercury(II). *Mutat Res* 563: 97-106.
- Strickberger, M. W. (1962) Experiment in genetics with *Drosophila*. New York, John Wiley and Sons, Inc., 1230 pp.

- Suárez, S., Cabré, O., Velázquez, A., Creus, A., Marcos, R., y Xamena, N. (1996) Molecular study of the germinal reversions induced at the white-ivory locus in *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis* 11: 559-563.
- Sugiyama, M. (1994) Role of cellular antioxidants in metal-induced damage. *Cell Biol Toxicol* 10: 1-22.
- Sunderman, F. W., Jr, Hopfer, S. M., Nichols, W. W., Selden, J. R., Allen, H. L., Anderson, C. A. *et al.* (1990) Chromosomal abnormalities and gene amplification in renal cancers induced in rats by nickel subsulfide. *Ann Clin Lab Sci* 20: 60-72.
- Takahashi, S., Takeda, E., Kubota, Y., y Okayasu, R. (2000) Inhibition of repair of radiation-induced DNA double-strand breaks by nickel and arsenite. *Radiat Res* 154: 686-691.
- Tchounwou, P. B., Ayensu, W. K., Ninashvili, N., y Sutton, D. (2003) Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health. *Environ Toxicol* 18: 149-175.
- Thier, R., Bonacker, D., Stoiber, T., Bohm, K. J., Wang, M., Unger, E. *et al.* (2003) Interaction of metal salts with cytoskeletal motor protein systems. *Toxicol Lett* 140-141: 75-81.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H. *et al.* (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35: 206-221.
- Vaglenov, A., Creus, A., Laltchev, S., Petkova, V., Pavlova, S., y Marcos, R. (2001) Occupational exposure to lead and induction of genetic damage. *Environ Health Perspect* 109: 295-298.
- Vaisman, A., Warren, M. W., y Chaney, S. G. (2001) The effect of DNA structure on the catalytic efficiency and fidelity of human DNA polymerase beta on templates with platinum-DNA adducts. *J Biol Chem* 276: 18999-19005.

- Valko, M., Morris, H., y Cronin, M. T. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 12: 1161-1208.
- Villela, I. V., de Oliveira, I. M., da Silva, J., y Henriques, J. A. (2006) DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutat Res* 605: 78-86.
- Villela, I. V., de Oliveira, I. M., Silveira, J. C., Dias, J. F., Henriques, J. A., y da Silva, J. (2007) Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. *Mutat Res* 628: 76-86.
- Vogel, E. W., y Sobels, F. H. (1976) The function of *Drosophila* in genetic toxicology testing. In *Chemical mutagens. principles and methods for their detection*. A. Hollaender (ed). New York, Plenum Press, pp. 93-142.
- Vogel, E. W., y Zijlstra, J. A. (1987a) Somatic cell mutagenicity in *Drosophila melanogaster* in comparison with genetic damage in early germ-cell stages. *Mutat Res* 180: 189-200.
- Vogel, E. W., y Zijlstra, J. A. (1987b) Mechanistic and methodological aspects of chemically-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 182: 243-264.
- Vogel, E. W., Graf, U., Frei, H. J., y Nivard, M. M. (1999) The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. *IARC Sci Publ* (146): 427-470.
- Waksvik, H., Boysen, M., y Hógetveit, A. C. (1984) Increased incidence of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of retired nickel workers. *Carcinogenesis* 5: 1525-1527.
- Wang, Q., Ponomareva, O. N., Lasarev, M., y Turker, M. S. (2006) High frequency induction of mitotic recombination by ionizing radiation in Mlh1 null mouse cells. *Mutat Res* 594: 189-198.

- Wedrychowski, A., Schmidt, W. N., y Hnilica, L. S. (1986) The *in vivo* cross-linking of proteins and DNA by heavy metals. *J Biol Chem* 261: 3370-3376.
- Weigmann, K., Klapper, R., Strasser, T., Rickert, C., Technau, G., Jackle, H. *et al.* (2003) FlyMove-a new way to look at development of *Drosophila*. *Trends Genet* 19: 310-311.
- Wijnhoven, S. W., Sonneveld, E., Kool, H. J., van Teijlingen, C. M., y Vrieling, H. (2003) Chemical carcinogens induce varying patterns of LOH in mouse T-lymphocytes. *Carcinogenesis* 24: 139-144.
- Winder, C., y Bonin, T. (1993) The genotoxicity of lead. *Mutat Res* 285: 117-124.
- Wozniak, K., y Blasiak, J. (2003) *In vitro* genotoxicity of lead acetate: induction of single and double DNA strand breaks and DNA-protein cross-links. *Mutat Res* 535: 127-139.
- Wozniak, K., y Blasiak, J. (2004) Nickel impairs the repair of UV- and MNNG-damaged DNA. *Cell Mol Biol Lett* 9: 83-94.
- Wu, F., Chang, P., Wu, C., y Kuo, H. (2002) Correlations of Blood Lead with DNA-Protein Cross-Links and Sister Chromatid Exchanges in Lead Workers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 287-290.
- Xamena, N., Velázquez, A., Batiste-Alentorn, M., Creus, A., y Marcos, R. (1988) Genotoxicity studies with four organophosphorus insecticides using the unstable white-zeste system of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 204: 251-256.
- Yamada, H., Miyahara, T., Kozuka, H., Matsushashi, T., y Sasaki, Y. F. (1993) Potentiating effects of organomercuries on clastogen-induced chromosome aberrations in cultured Chinese hamster cells. *Mutat Res* 290: 281-291.
- Yesilada, E. (2001) Genotoxicity testing of some metals in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. *Bull Environ Contam Toxicol* 66: 464-469.

Zhuang, Z. X., Shen, Y., Shen, H. M., Ng, V., y Ong, C. N. (1996) DNA strand breaks and poly (ADP-ribose) polymerase activation induced by crystalline nickel subsulfide in MRC-5 lung fibroblast cells. *Hum Exp Toxicol* 15: 891-897.

Zijlstra, J. A., Vogel, E., y Breimer, D. D. (1979) Occurrence and inducibility of cytochrome P-450 and mixed oxidase activities in microsomes from *Drosophila melanogaster* larvae. *Mutat Res* 64: 151-152.

Zordan, M., Costa, R., y Levis, A. G. (1991) Perspectives in the use of *Drosophila melanogaster* in genotoxicity testing. *Prog Clin Biol Res* 372: 423-431.

8. ANEXOS

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Chemosphere 70 (2008) 1910–1914

CHEMOSPHERE

www.elsevier.com/locate/chemosphereGenotoxic evaluation of two mercury compounds in the *Drosophila* wing spot testErico R. Carmona^a, Elk Kossatz^a, Amadeu Creus^a, Ricardo Marcos^{a,b,*}^a Grup de Mutàgenesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus de Bellaterra, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain
^b CIBER Epidemiologia y Salud Pública, ISCIII, SpainReceived 18 April 2007; received in revised form 13 July 2007; accepted 17 July 2007
Available online 12 September 2007

Abstract

Few studies on the genotoxicity of mercury compounds have been carried out in *Drosophila melanogaster*, most of them focused in the effects on germinal cells, whereas studies in somatic cells are scarce. In the present study we have analyzed for the first time the genotoxic activity of mercury (II) chloride (MC) and methyl mercury (II) chloride (MMC) in the *in vivo* wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila*, also known as the wing spot assay. This test is based on the principle that loss of heterozygosity and the corresponding expression of the suitable recessive markers, multiple wing hairs (*mevh*) and flare-3 (*flr-3*), can lead to the formation of mutant clones in larval cells, which are then expressed as spots on the wings of adult flies. The mercury compounds were supplied to third instar larvae (72 ± 2 h old) at concentrations ranging from 1 to 50 µM for mercury chloride (MC) and from 0.5 to 5 µM for methyl mercury chloride (MMC). Both mercury compounds showed high toxicity; however, MMC was more toxic than MC. The results showed that none of the three categories of mutant spots recorded (small, large, and twin) increased significantly by the treatments, independently of the dose supplied, indicating that the mercury compounds tested exhibit a lack of genotoxic activity in the wing spot assay of *D. melanogaster*. These results contribute to increase the genotoxicity database on the *in vivo* evaluation of mercury compounds in *Drosophila*.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Genotoxicity; Mercury chloride; Methyl mercury chloride; *Drosophila melanogaster*; Wing spot test

1. Introduction

Mercury is a toxic heavy metal with deleterious effects on the environment and on live organisms (Clarkson, 1993; Wolfe et al., 1998; Boening, 2000). It is a well documented neurotoxin that can cause permanent damage to the brain and central nervous system (Crespo-López et al., 2005). In the environment mercury can be found in different chemical forms, but the most frequent and well-

known, given their adverse effects, are the mercuric (Hg^{2+}) and the methyl mercury (CH_3Hg^+) cations (Doadrio, 2004). The anthropogenic activities, such as the combustion of fossil fuel, incineration of wastes, mining, industrial and pesticide uses are the main sources of mercury emission into the environment (Nriagu and Pacyna, 1988; Slemr and Langer, 1992; Porcella et al., 1997; Pacyna and Pacyna, 2002). At present, mercury is considered as one of the most important and hazardous contaminant metals in the environment (Patrick, 2002).

In sediments, inorganic mercury may be converted into methyl mercury forms by methanogenic bacteria. This biotransformation constitutes a serious environmental risk given that methyl mercury is the most toxic mercury compound and accumulates in the aquatic food chain, eventually reaching human diet (Tchounwou et al., 2003).

* Corresponding author. Address: Grup de Mutàgenesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus de Bellaterra, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain. Tel.: +34 93 58 12052; fax: +34 93 58 12387.
E-mail address: ricard.marcos@uab.es (R. Marcos).

Genotoxicity of mercury has been mainly attributed to its capacity for interaction with sulfhydryl groups of cytoskeleton proteins, affecting the function of mitotic spindle and causing the loss of chromosomes during cellular division (Thier et al., 2003; Stoiber et al., 2004; Bonacker et al., 2005).

There are only few studies on the genetic toxicity of mercury compounds, and the overall evaluation of results is quite complex and difficult to interpret (De Flora et al., 1994). From the available data it seems that generally mercury compounds do not induce mutagenic effects on bacterial assays (Kanematsu et al., 1980; National Toxicology Program Study Report, 1993), although a mutagenic effect of mercury to *Salmonella typhimurium* TA 1537 was reported by Wong (1988). However, mercury compounds can lead to breaks, chromosome aberrations, and aneugenic effects on eukaryotic cells (Akiyama et al., 2001; Thier et al., 2003; Silva-Pereira et al., 2005). However, at least in microbial assays, detection of mutagenic effects of heavy metals depends on the type of genotoxicity test used. Furthermore, the lack of test sensitivity may be due to a possible quelation of metallic ions by ingredients of the culture medium (Codina et al., 1995).

Even though there are several data on mercury carcinogenic activity in rodents (Boffetta et al., 1993; National Toxicology Program Study Report, 1993) and in humans (Ahlbom et al., 1986; Boffetta et al., 1998), evidences are not strong enough to conclude that mercury compounds are carcinogens (Boffetta et al., 1993).

Genotoxic studies on mercury genotoxicity in *Drosophila melanogaster* at somatic level are scarce (Rasmuson, 1985). However, a relevant contribution has been provided by *in vivo* assays with germinal cells, evaluating different genetic endpoints. Nevertheless, a general evaluation on the genotoxic effects of mercury in *Drosophila* is difficult to establish, given the controversial results reported by different authors (see the review of De Flora et al., 1994). The overall data suggest that the genotoxicity of mercury in *Drosophila* could depend mainly on the compound tested, the cell type used, and on the assay system employed.

In order to increase our knowledge on the genotoxic effects of mercury in *Drosophila*, in the present study we have used the wing spot test to evaluate for the first time the genotoxicity of two mercury compounds: mercury (II) chloride (MC) and methyl mercury (II) chloride (MMC). This short *in vivo* test system is based on the loss of heterozygosity in normal genes and the corresponding expression of recessive markers, namely multiple wing hairs and flare-3, in the wing blade of adult flies. This assay can detect mitotic recombination and a diverse set of mutational events such as point mutations, deletions, and certain types of chromosome aberrations (Graf et al., 1984). Moreover, previous studies from our laboratory indicate that the wing spot test of *Drosophila* is an excellent and powerful tool to evaluate both the genotoxicity and anti-genotoxicity properties of different heavy metals (Amrani et al., 1999; Rizki et al., 2001, 2002, 2004, 2006).

2. Materials and methods

2.1. Strains

Two *D. melanogaster* strains were used: the *multiple wing hairs* strain having the genetic constitution $y; mwh\ j$; and the *flare-3* strain with the genetic constitution $flr^3/In(3LR) TM3, Bd^f$. The marker *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0.3) is a completely recessive homozygous viable mutation, which is kept in homozygous condition. It produces multiple trichomes per cell instead of the normally unique trichome. The marker *flare-3* (flr^3 , 3-38.8) is a recessive mutation that affects the shape of wing hairs, producing malformed wing hairs that have the shape of a flare. Given their zygotic lethality, flare alleles have to be kept in stocks over balancer chromosomes carrying multiple inversions and a dominant marker that is homozygous lethal (*TM3, Bd^f*). More detailed information on the other genetic markers and descriptions of the phenotypes of the strains used in this work are extensively given by Lindsley and Zimm (1992). Both strains were initially provided by Prof. F.E. Würzler (Institute for Toxicology, University of Zürich, Switzerland).

2.2. Chemicals

Mercury (II) chloride (MC, >99.5% purity; CAS No. 7487-94-7), methyl mercury (II) chloride (MMC, 98% purity; CAS No. 115-09-3) and ethyl methanesulfonate (EMS, 100% purity; CAS No. 62-50-0) were obtained from Sigma-Aldrich (Spain). MC and EMS compounds were dissolved in distilled water, while MMC was dissolved in 3% ethanol and 1% Tween-80 (Panreac SA, Spain). Distilled water and ethanol/Tween-80 were used as negative controls. EMS was used as positive control.

2.3. Treatments

Virgin females of the $flr^3/In(3LR) TM3, Bd^f$ strain were mated to *mwh* males, as previously described (Rizki et al., 2006). Eggs from this cross were collected during 8-h periods in culture bottles containing the standard medium. The resulting 3-day-old larvae were then placed in plastic vials containing 4.5 g of *Drosophila* instant medium (Carolina Biological Supply, Burlington, NC) prepared with the different concentrations of MC (1, 5 and 50 μ M), and MMC (0.5, 1 and 5 μ M), which were non-toxic. The larvae were fed on this medium until pupation. Taking into account that the *Drosophila* medium used is not very rich in salts, a possible quelation of metallic ions by ingredients of the medium could be neglected. The surviving adults were collected from the treatment vials and were stored in 70% ethanol. Afterwards, their wings were removed and mounted in Faure's solution on slides. The wings were scored at 400 times magnification for the presence of spots. In each series we scored 40 wings (20 individuals). Scoring of flies and data evaluation were conducted following the

standard procedures for the wing spot assay, as used in recent investigations (Dihl et al., 2007).

2.4. Statistical analysis

The conditional binomial test of Kastenbaun and Bowman (1970) was used to assess differences between the frequencies of each type of spot in treated and concurrent negative control flies. The multiple decision procedure described by Frei and Würzler (1988) was used to judge the overall response of an agent as positive, weakly positive, negative, or inconclusive. As recommended, we consider the treatment as positive if the frequency of mutant clones in the treated series is at least m (multiplication factor) times greater than in the control series. Since small single spots and total spots have a comparatively high spontaneous frequency, m is fixed at a value of 2 (testing for a doubling of the spontaneous frequency). For the large single spots and the twin spots, which have a low spontaneous frequency, $m = 5$ is used. The frequency of clone formation was calculated, without size correction, by dividing the number of *mwh* clones per wing by 24400, which is the approximate number of cells examined per wing (Alonso-Moraga and Graf, 1989).

3. Results and discussion

Besides measuring mutational events (point and chromosome mutations), the wing spot assay also distinguishes mitotic recombination in proliferative somatic cells, being the quantitation of the recombinogenic activity of a compound of primary importance for genotoxicity screening (Graf and Würzler, 1996). On the other hand, this *in vivo* short-term test using a eukaryotic organism has proved to be an excellent candidate to be used as biological monitor for genotoxic environmental contaminants (Guzmán-Rincón and Graf, 1995).

Previous viability experiments conducted in our laboratory revealed that mercury compounds are extremely toxic

to *Drosophila* (Carmona, 2006). Thus, before genotoxicity experiments it was necessary to carry out several toxicity tests to select the effective doses for MC and MMC. Initially, the doses administered ranged from 0.5 to 2000 μM and, within this concentration range, an elevated toxicity was observed, reflected in a reduced percentage of larvae developing into adults and a significant delay in the time required for the larvae to develop into the adult stage (data not shown). This suggested that both mercury compounds could disturb cell division mechanisms or other cellular functions, as we previously found with cadmium (Rizki et al., 2004). Overall, in all the preliminary toxicity experiments, MMC was more toxic than MC. Hence, while for MC a suitable larval viability (>50%) was reached at 50 μM , MMC could not be evaluated at concentrations higher than 5 μM . The criterion to choose that viability is based on two reasons: first, the reduction in the percentage of developing treated larvae is a clear indication that the compounds affected the larvae and, in addition, the number of emerging adults is high enough to perform the genotoxicity experiments.

The results obtained from the two experiments testing the genotoxicity of MC and MMC in the wing spot assay are summarized in Tables 1 and 2, respectively. These compounds were supplied to 72-h-old larvae (third instar) at concentrations ranging from 1 to 50 μM for MC, and from 0.5 to 5 μM for MMC. In both cases the treatment was given to the larvae until they completed development. The results obtained indicate that neither MC nor MMC, independently of the concentrations applied, induced significant increases in the frequency of any of the three categories of mutant spots recorded (i.e. small single, large single and twin spots), in relation to the negative control. In this study, the pooled negative control frequencies found (0.50 and 0.55) were in agreement with the normal background range observed in our laboratory, and are not significantly different from previous results reported by other authors (Frei and Würzler, 1995; Torres et al., 1998; Rizki et al., 2006). On the other hand, the positive control carried

Table 1
Wing spot test data obtained after treatment with mercury chloride (MC)

Compound, concentration (μM)	Small single spots (1–2 cells) ($m = 2$)			Large single spots (>2 cells) ($m = 5$)			Twins spots ($m = 5$)			Total spots ($m = 2$)			Frequency of clone formation per 10^5 cells
	N°	Fr	D	N°	Fr	D	N°	Fr	D	N°	Fr	D	
MC													
0	17	0.43		2	0.05		1	0.03		20	0.50		2.05
1	23	0.58	i	3	0.08	i	0	0.00	i	26	0.65	i	2.66
5	23	0.58	i	1	0.03	i	2	0.05	i	26	0.65	i	2.66
50	15	0.38	–	2	0.05	i	1	0.03	i	18	0.45	–	1.84
EMS													
500	117	2.92	+	43	1.07	+	9	0.22	+	169	4.22	+	17.31

Results from mwh/fir^3 wings^a. Ethyl methanesulfonate (EMS) was used as positive control.

N°, number of spots; Fr, frequency; D, statistical diagnosis according to Frei and Würzler (1988): +, positive; –, negative; i, inconclusive; m , multiplication factor; probability levels, $\alpha = \beta = 0.05$.

^a Forty wings were analyzed for each concentration (20 individuals).

Table 2
Wing spot test data obtained after treatment with methyl mercury chloride (MMC)

Compound, concentration (µM)	Small single spots (1–2 cells) (m = 2)			Large single spots (>2 cells) (m = 5)			Twins spots (m = 5)			Total spots (m = 2)			Frequency of clone formation per 10 ⁵ cells
	N°	Fr	D	N°	Fr	D	N°	Fr	D	N°	Fr	D	
MMC													
0	20	0.50	–	1	0.03	–	1	0.03	–	22	0.55	–	2.25
0.5	17	0.43	–	2	0.05	i	0	0.00	–	19	0.48	–	1.95
1	12	0.30	–	1	0.03	i	4	0.10	i	17	0.43	–	1.74
5	15	0.38	–	5	0.13	i	0	0.00	–	20	0.50	–	2.05
EMS													
500	117	2.92	+	43	1.07	+	9	0.22	+	169	4.22	+	17.31

Results from *mwh/ff³* wings^a. Ethyl methanesulfonate (EMS) was used as positive control.

N°, number of spots; Fr, frequency; D, statistical diagnosis according to Frei and Würzler (1988): +, positive; –, negative; i, inconclusive; m, multiplication factor; probability levels, $\alpha = \beta = 0.05$.

^a Forty wings were analyzed for each concentration (20 individuals).

out with EMS showed a clear positive response; this fact supports the validity of the negative results observed for the mercury compounds tested in this study.

Our results report for the first time data on the evaluation of mercury genotoxicity with the *in vivo* wing spot test of *Drosophila*. Treatments with different concentrations of organic and inorganic mercury did not induce a significant increase on the frequency of any of the three categories of spots analyzed. These negative results could be explained in part by the low doses applied, since the *Drosophila* strains used were highly sensitive to mercury.

An overall revision of the available literature on the genotoxicity of mercury in *Drosophila* shows that our results are not so different from those previously found by other authors. For instance, in the UZ somatic assay, methyl mercury was non-genotoxic by itself. However, the somatic mutation frequency increased with methyl methanesulfonate (MMS) co-treatments, suggesting that mercury can interfere with the repair mechanisms (Rasmussen, 1985). In germinal cells, organic mercury compounds induced X-linked lethal recessive mutations in *Drosophila* (Gayathri and Krishnamurthy, 1985; Magnusson and Ramel, 1986) whereas, in the same assay, inorganic mercury was non-genotoxic (National Toxicology Program Study Report, 1993). Assays detecting dominant lethals induction in *Drosophila* have also shown negative results with organic compounds (Gayathri and Krishnamurthy, 1985). Nevertheless, treatments with inorganic mercury in larvae and adult flies show positive results in aneuploidy assays (Magnusson and Ramel, 1986; Osgood et al., 1991). Hence, it seems that mercury genotoxicity in *Drosophila* could highly depend on the compound, cell type and test system employed.

Even though mercury metabolism and bioaccumulation processes in *Drosophila* have been reported (Ramel and Magnusson, 1969), the distinctive activity of these functions among different strains may also influence the controversial results found in the literature, regarding its genotoxic activity (Osgood et al., 1991).

There are several agreements about the main mechanism of mercury genotoxicity involving aneuploidy mechanisms. The strong affinity of mercury for sulfhydryl groups available in the spindle impairs its function, leading to mistakes in chromosome segregation and subsequently to aneuploidy (De Flora et al., 1994; Stoiber et al., 2004). Yet, it must be pointed out that the wing spot assay detects a wide range of genotoxic effects, including aneuploidy (Graf et al., 1984). Therefore, the negative results reported here are difficult to explain if we assume an important role of mercury on chromosome segregation because, if this occurred, we would expect an induction of single spots caused by non-disjunction.

Toxicity analyses of the mercury compounds carried out in this study showed a high sensitivity of the *mwh/ff³* strain to moderate doses of this metal, allowing only a genotoxic evaluation at low doses (maximum of 50 µM for MC and 5 µM for MC). Thus, it is possible that the high toxicity of mercury hides its true genotoxic potential.

Acknowledgements

Erico R. Carmona thanks the valuable support from M. Rivadeneira, E.E. Carmona, V. Ortiz, F. Carmona, L. Alarcón and J. Prieto. The authors also thank the helpful suggestions provided by M. Rizki and Mark N. Duk. This research was supported in part by the Generalitat de Catalunya (2005SGR-00136).

References

- Ahlbom, A., Norell, S., Rodvall, Y., Nylander, M., 1986. Dentists, dental nurses, and brain tumours. Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.) 292, 662.
- Akiyama, M., Oshima, H., Nakamura, M., 2001. Genotoxicity of mercury used in chromosome aberration tests. Toxicol. In Vitro 15, 463–467.
- Alonso-Moraga, A., Graf, U., 1989. Genotoxicity testing of antiparasitic nitrofurans in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. Mutagenesis 4, 105–110.
- Amrani, S., Rizki, M., Cieus, A., Marcos, R., 1999. Genotoxic activity of different chromium compounds in larval cells of *Drosophila melanogaster*.

- gaster*, as measured in the wing spot test. *Environ. Mol. Mutagen.* 34, 47–51.
- Boening, D.W., 2000. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere* 40, 1335–1351.
- Boffetta, P., Merler, E., Vainio, H., 1993. Carcinogenicity of mercury and mercury compounds. *Scand. J. Work. Environ. Health* 19, 1–7.
- Boffetta, P., García-Gómez, M., Pompe-Kim, V., Zaridze, D., Bellander, T., Bulbulyan, M., Caballero, J.D., Ceccarelli, F., Colin, D., Dizdarevic, T., Español, S., Kobal, A., Petrova, N., Sällsten, G., Merler, E., 1998. Cancer occurrence among European mercury miners. *Cancer Causes Control* 9, 591–599.
- Bonacker, D., Stoiber, T., Bohm, K.J., Prots, I., Wang, M., Unger, E., Thier, R., Bolt, H.M., Degen, G.H., 2005. Genotoxicity of inorganic lead salts and disturbance of microtubule function. *Environ. Mol. Mutagen.* 45, 346–353.
- Carmona, E.R., 2006. Evaluación genotóxica de dos compuestos de mercurio con el ensayo de recombinación y mutación somáticas (SMART) en alas de *Drosophila melanogaster* MSc Thesis, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Clarkson, T.W., 1993. Mercury: Major issues in environmental health. *Environ. Health Perspect.* 100, 31–38.
- Codina, J.C., Pérez-Torrente, C., Pérez-García, A., Cazorla, F.M., de Vicente, A., 1995. Comparison of microbial tests for the detection of heavy metal genotoxicity. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29, 260–265.
- Crespo-López, M.E., Herculano, A.M., Corvelo, T.C., Do Nascimento, J.L., 2005. Mercurio y neurotoxicidad. *Rev. Neurol.* 40, 441–447.
- De Flora, S., Bennicelli, C., Bagnasco, M., 1994. Genotoxicity of mercury compounds. A review. *Mutat. Res.* 317, 57–79.
- Dihl, R.R., da Silva, C.G.A., do Amaral, V.S., Reguly, M.L., de Andrade, H.H.R., 2007. Mutagenic and recombinogenic activity of airborne particulates, PM10 and TSP, organic extracts in the *Drosophila* wing-spot test. *Environ. Pollut. May 1* [Epub ahead of print].
- Doadrio, A.L., 2004. Ecotoxicología y acción toxicológica del mercurio. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* 70, 933–959.
- Frei, H., Würigler, F.E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat. Res.* 203, 297–308.
- Frei, H., Würigler, F.E., 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 334, 247–258.
- Gayathri, M.V., Krishnamurthy, N.B., 1985. Investigations on the mutagenicity of two organomercurial pesticides, Ceresan and Agalol 3, in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Res.* 36, 218–229.
- Graf, U., Würigler, F.E., 1996. The somatic white-ivory eye spot test does not detect the same spectrum of genotoxic events as the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.* 27, 219–226.
- Graf, U., Würigler, F.E., Katz, A.J., Frei, H.J., Juon, H., Hall, C.B., Kale, P.G., 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6, 153–188.
- Guzmán-Rincón, J., Graf, U., 1995. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: Butterworth, F.M. et al. (Eds.), *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Plenum Press, New York, pp. 169–181.
- Kanematsu, N., Hara, M., Kada, T., 1980. Rec assay and mutagenicity studies on metal compounds. *Mutat. Res.* 77, 109–116.
- Kastenbaum, M.A., Bowman, K.O., 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res.* 9, 527–549.
- Lindsley, D.L., Zimm, G.G. (Eds.), 1992. *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego, CA.
- Magnusson, J., Ramel, C., 1986. Genetic variation in the susceptibility to mercury and other metal compounds in *Drosophila melanogaster*. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 6, 289–305.
- National Toxicology Program Study Report, 1993. Toxicology and carcinogenesis studies of mercuric chloride (CAS No. 7487-94-7) in F344 rats and B6C3F1 mice (Gavage studies). *Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser.* 408, 1–260.
- Nriagu, J.O., Pacyna, J.M., 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333, 134–139.
- Osgood, C., Zimmering, S., Mason, J.M., 1991. Aneuploidy in *Drosophila*, II Further validation of the FIX and ZESTE genetic test systems employing female *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 259, 147–163.
- Pacyna, E.G., Pacyna, J.M., 2002. Global emission of mercury from anthropogenic sources in 1995. *Water Air Soil Pollut.* 137, 149–165.
- Patrick, L., 2002. Mercury toxicity and antioxidants: Part I: Role of glutathione and alpha-lipoic acid in the treatment of mercury toxicity. *Altern. Med. Rev.* 7, 456–471.
- Porcella, D.B., Ramel, C., Jernelov, A., 1997. Global mercury pollution and the role of gold mining: An overview. *Water Air Soil Pollut.* 97, 205–207.
- Ramel, C., Magnusson, J., 1969. Genetic effects of organic mercury compounds II. Chromosome segregation in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas* 61, 231–254.
- Rasmuson, A., 1985. Mutagenic effects of some water-soluble metal compounds in a somatic eye-color test system in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 157, 157–162.
- Rizki, M., Amrani, S., Creus, A., Xamena, N., Marcos, R., 2001. Antigenotoxic properties of selenium: studies in the wing spot test in *Drosophila*. *Environ. Mol. Mutagen.* 37, 70–75.
- Rizki, M., Kossatz, E., Xamena, N., Creus, A., Marcos, R., 2002. Influence of sodium arsenite on the genotoxicity of potassium dichromate and ethyl methanesulfonate: studies with the wing spot test in *Drosophila*. *Environ. Mol. Mutagen.* 39, 49–54.
- Rizki, M., Kossatz, E., Creus, A., Marcos, R., 2004. Genotoxicity modulation by cadmium treatment: studies in the *Drosophila* wing spot test. *Environ. Mol. Mutagen.* 43, 196–203.
- Rizki, M., Kossatz, E., Velásquez, A., Creus, A., Farina, M., Fortaner, S., Sabbioni, E., Marcos, R., 2006. Metabolism of arsenic in *Drosophila melanogaster* and the genotoxicity of dimethylarsinic acid in the *Drosophila* wing spot test. *Environ. Mol. Mutagen.* 47, 162–168.
- Silva-Pereira, L.C., Cardoso, P.C., Leite, D.S., Bahia, M.O., Bastos, W.R., Smith, M.A., Burbano, R.R., 2005. Cytotoxicity and genotoxicity of low doses of mercury chloride and methyl mercury chloride on human lymphocytes in vitro. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38, 901–907.
- Slemr, F., Langer, E., 1992. Increase in global atmospheric concentrations of mercury inferred from measurements over the Atlantic Ocean. *Nature* 355, 434–437.
- Stoiber, T., Bonacker, D., Bohm, K.J., Bolt, H.M., Thier, R., Degen, G.H., Unger, E., 2004. Disturbed microtubule function and induction of micronuclei by chelate complexes of mercury (II). *Mutat. Res.* 563, 97–106.
- Tchounwou, P.B., Ayensu, W.K., Ninashvili, N., Sutton, D., 2003. Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health. *Environ. Toxicol.* 18, 149–175.
- Thier, R., Bonacker, D., Stoiber, T., Bohm, K.J., Wang, M., Unger, E., Bolt, H.M., Degen, G., 2003. Interaction of metal salts with cytoskeletal motor protein systems. *Toxicol. Lett.*, 75–81.
- Torres, C., Creus, A., Marcos, R., 1998. Genotoxic activity of four inhibitors of DNA topoisomerases in larval cells of *Drosophila melanogaster* as measured in the wing spot assay. *Mutat. Res.* 413, 191–203.
- Wolfe, M.F., Schwarzbach, S., Sulaiman, R.A., 1998. Effects of mercury on wildlife: A comprehensive review. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 146–160.
- Wong, P.K., 1988. Mutagenicity of heavy metals. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 140, 597–603.

Title: *In vivo* Comet assay in haemocytes of *Drosophila melanogaster*

Running title: Comet assay in *Drosophila* haemocytes

Authors: Erico R. Carmona ^a, Temenuga Guecheva ^b, Amadeu Creus ^a, Ricard Marcos ^{a, c, *}

^a Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus Bellaterra 08193 Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain

^b Departamento de Biofísica, Centro de Biotecnologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Prédio 43422, Caixa Postal 15093, CEP 91501-970, RS, Porto Alegre, Brazil.

^c CIBER Epidemiología y Salud Pública, ISCIII, Spain

* Correspondence to: Dr. Ricard Marcos, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus Bellaterra 08193 Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain. E-mail address: Ricard.Marcos@uab.es

Abstract

The aim of the present study was to develop for the first time the *in vivo* alkaline Comet assay on haemocytes of *Drosophila melanogaster* for genotoxicity testing. For this purpose, we analyzed the DNA damage induced by three well-known mutagen agents: Ethyl methanesulfonate (EMS), Potassium dichromate chloride (PDC) and Gamma radiation (γ -irradiation). *Drosophila* larvae of third instar were exposed to different concentrations and doses of EMS (1, 2 and 4 mM), PDC (0.5, 1 and 2.5 mM) and γ -irradiation (2, 4 and 8 Gy). Afterwards, the haemolymph were extracted from the larvae and haemocytes were isolated for conducting the Comet assay. The results showed a significant dose-related increase in DNA damage in haemocytes of *D. melanogaster* with the three mutagens agents tested, indicating that EMS, PDC and γ -irradiation exhibit genotoxic activity in haemocytes of *D. melanogaster*. These results demonstrate that the *in vivo* Comet assay on haemocytes of *D. melanogaster* may be a useful assay for genotoxicity assessment.

Keywords: Comet assay; *Drosophila melanogaster*; Genotoxicity; Haemocytes

1. Introduction

The Comet assay, also known as Single cell gel electrophoresis assay (SCG), is a method that allows to measure both qualitative and quantitative DNA damage in individual eukaryotic cells (Tice et al., 2000). During the last decade the Comet assay has been one of the most popular and extensively employed techniques for genotoxicity studies *in vivo*, because this assay is a simple and versatile test system where eventually any kind of tissue/cells can be used and only a reduced number of cells is needed per sample in order to conduct one experiment (Brendler-Schwaab et al., 2005). In addition, this assay is highly sensitive, allowing the detection of low levels of DNA damage and several kinds of DNA damage, such as double- and single-strand DNA breaks, DNA cross-links, alkali labile sites and delayed repair sites (Speit and Hartmann, 2005, 2006). Thus, and given the previous advantages, this test system assay has been developed and performed in diverse organism models from bacteria to humans for assessing genotoxic potential of chemical compounds and physical agents, both *in vitro* and *in vivo* studies (Dhawan et al., 2009).

Recently, the alkaline version of Comet assay has been adapted, validated and applied in the fruit fly *Drosophila melanogaster* for *in vivo* genotoxic testing of some chemical compounds and environmental pollutants (Mukhopadhyay et al., 2004; Siddique et al., 2005a,b). These studies, which have employed mainly brain ganglia and mid gut cells as target tissue from third instar larvae, have demonstrated that *Drosophila* is a suitable model for *in vivo* genotoxicity evaluation with the Comet assay. Moreover, this assay offers the possibility to detect mutagenesis mechanisms related with the repair effects of DNA in *Drosophila*, as it has been observed after exposure with methyl methanesulphonate (MMS), ethyl methanesulphonate (EMS) and *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) compounds (Bilbao et al., 2002).

Though in mammals and humans the *in vivo* studies commonly employ lymphocytes from peripheral blood as the main target cells for measuring DNA damage with the Comet assay, other analogous kinds of cells could be also used in invertebrates. As opposed to mammals, the circulatory system in invertebrates such as *D. melanogaster* is open; however, its cellular system is

similar to the lymphocytes of mammals in the haemocytes of the haemolymph (Meister, 2004).

The haemocytes offer several advantages as target tissue for *in vivo* genotoxic testing, since this type of cells show high sensitivity, it requires a simple and no aggressive methodology to collect and obtain single cells suspension (Rank and Jensen, 2003; Rigonato et al., 2005), assuming reduced levels of basal DNA damage in cells (Hartmann et al. 2003). In addition, the haemocytes may be directly exposed with toxic substances from the haemolymph, thus, becoming a highly interesting target tissue to perform genotoxicity assessment (Mersch et al., 1996; Villela et al., 2006). Consequently, during the last years the haemocytes have been one of the most extensively employed cells for measuring DNA damage in studies related to genotoxic assessment and environmental monitoring using invertebrates (Bolognesi et al., 1999; Grazeffe et al., 2008; Pavlica et al., 2000; Rigonato et al., 2005; Villela et al., 2006). Though the DNA damage induced in blood cells from the haemolymph has been analyzed in different marine and terrestrial invertebrates, such as clams, mussels, oysters, sea urchins and earthworms (Dhawan et al., 2009), so far these tissues/cells in *D. melanogaster* have not received any attention.

Therefore, in the present study, we developed for the first time the alkaline *in vivo* Comet test in haemocytes of *D. melanogaster*. For this purpose, we analyzed and evaluated the results obtained from DNA damage induced in haemocytes by treatments with three well-known mutagen agents: Ethyl methanesulfonate (EMS), Potassium dichromate (PDC), and gamma irradiation (γ -irradiation).

2. Materials and methods

2.1. Fly strain

The wild-type strain of *D. melanogaster* (Oregon R⁺), efficient for all types of repairing was used. This strain was cultured in bottles with standard medium of *Drosophila* at a temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and at a relative humidity of ~ 60%.

2.2. Chemicals

Ethyl methanesulfonate (EMS, CAS N° 62-50-0, 100% purity), potassium dichromate (PDC, CAS N° 7689-03-4, 99.9% purity) and phenylthiourea (PTU, N° CAS 103-85-5, ≥95% purity) were obtained from Sigma-Aldrich (Spain); low melting point agarose (LMA) and normal melting point agarose (NMA) were from Gibco BRL, Life Technologies (Paisley, UK); phosphate-buffered saline (PBS) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) were from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO); *N*-laurosylsarcosine sodium hydroxide and Triton X-100 were from Fluka Chemical AG (Buchs, Switzerland); sodium hydroxide was from Carlo Erba Reagenti (Milano, Italy); sodium chloride was from Panreac Química SA (Barcelona, Spain) and Tris buffer was from US Biochemical (Cleveland, OH).

2.3. Exposure to mutagenic agents

On the one hand, larvae 72 ± 2 h old (third instar) were placed in plastic vials containing 4.5 g of *Drosophila* instant medium (Carolina Biological Supply, Burlington, NC) prepared with different concentrations of EMS (1, 2 and 4 mM), and PDC (0.5, 1 and 2.5 mM). Immediately before use, the compounds were dissolved in distilled water. The larvae were fed on this medium during 24 ± 2 h. The control larvae received *Drosophila* instant medium hydrated with distilled water. On the other hand, larvae 96 ± 2 h old were irradiated in plastic vials containing normal *Drosophila* food, with single doses of 2, 4, and 8 Gy. The γ -irradiation was performed in a ^{137}Cs irradiator Model IBL 437C (Schering Bio International, Germany), from Unitat Tècnica de Protecció Radiològica (UTPR) of Universitat Autònoma de Barcelona. All the experiments were carried out at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and ~ 60% of relative humidity.

2.4. Haemocytes collection

D. melanogaster haemocytes were collected according to Irving et al., (2005) with minor modifications. Chilled larvae 96 ± 2 h old were removed from food media, washed in water, sterilized in 5% bleach and dried. The cuticle from 40-

60 larvae was then disrupted with two fine forceps. The haemolymph and circulating haemocytes were directly collected in cold PBS solution containing 0.07% PTU, and separated in 1.5 mL microcentrifuge tube. Pooled haemolymph was centrifuged at 300 g for 10 min at 4° C, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 20 µL of cold PBS.

2.5. Comet assay

The Comet assay was performed as previously described by Singh et al. (1988) with minor modifications. The cell samples (~ 40 000 cells in 20 µL) were carefully resuspended in 140 µL of 0.75% LMA, layered onto microscope slides precoated with 150 µL of 1% NMA (dried at room temperature). Two gels were mounted in each slide and covered with a coverslip. Immediately after agarose solidification (for 10 min at 4°C), the coverslips were removed and the slides were immersed in a cold fresh lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100 and 1% *N*-lauroylsarcosinate, pH 10) for 2 h at 4°C in a dark chamber. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was excluded from lysis solution preparation, because it has been considered unnecessary for *Drosophila* tissues, and DMSO at low concentrations is cytotoxic in *Drosophila* (Mukhopadhyay et al., 2004; Siddique et al., 2005a). To prevent additional DNA damage, the following steps were performed under dim light. Afterwards, the slides were placed for 25 min in a horizontal gel electrophoresis tank filled with cold electrophoretic buffer (1mM Na₂EDTA and 300 mM NaOH, pH 13) to allow DNA unwinding. The electrophoresis was carried out in the same buffer for 20 min at 25 V and 300 mA. Unwinding and electrophoresis processes were done at 4°C. After electrophoresis, slides were neutralized with two washes of 5 min with 0.4 mM Tris (pH 7.5). The slides were stained with 20 µL of DAPI (1 µg/mL), per gel. The images were examined at 400X magnification with a Komet 5.5 Image Analysis System (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, UK) fitted with an Olympus BX50 fluorescence microscope equipped with a 480-550 nm wide band excitation filter and a 590 nm barrier filter. One hundred randomly selected cells (50 cells per two replicates slides) were analyzed per treatment. The percentage of DNA in the tail (% DNA tail) was used to measure DNA

damage, since this is the most widely used and recommended parameter for Comet data analysis (Kumaravel and Jha, 2006; Lovell and Omori, 2008). The % DNA tail was computed using the Comet software version 5.5.

2.6. Statistical analyses

The general linear model (GLM) was used to analyse significant differences of data results. The Fisher (LSD) post hoc test was performed in order to compare control versus treatment groups in each experiment. The results obtained were considered statistically significant at $P \leq 0.05$.

All data were presented in arithmetic mean \pm standard error, and 95% confidence intervals.

Finally, data analyses were performed using Statgraphics plus version 5.1. (Statistical Graphics Corporation, 2001, Rockville, USA software package).

3. Results

Before carrying out genotoxicity experiments previous viability tests were needed in order to select effective doses for EMS, PDC and γ -irradiation. Thus, the criterion for doses levels was based in two assumptions: first, the decrease in the percentage of developing treated larvae was a clear indicator that the larvae were affected by the agents, and second, the number of third instar larvae was high enough to perform genotoxicity experiments. In all toxicity experiments conducted in our laboratory, the larvae viability was always $>50\%$ at higher doses supplied from each mutagen agent.

The results obtained from Comet assay experiments testing the genotoxic effects of EMS, PDC and γ -irradiation on haemocytes of *D. melanogaster* are summarized in Table 1. On the one hand, the EMS and PDC were supplied to 72 ± 2 h old larvae (third instar), during 24 ± 2 h with concentrations ranging from 1 to 4 mM for EMS, and from 0.5 to 2.5 mM for PDC. On the other hand, 96 ± 2 h larvae were exposed acutely to γ -irradiation with doses ranging from 2 to 8 Gy. Immediately after the treatments, the larvae were collected from culture

media and the haemocytes were obtained and isolated from haemolymph larvae for conducting the Comet assay.

The results obtained indicate that EMS, PDC and γ -irradiation induced significant dose-dependent increase of DNA damage on haemocytes of *Drosophila* larvae measured through percentage of DNA tail (Fig. 1). The DNA damage did not show significant differences at low doses supplied to larvae with EMS, PDC and γ -irradiation (Table 1).

4. Discussion

The haemolymph has demonstrated to be a good tissue for genotoxicity assessment of different chemical compounds and pollutants, given its physiological role in the transport of toxic substances and immunity function, being directly exposed to mutagenic agents (Mersch et al., 1996; Rigonato et al., 2005; Villela et al., 2006; Villela et al., 2007). Moreover, this tissue is sensitive to DNA damage induced by MMS and hydrogen peroxide (Cheung et al., 2006; Rigonato et al., 2005) and environmental pollutants, such as copper sulfate and pentachlorophenol (Villela et al., 2006). On the other hand, the haemolymph is better than other invertebrate tissues (e.g. gills) for conducting the *in vivo* Comet assay, considering easy collection, handling, and cell isolation (Rank and Jensen, 2003).

Recently, the *in vivo* Comet assay has been developed and applied in different somatic cells in *Drosophila*. However, in these studies the assay has been only applied to cells from nervous and digestive system, while blood cells of *Drosophila* have not been analyzed with this test. Thus, in the present study we report for the first time the results obtained about DNA damage on haemocytes of *D. melanogaster* using the *in vivo* Comet assay.

To carry out the Comet assay with a new cellular system some steps are needed: 1) easy collection and minimal quantities of cells for conducting the assay, 2) basal levels of DNA damage similar to those observed in other cellular systems, and 3) sensitivity testing of the cells to the genotoxic effect of standard mutagens.

Regarding the first step, both the number and quality of the cells were sufficient to carry out the studies with the Comet assay. In this point, it is important to

notice that the haemocytes, in suspension into the haemolymph, do not require any aggressive handling for their isolation. The protocol for the mechanic disgregation of a tissue can induce additional damage in the DNA, producing high basal levels of damage. This does not occur in our proposed protocol, since the observed levels of DNA damage were significantly low. Finally, the treatments carried out by 24 ± 2 hours in third instar larvae with different mutagenic doses of EMS, PDC, and γ -irradiation, clearly induced DNA damage in haemocytes; in addition, the analyses suggest that the haemocytes show a dose-response tendency between the increase of doses of each mutagenic agent versus the increase of DNA damage measured with the percentage of DNA in the tail, demonstrating that *D. melanogaster* is a good bioindicator of exposure to genotoxic agents using this kind of cells and test system.

Though gut cells (other kind of cells proposed) are the main targets of genotoxic agents when administrated to the organism via feeding, the circulating haemocytes of haemolymph can also be exposed, since toxic substances are transported through this circulatory fluid (Mersch et al., 1996). Thus, and given the advantages of working with this kind of tissue, haemocytes have been considered as a good alternative for potential genotoxic assessment of mutagens selected in the present study.

EMS, PDC and γ -irradiation are well-known mutagens with well-established genotoxic mechanisms which can induce different kinds of DNA damage. EMS is an alkylant agent that can induce different chromosome damage in the cells, such as chromosome aberrations, clastogenesis and aneuploidy (Sega, 1984). PDC is a genotoxic heavy metal which can induce DNA oxidative damage and delayed DNA repair (Wise et al., 2008). Finally, γ -irradiation is a physical agent that can produce single and double DNA strand breaks (Ward, 1988, 1990). Hence, both the assay protocol proposed here and the selection of the three agents with distinct mechanisms have allowed us to detect not only a specific genotoxic effect, but a wide range of DNA damage.

In the present study, the doses of EMS, PDC and γ -irradiation were selected given their clear genotoxic effects under normal DNA repair conditions and low toxic effects on *Drosophila* larvae. As it has been previously indicated, the mutagens evaluated are chemically, physically and genotoxically different. However, the results show that EMS and γ -irradiation are significantly

correlated between the doses applied and DNA damage, suggesting that these agents could possibly be more effective mutagens.

In conclusion, the results obtained with the alkaline *in vivo* Comet assay on *Drosophila* haemocytes indicate clearly that this is a suitable assay for the detection of DNA damage induced by chemical and physical mutagens, suggesting that this technique could also be used to assess other potential genotoxic agents.

Conflict of interest

The authors declare to have no conflict of interests.

Acknowledgement

E. Carmona thanks the valuable help from Robert Markus for his assistance in haemocytes protocol collection, and the support from UAB-PIF Grant N° 409-02-2/07.

References

- Bilbao, C., Ferreiro, J.A., Comendador, M.A., Sierra, L.M. 2002. Influence of *mus201* and *mus308* mutations of *Drosophila melanogaster* on the genotoxicity of model chemicals in somatic cells *in vivo* measured with the comet assay. *Mutat Res* 503: 11-9.
- Bolognesi, C., Landini, E., Roggieri, P., Fabbri, R., Viarengo, A. 1999. Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: Experimental studies. *Environ Mol Mutagen* 33: 287-92.
- Brendler-Schwaab, S., Hartmann, A., Pfuhler, S., Speit, G. 2005. The *in vivo* comet assay: Use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis* 20: 245-54.
- Cheung, V.V., Depledge, M.H., Jha, A.N. 2006. An evaluation of the relative sensitivity of two marine bivalve mollusc species using the comet assay. *Mar Environ Res* 62: S301-5.

- Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D. 2009. Comet assay: A reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol* 25: 5-32.
- Grazeffe, V.S., Tallarico Lde, F., Pinheiro, Ade S., Kawano, T., Suzuki, M.F., Okazaki, K., Pereira, C.A., Nakano, E. 2008. Establishment of the comet assay in the freshwater snail *biomphalaria glabrata* (say, 1818). *Mutat Res* 654: 58-63.
- Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., et al. 2003. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. 4th international comet assay workshop. *Mutagenesis* 18: 45-51.
- Irving, P., Ubeda, J.M., Doucet, D., Troxler, L., Lagueux, M., Zachary, D., Hoffmann, J.A., Hetru, C., Meister, M. 2005. New insights into drosophila larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cell Microbiol* 7: 335-50.
- Kumaravel, T.S., Jha, A.N. 2006. Reliable comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals. *Mutat Res* 605: 7-16.
- Lovell, D.P., Omori, T. 2008. Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis* 23: 171-82.
- Meister, M. 2004. Blood cells of drosophila: Cell lineages and role in host defence. *Curr Opin Immunol* 16: 10-5.
- Mersch, J., Beauvais, M.N., Nagel, P. 1996. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. *Mutat Res* 371: 47-55.
- Mukhopadhyay, I., Chowdhuri, D.K., Bajpayee, M., Dhawan, A. 2004. Evaluation of in vivo genotoxicity of cypermethrin in *drosophila melanogaster* using the alkaline comet assay. *Mutagenesis* 19: 85-90.

- Pavlica, M., Klobucar, G.I., Vetma, N., Erben, R., Papes, D. 2000. Detection of micronuclei in haemocytes of zebra mussel and great ramshorn snail exposed to pentachlorophenol. *Mutat Res* 465: 145-50.
- Rank, J., Jensen, K. 2003. Comet assay on gill cells and hemocytes from the blue mussel *mytilus edulis*. *Ecotoxicol Environ Saf* 54: 323-9.
- Rigonato, J., Mantovani, M.S., Jordão, B.Q. 2005. Comet assay comparison of different *corbicula fluminea* (mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. *Genetics and Molecular Biology* 28: 464-8.
- Sega, G.A. 1984. A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. *Mutat Res* 134: 113-42.
- Siddique, H.R., Chowdhuri, D.K., Saxena, D.K., Dhawan, A. 2005a. Validation of *drosophila melanogaster* as an in vivo model for genotoxicity assessment using modified alkaline comet assay. *Mutagenesis* 20: 285-90.
- Siddique, H.R., Gupta, S.C., Dhawan, A., Murthy, R.C., Saxena, D.K., Chowdhuri, D.K. 2005b. Genotoxicity of industrial solid waste leachates in *drosophila melanogaster*. *Environ Mol Mutagen* 46: 189-97.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-91.
- Speit, G., Hartmann, A. 2005. The comet assay: A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods Mol Biol* 291: 85-95.
- Speit, G., Hartmann, A. 2006. The comet assay: A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol* 314: 275-86.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35: 206-21.

- Villela, I.V., de Oliveira, I.M., Silveira, J.C., Dias, J.F., Henriques, J.A., da Silva, J. 2007. Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on limnoperna fortunei exposed to guaiba hydrographic region samples (brazil) under laboratory conditions. *Mutat Res* 628: 76-86.
- Villela, I.V., de Oliveira, I.M., da Silva, J., Henriques, J.A. 2006. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (limnoperna fortunei) exposed to environmental contaminants. *Mutat Res* 605: 78-86.
- Ward, J.F. 1988. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: Identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 35: 95-125.
- Ward, J.F. 1990. The yield of DNA double-strand breaks produced intracellularly by ionizing radiation: A review. *Int J Radiat Biol* 57: 1141-50.
- Wise, S.S., Holmes, A.L., Wise, J.P.S. 2008. Hexavalent chromium-induced DNA damage and repair mechanisms. *Rev Environ Health* 23: 39-57.

Tables.

Table 1. Comet assay data obtained after exposure to EMS, PDC and γ -irradiation on the haemocytes of *D. melanogaster*.

Groups	% DNA tail ^a	95% CI of % DNA tail ^b	
Pooled control	15.40 \pm 0.48	14.50	16.35
1 mM EMS	18.87 \pm 0.87	17.09	20.65
2 mM EMS	21.34 \pm 0.86 *	19.56	23.12
4 mM EMS	29.08 \pm 0.88 *	27.30	30.86
0.5 mM PDC	17.96 \pm 0.81	16.43	19.50
1 mM PDC	19.22 \pm 0.66 *	17.68	20.76
2.5 mM PDC	19.55 \pm 0.80 *	18.02	21.09
2 Gy	15.43 \pm 0.70	13.92	16.94
4 Gy	16.94 \pm 0.85 *	15.43	18.45
8 Gy	22.64 \pm 0.79 *	21.13	24.15

^a Mean \pm standard error from three experiments (300 cells). ^b % DNA tail 95% confidence intervals.

* P < 0.01 *versus* control.

Fig. 1

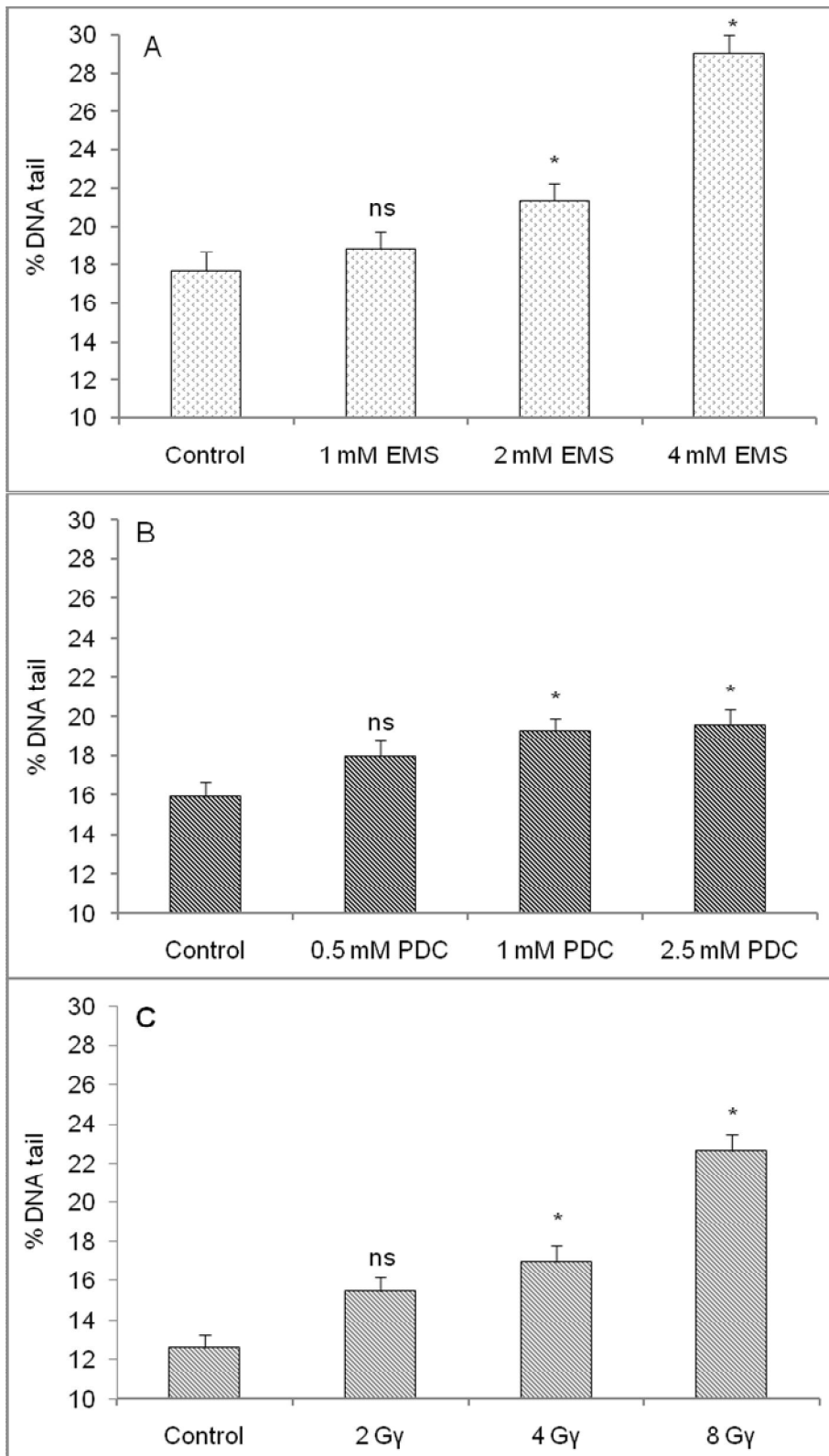


Figure legends

Fig. 1. DNA damage of EMS (A), PDC (B) and γ -irradiation (C) in haemocytes of *D. melanogaster* measured with percentage of DNA in the tail (% DNA tail). ns, not significant; *, $P < 0.01$ compared with control group.

