

Tesis de Posgrado

Inducción de mutaciones en *Drosophila Melanogaster* por medio de agentes alquilantes y Rayos X

De Mazar Barnett, Beatriz K.

1963

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

De Mazar Barnett, Beatriz K.. (1963). Inducción de mutaciones en *Drosophila Melanogaster* por medio de agentes alquilantes y Rayos X. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1149_DeMazarBarnett.pdf

Cita tipo Chicago:

De Mazar Barnett, Beatriz K.. "Inducción de mutaciones en *Drosophila Melanogaster* por medio de agentes alquilantes y Rayos X". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1963.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1149_DeMazarBarnett.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Induccion de Mutaciones en Drosophila Melanogaster por medio
de Agentes Alquilantes y Rayos X

Beatriz K. de Mazar Barnett

TESIS 1119

Tesis presentada para optar al
Titulo de Doctora en Ciencias Naturales

1963

Este trabajo fué realizado en el Laboratorio de Genética I de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, mediante una Beca otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

Hago llegar a la Comisión Nacional de Energía Atómica mi formal agradecimiento por las facilidades acordadas para la realización de las irradiaciones.

Deseo dejar constancia de mi sincero reconocimiento al Ingeniero JUAN I. VALENCIA, por su eficaz guía y su apoyo constante durante el transcurso del trabajo.

Resumen

En el presente trabajo se estudia el efecto mutagénico de una mostaza nitrogenada: clorhidrato de metil- bis (cloroetil amina N óxido) MUSTRON, de una polietileneimina: trietilene-tiofosforamida THIO TEPA y de tratamientos en que la acción de esos agentes se combina con la de los Rayos X. Con THIO TEPA se obtiene una curva de sensibilidad en espermatogénesis con máximos y mínimos característicos. El oocito maduro (estado 14) demuestra mayor sensibilidad a la acción de ambos alquilantes que estados anteriores de su desarrollo. Los tratamientos combinados indican un modo de acción e interacción distinto para cada uno de los agentes. En todas las experiencias con machos y con hembras el THIO TEPA mostró mayor eficiencia mutagénica que el MUSTRON.

Indice

	pág.
I.- Introducción	
a) Naturaleza química y Acción de los agentes alquilantes	3
b) Gametogénesis en <u>Drosophila melanogaster</u>	10
II.- Materiales y Técnicas	
a) Aparato utilizado	13
b) Técnica de Inyección	14
Fotografía del Aparato utilizado	15
c) compuestos alquilantes empleados	14
d) Técnica de irradiación	16
e) Técnicas de subcultivos	16
f) Cepas utilizadas	17
g) Esquemas de los cruzamientos	18
III.- Experiencias y Resultados	
a) Tratamientos en machos	21
Fig. 1 Letales recesivos ligados al sexo, inducidos en sucesivos subcultivos de machos, por medio de THIO TBPA y TEM.	23
b) Tratamientos en hembras	
A.- Experiencias con MUSTRON	24
1) Mutaciones visibles	24
2) Comparación de la fertilidad de hembras tratadas con MUSTRON con la de hembras sin tratar.	25
3) Mutaciones letales recesivas ligadas al sexo	26
B.- Experiencias con THIO TBPA	28
C.- Experiencias con Rayos X	29
D.- Tratamientos combinados: Alquilantes y Rayos X	30
1) MUSTRON y Rayos X	32
2) THIO TBPA y Rayos X	34

Tabla 14.- Cuadro comparativo del efecto mutagénico de MUSTRON ($7 \times 10^{-2} \text{M}$), de THIO TEPA ($3 \times 10^{-2} \text{M}$) de Rayos X (800r) y de los tratamientos combinados, sobre el estado 14 del oocito de Drosophila melanogaster.

37

Fig. 2.- Gráfico comparativo de las frecuencias de letales inducidos en el estado 14 del oocito de Drosophila melanogaster por medio de MUSTRON ($7 \times 10^{-2} \text{M}$) THIO TEPA ($3 \times 10^{-2} \text{M}$) Rayos X(800r) y tratamientos combinados

38

IV.- Discusión y Conclusiones

39

V.- Bibliografía

47

I- Introducción

En los estudios realizados sobre acción mutagénica de radiaciones y sustancias químicas diversas, varios investigadores han dedicado especial atención al grupo de los compuestos alquilantes, estudiando sus efectos en virus, bacterias, plantas y animales.

Este interés se justifica porque los alquilantes producen efectos biológicos similares a los de las radiaciones ionizantes. Tienen la capacidad de inducir cambios en la estructura de los cromosomas, y mutaciones génicas (Letales y visibles, dominantes y recesivas). Interfieren en algunos de los procesos de la división celular, que eventualmente conducen a la muerte de las células tratadas. Matan directamente ciertas células sensibles, como los glóbulos blancos, los óvulos de los mamíferos y determinadas células productoras de pigmentos. Tienen doble efecto, carcinógeno y antitumoral (efecto Haddow), es decir que pueden inducir cáncer y leucemia y al mismo tiempo se les utiliza en la terapéutica de estas enfermedades.

Las investigaciones sobre mutagénesis indican ciertas diferencias en los resultados observados, que dependen fundamentalmente del agente inductor y del locus. Las células germinales, en los distintos estados de la gametogénesis, también varían apreciablemente en su sensibilidad a los mutagénicos. Todas esas diferencias se traducen en la naturaleza, distribución y frecuencia de las mutaciones inducidas.

La mayoría de las investigaciones sobre inducción de mutaciones

en Drosophila melanogaster, por medio de alquilantes, se han realizado sobre machos. Esto se explica, porque la escasa cantidad de citoplasma que rodea el núcleo germinal masculino lo hace bien accesible a los agentes inductores. Además, tratando machos es fácil obtener una prole numerosa e individualizar la descendencia proveniente de distintos estados de la espermatogénesis por medio de una adecuada técnica de fraccionamiento. En el presente trabajo se consideró de interés experimentar con hembras, para tratar de aportar nueva información sobre la sensibilidad del material hereditario del oocito a los alquilantes, en las distintas etapas de su desarrollo.

Con el objeto de estudiar la interacción gen-mutagén, se planearon experiencias para observación de mutaciones visibles. Los resultados que se obtuvieron, indicaron la conveniencia de comparar la fertilidad de las hembras tratadas con la de testigos sin tratar. Hecha la comprobación de que la fertilidad de las hembras no se ve afectada, se encararon una serie de experimentos para observación de letales recesivos ligados al sexo, en tratamientos con los alquilantes solos y en combinación con pre y post - tratamientos con Rayos X. En todos los casos se emplearon técnicas de subcultivos, que permiten estudiar la sensibilidad del material hereditario en oogénesis.

También se realizaron experimentos con machos, para tener un control del efecto comparativo de los alquilantes usados.

Se eligieron, para esta serie de trabajos, dos compuestos representativos de dos grupos distintos de alquilantes, una mostaza nitrogenada MUSTRON y una polietileneimina THIO TEPA. Los estudios realizados hasta el momento parecen indicar un modo de acción dis-

tinto de estas sustancias. Las mostazas nitrogenadas ejercerían su efecto por alquilación de las guaninas del ADN (Brookes y Lawley, 1960) mientras que las polietileneiminas actuarían sobre pirimidinas, especialmente sobre la timina (Lorkiewicz y Szybalski, 1961). En esta forma se puede investigar la acción mutagénica de dos alquilantes que llegan a inducir mutación por diferentes caminos.

Para mayor claridad, en la exposición del trabajo se han agrupado las experiencias de acuerdo a su naturaleza, sin seguir el orden en que éstas se realizaron y que respondió a los interrogantes que cada caso iba planteando.

a - Naturaleza química y acción de los agentes alquilantes

Los alquilantes constituyen un numeroso conjunto de sustancias químicas que tienen como rasgo común la capacidad de ceder radicales alquílicos, simples, como CH_3 , C_2H_5 o compuestos $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, CH_2COCH_3 . Según el número de grupos funcionales que tenga su molécula, son mono, bi o polifuncionales. La alquilación es un proceso reversible.

Ross (1962) clasifica los agentes alquilantes que actúan en sistemas biológicos, de la siguiente manera:

Alquil haluros: ej. $\text{CH}_3 \text{I}$ (metil ioduro)

Esteres de ácidos sulfónicos: ej. $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ (cloroetil metano sulfonato).

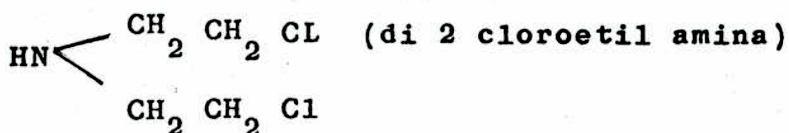
Esteres del ácido sulfúrico: ej. $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{SO}_4$ (dietil sulfato)

Esteres del ácido fosfórico: ej. $(\text{CH}_3)_2\text{HPO}_4$ (dimetil fosfato)

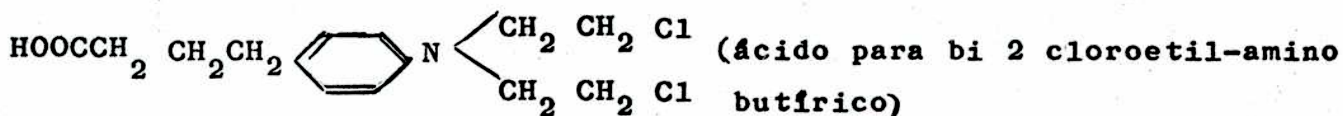
Clorometil éteres: ej. $\text{CH}_3\text{-O-CH}_2\text{Cl}$ (metoxi metil cloruro)

2 - cloroetil sulfuros: ej. $\text{CH}_3\text{-S} \begin{cases} \text{CH}_2\text{Cl} \\ \text{CH}_2\text{Cl} \end{cases}$ (metil 2 cloroetil sulfuro)

2 cloroetil aminas: comprende las mostazas aminadas alifáticas, ej.

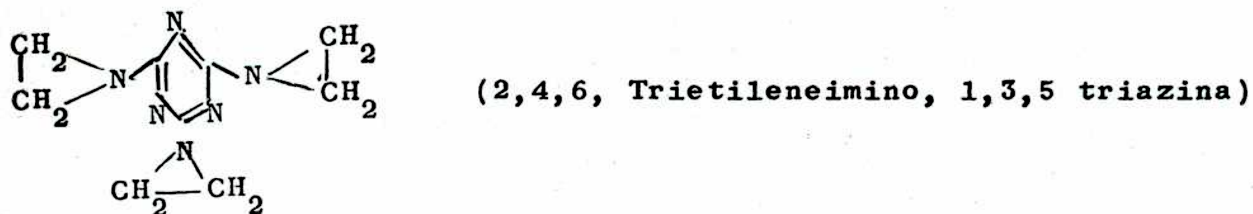


y las mostazas aminadas aromáticas, ej.



Epóxidos: ej. $\begin{matrix} \text{CH}_2 & \text{CH} \\ & \diagdown \quad / \\ & \text{O} \end{matrix} \quad \begin{matrix} \text{CH} & \text{CH}_2 \\ & / \quad \diagdown \\ & \text{O} \end{matrix}$ (diepoxi butano)

Etileneiminas y etileneimidaz: ej.



Diazo alcanos:ej.: CH_2N_2 (diazo metano)

La acción de los alquilantes sobre compuestos de importancia biológica: proteínas, enzimas y ácidos nucleicos ha sido extensamente estudiada, tanto en lo que respecta a los grupos químicos afectados por la alquilación, como a los efectos biológicos que ésta produce.

En el estado actual de los conocimientos sobre estas reacciones, no puede descartarse totalmente la posibilidad de que algunos efectos

causados por la alquilantes, puedan deberse a la inactivación de sistemas enzimáticos particularmente sensibles, a cambios inducidos en aminoácidos, que conduzcan a su substitución por otros, en las proteínas, o a influencias en la permeabilidad celular. Sin embargo, su reacción con los ácidos nucleicos, especialmente con el ADN, es la de mayor importancia, ya que la mayoría de las lesiones implican el núcleo celular.

Reacciones con proteínas y enzimas: a pH fisiológico, los grupos capaces de reaccionar con alquilantes son carboxilo, amino, fenol, sulfhidrilo, imidazol y guanídico. Aparte de la acción propia de cada alquilante, existen factores que regulan la extensión de la reacción de estos grupos, según se deduce de experiencias "in vitro":

- a) Factores de competencia: distinta afinidad de los centros reactivos.
- b) Factores estéricos: como en el caso de los grupos sulfhidrilo, que cuando se encuentran en estructuras proteicas plegadas, son prácticamente inaccesibles.
- c) Concentración del alquilante en el sistema: la adsorción del agente sobre un polímero, tiende a aumentar la concentración del mismo.
- d) Tipo de unión entre algunos grupos: se atribuye a la unión salina, no ionizada entre el grupo amino y el carboxilo, la elevada reactividad del grupo amino.

Stacey y col. (1958) opinan que la esterificación de los carboxilos, es la única reacción con las proteínas nativas, compartida por todos los agentes alquilantes.

Roberts y Warwick (1959) demostraron que el MYLERAN (1,4 dimetano-sul-

fonoxi-butano) reacciona "in vivo" produciendo un ion sulfonio, positivamente cargado, en reemplazo de un grupo cisteinil. Señalan que la presencia de esa carga, podría por sí misma, modificar la función de la proteína: este compuesto de sulfonio, puede a su vez, ser degradado, dejando una alanina o una serina en el lugar de la cisteína, lo que constituiría una "mutación química" dentro de la molécula de proteína.

Ross (1958), menciona la posibilidad de que la alquilación de los fosfolípidos asociados con las proteínas en las estructuras de las membranas celulares, podría llevar a una degradación que alterando la permeabilidad de la barrera, podría influenciar el delicado equilibrio enzimático.

En general los compuestos capaces de reaccionar con los grupos funcionales de las proteínas, pueden considerarse inhibidores potenciales de enzimas. Además, cualquier sustancia que reaccione con algún substrato, coenzima o ion metabólico necesario o los desplace, también inhibirá una reacción catalizada. Existen algunos datos sobre reacciones específicas de alquilantes con ciertas enzimas (Wood y col. 1948), (Barron, Bartlett y Miller, 1948), pero la evidencia que se posee actualmente, es sobre todo de inhibición de función, más que de acción sobre grupos químicos determinados.

Reacciones con los ácidos nucleicos: los posibles centros de reacción son los grupos fosfato y las bases púricas o pirimidicas. Alexander Coussens y Stacey (1958), postularon que la reacción primaria de la alquilación es la esterificación de los grupos fosfato, que midieron como reducción de acidez. Es interesante mencionar que esa reducción de acidez, no distingue entre esterificación de un ácido y cuaternización de un N Terciario. Las investigaciones más recientes (Brookes y

Lawley, 1960, 1961) indican que utilizando mostazas nitrogenadas el N 7 de la guanina es el centro más reactivo a la alquilación. (Y único a bajas concentraciones, pH neutro y 37°C, en condiciones "in vivo"). Estos autores destacan el hecho de que la presencia de un gran exceso de proteína y otros constituyentes celulares, no impiden la alquilación de los ácidos nucleicos.

Otro hecho interesante es que, si bien tanto el ARN como el ADN reaccionan en forma similar con los agentes alquilantes, el ARN alquilado es estable en solución acuosa neutra, mientras que el ADN se descompone con pérdida de 7-alquil guanina (en el caso de utilizarse un compuesto monofuncional) y de 7-alquil guaninas ligadas (con compuestos bifuncionales.)

Los trabajos de Szybalski (1960) y de Lorkiewicz y Szybalski (1961) indicarían que el modo de acción de los distintos alquilantes no es uniforme. Estos autores, trabajando con una polietileneimina TEM (Tri-etileneimino triazina), en bacterias y virus, encontraron que este agente actúa sobre precursores de pirimidinas, especialmente de timina. Produciendo deoxinucleótidos modificados, que se incorporan al ADN durante su síntesis.

Efectos biológicos: citotóxicos, citostáticos y mutagénicos. Al tratar de relacionar las reacciones químicas de los agentes alquilantes con los efectos biológicos que producen, han surgido dos hechos generales: en primer lugar, se estableció la correlación entre reactividad química medida como tasa de hidrólisis y citotoxicidad (Haddow, Kon y Ross 1948, rev. Ross 1953). En segundo lugar, el hecho de que los agentes polifuncionales ejercen por lo general una acción citotóxica marcadamente mayor que la correspondiente a los agentes monofunciona-

les (Loveless y Ross, 1959). Esto se supone debido a su capacidad para ligar "cross link" el ADN. Brookes y Lawley (1961) establecieron que con una mostaza bifuncional se forman productos por ligamiento de dos guaninas en bandas opuestas de la cadena de ADN. No consideran imposible el ligamiento de dos guaninas adyacentes, de una misma banda, pero esto requeriría que la cadena alquímica adquiriese una configuración no extendida, menos probable.

El mayor efecto citotóxico de los agentes bifuncionales, se explicaría por el impedimento que ese "cross linking" significaría para la separación de las bandas de ADN en la mitosis. Por otra parte, si estas uniones no son permanentes, y algunas de ellas desaparecen después de un período de tiempo (Debe recordarse que la alquilación es un proceso reversible) se producirá una prolongación del período intermitótico, seguido de recuperación celular. Es decir se produciría un efecto citostático.

Hay que tener en cuenta también, que la pérdida de guaninas alquiladas producida por agentes monofuncionales, debe interferir con la función normal del ADN.

En cuanto a la acción mutagénica de los alquilantes, si se considera la alquilación de guaninas como proceso que lleva a la mutación, deben considerarse varias posibilidades: en primer lugar, luego de la deleción de una guanina, la banda de ADN afectada, al servir de templado para la duplicación, podría dar lugar a una ADN idéntico al original, excepto por la pérdida de un par guanina - citosina. Esto sería una mutación por pérdida. En segundo término, la guanina que se pierde, podría ser reemplazada por una base anómala, dando lugar a una mutación por cambio de un par de bases.

En tercer lugar, si la alquilación de una base no llega a causar su deleción, puede de todas maneras, sufrir alteraciones que conduzcan a su apareamiento con una base anómala. Watson y Crick (1953) propusieron que si una base se encuentra en una de sus formas tautómeras menos comunes, podría producirse este fenómeno. Lawley y Brookes (1962) consideran que la ionización de una base, más que su tautomerización, sería un factor posible de mutación. Han sugerido como posible explicación de la actividad mutagénica de los alquilantes, la ionización ácida de las guaninas. Esta ionización provocaría una tendencia a un apareamiento anómalo de la guanina ionizada con timina.

Considerando los agentes alquilantes bifuncionales, aun cuando puedan producir daños, quizá más difíciles de reparar, no son en general, mutágenos más activos que los monofuncionales, (Oster y Pooley, 1960). Lo que parece ser, es que mono y bifuncionales, presentan un espectro distinto de mutación. Fahmy y Fahmy (1961) han encontrado, trabajando en Drosophila melanogaster, que la presencia de dos grupos activos favorece la inducción de mayor cantidad de mutaciones completas con respecto a mosaicos, más letales recesivos que visibles recesivos, mayor número de rupturas cromosómicas y mayor frecuencia de inactivaciones génicas debidas a pequeñas deficiencias. Atribuyen estos efectos a un "cross linking" inter o intramolecular de las subunidades génicas.

Hay evidencias de que el número de grupos funcionales, no es el único factor implicado en la inducción de mutaciones. Fahmy y Fahmy (1961) experimentando con la serie de los bimesiloxi - alcanos, encontraron variaciones en función del largo de la cadena entre los grupos activos (menor actividad, cuanto más elevado n) en la posición relativa de éstos (trans más activo que cis) con el grado de satura-

ción de la cadena central (un triple enlace entre los C centrales, mucho más activo que un enlace simple o doble). Estos mismos autores también estudiaron (1960) la relación entre estructura de la molécula de mostaza nitrogenada y mutagenicidad en esperma de Drosophila, en una serie de aril -2- cloroetil aminas con diferentes grupos prostéticos: amino ácidos, ácidos carboxílicos y aminas. Encontraron que la configuración molecular del grupo no alquilante es pertinente a la eficacia mutagénica influenciando las reacciones químicas que llevan a la mutación y no solamente varían el grado de penetración en los núcleos tratados.

Considerando, la acción de la polietileneimina TEM, sobre los precursores de pirimidinas, según los trabajos de Szybalski (1960), y de Lorkiewicz y Szybalski (1961), estos postulan para explicar esos resultados, un mecanismo de varios pasos:

- 1) Combinación semireversible de pirimidin-deoxiribósidos con TEM
- 2) Reacción de los mismos con producción de deonucleótido modificados.
- 3) Incorporación de análogos fraudulentos, producidos por el TEM, durante la síntesis del ADN.
- 4) Auto perpetuación de errores en la secuencia de las bases naturales, durante la subsecuente réplica de la banda modificada del ADN.

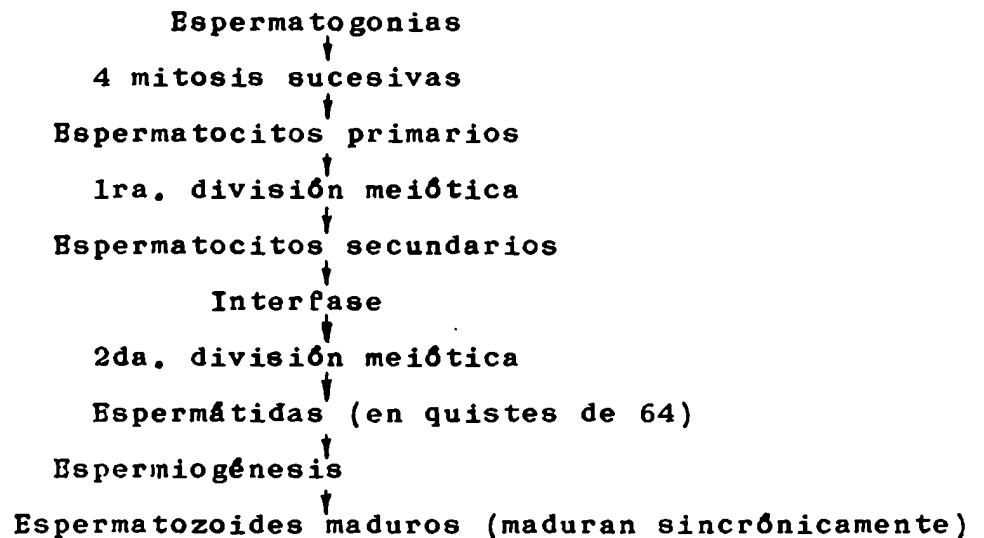
b - Gametogenesis en drosophila melanogaster

Como los estudios realizados sobre acción mutagénica de diversos agentes de Drosophila melanogaster indican diferencias importantes en la sensibilidad de material hereditario durante los distintos

estadios de gametogénesis, se ha considerado útil hacer una breve descripción de los mismos.

Espermatogénesis: (según Cooper, 1950). Durante la mayor parte de la vida de la larva, se acumulan espermatoцитos primarios por mitosis de las espermatogonias. Los procesos meióticos de esos espermatoцитos se mantienen a la espera de que la larva esté por entrar en metamorfosis. Luego, durante el período de pupa y la vida del a dulto, las espermatogonias dan nacimiento a una continua sucesión de espermatoцитos que completan su crecimiento y sufren meiosis sin aparente postergación, tardando en el proceso unos 15 días. Los des cendientes postmeióticos de estas células, son las espermátidas que se transforman en espermatozoides maduros durante el proceso de es permiogénesis. En el momento del nacimiento, el macho tiene ya espermatozoides maduros.

En el esquema se muestran los sucesivos estadios de la esperma togénesis:



Oogénesis: (según King y col., 1956 1957). Cada ovario consta de doce tubos u ovariolos, en cada uno de éstos hay un germario anterior y una serie de cámaras de huevos. En el ápice del germario se encuentran unos 50 oogonios en división mitótica, de cada oogonio que se divide para dar dos células, una repite el proceso y la otra se divide cuatro veces sincrónicamente dando 16 células en un quiste: una de estas células tiene la cromatina más densa (tiñe más intensamente) y es la que devendrá oocito. El quiste se va rodeando de células foliculares y cuando lo está completamente se convierte en la primera cámara de huevo.

King considera 14 estados sucesivos en el desarrollo del oocito, el primero es el oogonio en el quiste del germario y el estado 14 es el oocito primario completo, con apéndices dorsales. Bajo condiciones óptimas el proceso se completa en tres días.

Los cromosomas del oocito en estado 14 están en metafase de la primera división meiótica. La anafase tiene lugar inmediatamente después de la penetración del espermatozoide y sigue el proceso de la meiosis, sin interfase, hasta completarse la segunda división meiótica. Uno de los cuatro complejos cromosómicos formados va a ser el pronúcleo femenino, mientras que los otros tres pasan a ser los núcleos de los cuerpos polares. King y col. También estudiaron la distribución de los distintos estados en función de la edad de las hembras: en el momento de la emergencia carecen de oocitos en los estados de 8 a 14; a los dos días sólo tienen una pequeña proporción de oocitos completamente desarrollados (0,97%). A los seis días, el porcentaje de oocitos en estado 14 es de alrededor del 13%, que se mantiene más o menos constante por varios días.

La hembra fecundada, recién comienza a poner huevos, cuando tie

ne tres días de edad.

II- Materiales y técnicas

Varios son los métodos utilizados para la inducción de mutaciones en Drosophila melanogaster por medio de sustancias químicas:

- 1) Bañado de huevos.
- 2) Administración en la comida de larvas o adultos.
- 3) Administración por medio de aerosoles.
- 4) Inyección intraabdominal.

Para la realización del presente trabajo se eligió la inyección intraabdominal por considerarse que presenta dos ventajas evidentes sobre los demás: es el método que permite una dosificación más exacta al mismo tiempo que disminuye al máximo la interacción de la droga con el medio.

a) Aparato Utilizado:

Para la inyección se utiliza una microjeringa "AGLA" cuyas divisiones más finas dan 0,0002ml. La jeringa se sujeta en un soporte a la misma altura que la platina del microscopio estereoscópico.

Las agujas, de vidrio Pirex, se hacen estirando un capilar de unos 15 cm. de largo y de un diámetro aproximado de 0,75 mm., en una microforja tipo Leitz. De esta manera por cada capilar se obtienen dos microagujas.

La conexión de la aguja con la jeringa se hace por medio de un trozo de catéter de polietileno.

Una placa de lucite, con veinte pequeñas cavidades sirve para colocar las moscas en posición conveniente y que facilita la inyección.

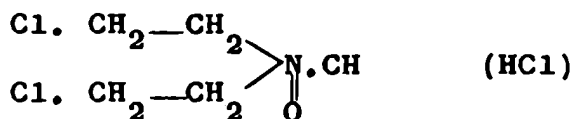
En la página siguiente se muestra el aparato armado y la placa de lucite.

b) Técnica de Inyección:

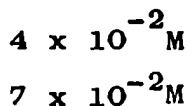
Se eterizan las moscas en grupos de 20 y se ubican en las cavidades de la placa. Luego se inyectan insertando la aguja dorsalmente entre el cuarto y quinto tergites abdominales. Se asegura así que las gonadas queden bañadas con la droga. La cantidad de solución inyectada (dos de las divisiones más finas de la jeringa) es de 0,0004 μ l).

c) Compuestos Alquilantes Empleados:

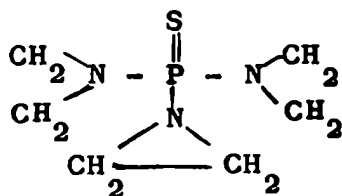
MUSTRON: clorhidrato de metil - bis (cloroetil amina N óxido) de fórmula estructural:

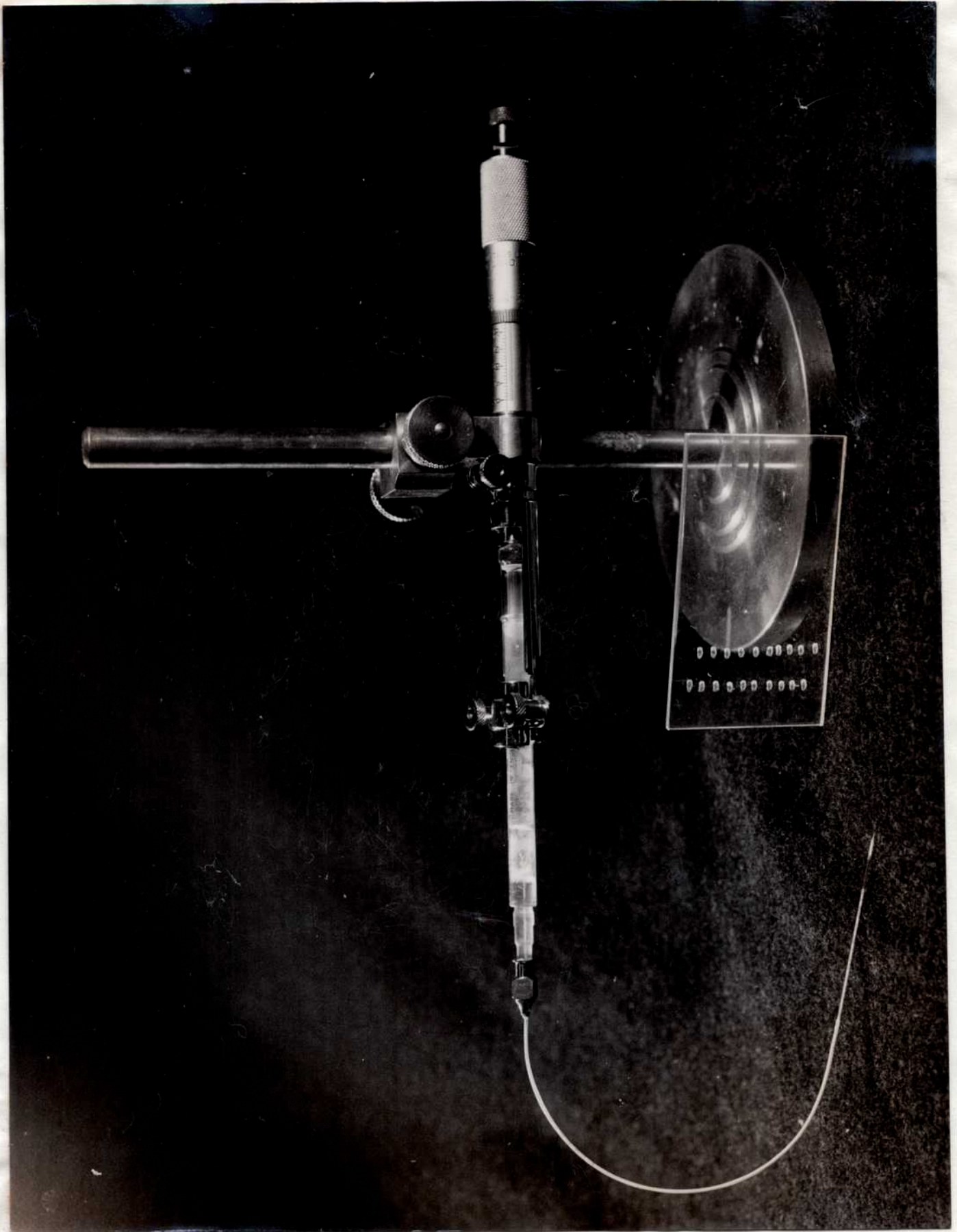


Después de ensayos previos para controlar la tolerancia, se decidieron usar para las experiencias las siguientes concentraciones:



THIO TEPA: trietilene-tiofosforamida, de fórmula estructural:





Después de ensayos previos para controlar la tolerancia se decidieron usar para las experiencias las siguientes concentraciones:

$$1,5 \times 10^{-2} \text{ M}$$

$$3 \times 10^{-2} \text{ M}$$

Ambas sustancias se disuelven en ClNa al 0,4%, isotónico para Drosophila. Las soluciones se usan inmediatamente después de preparadas para asegurar el máximo de eficiencia.

d) Técnica de irradiación:

Se han utilizado dos dosis de irradiación con Rayos X:

1) 400r - 10 mA - 150kV - 1 Cu 1 Al.

2) 800r - 10 mA - 150kV - 1 Cu 1 Al.

Para la irradiación se colocan las moscas en grupos de 50 en pequeños tambores perforados, de polietileno, poniendo cuidado que antes de someterlas a la acción de los Rayos X, no estén bajo los efectos de la esterización.

e) Técnica de subcultivos:

Con el objeto de estudiar la sensibilidad del material hereditario a los agentes mutagénicos, en los distintos estadios de la gametogénesis, se emplea una técnica de subcultivos que permite establecer con bastante exactitud los diversos estados de desarrollo de las gametas.

Consiste en lo siguiente: una vez efectuado un cruzamiento se fracciona la descendencia (por medio de sucesivas transferencias a nuevos tubos de cultivo) con determinados intervalos. De este modo pueden observarse individuos provenientes de células germinales progresivamente más jóvenes en el momento del tratamiento.

1.- En oogénesis:

Utilizando hembras de dos días de edad. Primera transferencia a los tres días, luego tres transferencias con intervalos de cuatro días cada una. Se considera que del primer subcultivo nacen individuos provenientes de oocitos maduros, del segundo y tercero, de oocitos en maduración y los del cuarto de oogonias.

b) Utilizando hembras de seis días de edad. Se limita a 36 horas el período de ovoposición y de esta manera se obtiene descendencia del estado de máximo desarrollo del oocito (estado 14).

2.- En espermatogénesis:

Se fracciona la descendencia en cuatro subcultivos de tres días cada uno. (Al hacer las transferencias se proporciona a los machos nuevas hembras vírgenes cada vez). En el primer subcultivo se recobra esperma que en el momento del tratamiento estaba maduro. En el segundo, esperma que se encontraban como espermátidas, en el tercero esperma que estaba como espermátida temprana y en el cuarto esperma que se encontraba como espermátocitos. En general puede considerarse que hasta doce días después del cruzamiento se recobra esperma postmeiótico (Fahmy y Fahmy, 1955).

f) Cepas Utilizadas

1.- Cepas utilizadas para las experiencias de detección de letales recesivos ligados al sexo, en machos:

"Oregon R": Salvaje

"Basc": $sc^{s1} B In49 w^{a}sc^8$

1.- Cepa utilizada para las experiencias de observación de mutaciones visibles, en hembras:

"Jynd" (no disjuncional)

Cromosomas sexuales de la hembra:

Genes del cromosoma X que será tratado:

y sc^{s1} B In 49 sn^{x2} sc⁸

Genes del otro cromosoma X:

sc^{J1} pn w rb cm ct oc ras v dy g² f od car sw

Cromosoma Y en anillo:

Y^{Lc}

Cromosomas sexuales del macho:

Genes del cromosoma X

y sn⁵ oc v Y^S

Cromosoma Y en anillo:

Y^{Lc}

La cepa se mantiene automáticamente equilibrada, porque los úni
cos individuos fértiles, son iguales a sus padres.

3.- Cepas utilizadas para la experiencia de control de la fertilidad:

"Oregon R"

"Jynd"

4.- Cepas utilizadas para las experiencias de detección de letales
recesivos ligados al sexo, en hembras:

"Basc": sc^{s1} B In49 w^a sc⁸

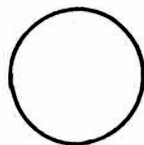
"Sinle": sin letales, ver esquema N° 2

g) Esquemas de los cruzamientos

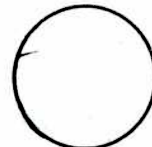
1.- Para observación de mutaciones visibles

P: $y^{sc} S^1 B In49 sn^{X2} se^8$ $X y sn^5 oc v$ Y^{Lc}

$sc^{Ja} pn w rb cm ct^6 oc ras^2 v dy g^2 f od car sw$



Y^{Lc}



Y^{Lc}

F₁: Sólo aparecen hembras de los siguientes fenotipos:

B (iguales a la madre y únicas fértiles)

y B sn

v oc

Sólo aparecen machos de los siguientes fenotipos:

y sn oc v (iguales al padre y únicos fértiles)

B sn

2.- Para mantenimiento de la cepa "Sinle"

Esta cepa permite detectar la aparición espontánea de letales recesivos ligados al sexo y la no disjunción del cromosoma Y.

P: $\frac{+}{y\ sc\ B\ In49\ v}$ X $\frac{+}{B^S}$

F₁: $\frac{+}{+}$ $\frac{y\ sc\ B\ In49\ v}{+}$ $\frac{y\ sc\ B\ In49\ v}{B^S}$ $\frac{+}{B^S}$
 (a) (B) (c) (d)

Si en las hembras de la cepa (+/y sc B In49 v) apareciese espontáneamente un letal recesivo, esto se detectaría inmediatamente porque en el cultivo el macho (d) no aparecería. Por otra parte en

el caso de producirse no disjunción del cromosoma Y, aparecerían hembras B^S (esto se observa ocasionalmente). En ambos casos con descartar los cultivos anómalos, se asegura la exactitud de la experiencia.

Las hembras (a) se usan para los tratamientos, las hembras (b) para mantener la cepa. Los machos (d) para mantener la cepa.

3.- Para detección de letales recesivos ligados al sexo, en machos.

P: $\frac{sc^{S1}B \text{ InS } w^a \text{ sc}^8}{sc^{S1}B \text{ InS } w^a \text{ sc}^8} \times \frac{+}{\text{-----}}$

F₁: $\frac{+}{sc^{S1}B \text{ InS } w^a \text{ sc}^8} \times \frac{sc^{S1}B \text{ InS } w^a \text{ sc}^8}{\text{-----}}$

F₂: $\frac{sc^{S1}B \text{ InS } w^a \text{ sc}^8}{sc^{S1}B \text{ InS } w^a \text{ sc}^8} + \frac{\text{-----}}{sc^{S1}B \text{ InS } w^a \text{ sc}^8} + \frac{sc^{S1}B \text{ InS } w^a \text{ sc}^8}{\text{-----}} + \frac{+}{\text{-----}}$

Cuando se ha logrado inducir una mutación letal recesiva en el macho tratado, el macho salvaje, no aparece.

4.- Para detección de letales recesivos ligados al sexo, en hembras

P: $\frac{+}{\text{-----}} \times \frac{sc^{S1}B \text{ InS } w^a \text{ sc}^8}{\text{-----}}$

F₁: $\frac{sc^{S1}B \text{ InS } w^a \text{ sc}^8}{\text{-----}} \times \frac{+}{\text{-----}}$

F₂: $\frac{+}{\text{-----}} + \frac{sc^{S1}B \text{ InS } w^a \text{ sc}^8}{\text{-----}} + \frac{sc^{S1}B \text{ InS } w^a \text{ sc}^8}{\text{-----}} + \frac{+}{\text{-----}}$

Cuando se ha logrado inducir una mutación letal recesiva en la hembra tratada, el macho salvaje, no aparece.

III- Experiencias y Resultados

a) Tratamientos en machos

En el transcurso de los trabajos realizados sobre inducción de mutaciones en las hembras de Drosophila melanogaster se hicieron dos experiencias para detección de letales recesivos ligados al sexo, en machos, para constatar en los mismos, la acción mutagénica de las drogas usadas. Se usaron machos Oregon R de dos días de edad, que 24 horas después de tratados se cruzaron con hembras "Basc" de acuerdo al esquema de cruzamiento N^o 3.

Tratamiento con MUSTRON: Se inyectaron 100 machos con una solución 4×10^{-2} M, concentración algo inferior a la máxima tolerada. En el total de cromosomas probados en la filial segunda se observó la frecuencia de letales que se indica en la Tabla 2.

Tratamiento con THIO TEPA: se inyectaron 105 machos con una solución $1,5 \times 10^{-2}$ M. La descendencia se fraccionó como se indica en Técnica de subcultivos, para observar el efecto de la droga en espermatogénesis. En el total de cromosomas probados en la filial segunda se observó la frecuencia de letales que se indica en la Tabla 2. En cuanto a la frecuencia de letales obtenidos en cada uno de los sucesivos subcultivos, de la filial segunda, los datos se dan en la Tabla 1.

La figura 1 muestra la variación del rendimiento de mutaciones observadas en este trabajo, comparadas con las obtenidas por Lüers (1959) quién administró esta droga en la comida de machos adultos y

con las obtenidas por Fahmy y Fahmy (1955) quienes inyectaron otra polietilenemina, la Trietilene imino triazina (TEM).

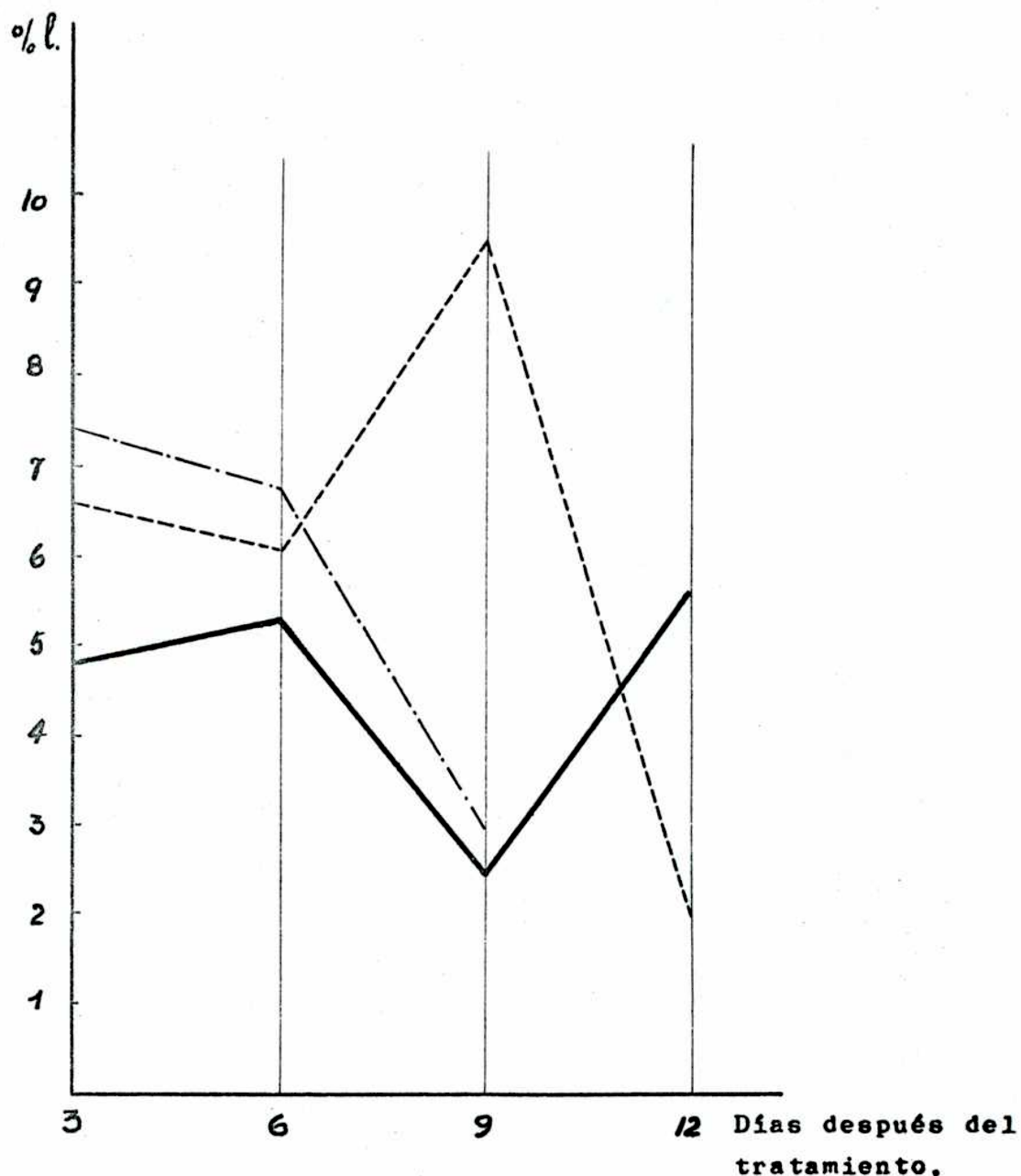
Tabla 1.- Letales recesivos ligados al sexo, inducidos en sucesivos subcultivos de machos por medio de THIO TEPA. ($1,5 \times 10^{-2}M$).

Subcultivo	Nº de cromosomas probados	Nº de letales	% de letales
I	430	21	4,88
II	412	22	5,33
III	523	13	2,48
IV	454	26	5,72

Tabla 2.- Letales recesivos ligados al sexo observados en el total de los cromosomas de la filial segunda de machos inducidos con MUSTRON y con THIO TEPA.

Alquilante	Concentración	Nº de cromosomas probados	% de letales
MUSTRON	$4 \times 10^{-2}M$	953	1,8
THIO TEPA	$1,5 \times 10^{-2}M$	1.819	4,5

Figura 1.- Letales recesivos ligados al sexo, inducidos en sucesivos subcultivos de machos por medio de THIO TEPA y TEM.



————— THIO TEPA inyectado (M B)
----- TEM inyectado (Fahmy y Fahmy)
-.-.-.-.- THIO TEPA en la comida (Lüers)

b) Tratamientos en hembras

A.- Experiencias con MUSTRON

Como los resultados del experimento realizado con machos, que corroboran los obtenidos por Henke, Höne y Künkel (1956) demostraron el efecto mutagénico del MUSTRON sobre los mismos, se planearon experiencias con el objeto de estudiar la acción de esta droga en las hembras, en la inducción de mutaciones visibles y letales recesivas ligadas al sexo.

1.- Mutaciones visibles

Con el objeto de analizar comparativamente la potencialidad mutacional de un determinado número de genes del cromosoma X, cuando se les somete a la acción de un agente alquilante, se utilizó la cepa "Jynd". Esta es una cepa no disjuncional, las hembras tienen dos cromosomas X, uno de los cuales lleva una serie de genes recesivos (que permiten detectar en el otro la aparición de mutaciones inducidas por el tratamiento, en las hembras de la filial primera). El alquilante usado: MUSTRON, se empleó en dos concentraciones: (4×10^{-2} M) y (7×10^{-2} M). Se trataron hembras vírgenes de dos días de edad, se cruzaron con los machos correspondientes (esquema N^o 1) y para observar el efecto del agente inductor en oogénesis se fraccionó la descendencia, según la técnica de subcultivos (a).

Experiencia N^o 1:

Se inyectaron 300 hembras con MUSTRON 4×10^{-2} M. Se observaron 7.800 hembras Bar de la F₁ sin encontrarse ninguna mutación.

Experiencia N^o 2:

Se inyectaron 265 hembras con MUSTRON a 7×10^{-2} M. Se observaron 5.343 hembras Bar de la F₁ sin encontrarse mutación.

2.- Comparación de la fertilidad de las hembras tratadas con MUSTRON con la de las hembras sin tratar

Con el objeto de averiguar si una solución de MUSTRON al 7×10^{-2} M disminuye la fertilidad de las hembras tratadas, se hizo un experimento comparativo utilizando dos cepas: "Jynd" y "Oregon R". De cada una se inyectaron 50 hembras vírgenes de dos días de edad con MUSTRON. Se cruzaron con machos de las mismas cepas poniendo en el caso de "Jynd", machos en exceso para asegurar la fertilización de todas las hembras, pues éstos son algo débiles. Se hicieron los controles correspondientes. Se efectuaron sucesivas transferencias, cada 5 días, para favorecer la ovoposición, abarcándose un período de 32 días. Se hicieron los recuentos de los totales de la F_1 . Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.

Tabla 3.- Recuentos totales de la F_1 de hembras tratadas y de testigos.

Cepas	F_1 de hembras tratadas	F_1 de testigos
Oregon R	4.441	4.673
Jynd	5.497	5.129
Totales	9.938	9.802

Observaciones: Los recuentos parciales de los sucesivos subcultivos no mostraron diferencias apreciables en el número de hijos de las hembras tratadas y de los controles.

Es decir que hay que descartar la posibilidad de que la solución de MUSTRON 7×10^{-2} M (8×10^{-2} M es la concentración máxima tolerada por las hembras) afecte la fertilidad de las mismas.

3.- Mutaciones letales recesivas ligada al sexo

Se trataron hembras "Sinle" de dos días de edad, que se cruzaron con machos "Basc" de acuerdo al esquema de cruzamiento N^o 4. Con el objeto de estudiar el efecto del MUSTRON en distintos estados de oogénesis, se empleó la técnica de subcultivo (a), con un subcultivo adicional para hacer las observaciones más completas. Los resultados obtenidos en la filial segunda se dan en la Tabla 4.

Tabla 4.- Letales recesivos ligados al sexo inducidos en sucesivos subcultivos de hembras de dos días, por medio de MUSTRON 7×10^{-2} M.

Subcultivo	N ^o de cromosomas probados	Letales	% de letales
A	427	-	-
B	519	1	0,19
C	426	-	-
D	317	-	-
E	197	-	-
Totales	1.886	1	0,05

El hecho de que en 1.886 cromosomas probados apareciera un solo letal, indica que la droga no ha indicado mutación, puesto que 0,05 % entre dentro del porcentaje de mutación espontánea.

Los resultados que se obtuvieron, tanto en la inducción de mutaciones visibles, como de letales recesivos ligados al sexo fueron negativos, sin que esto pudiera atribuirse a una acción del MUSTRON sobre la fertilidad de las hembras tratadas. (Tabla 3).

Parker (1960), observó que cuando sometía a la acción de los Rayos X, el oocito en su estado de máximo desarrollo (estado 14, King 1956 - 1957) se producía un marcado aumento en la frecuencia de mutaciones inducidas. Trató hembras de seis días de edad, que tienen en sus ovarios un 13 % de oocitos en ese estado, y limitó a 24 horas el período de ovoposición. Teniendo en cuenta, este dato, se repitió el experimento de inducción de letales con hembras de seis días para investigar si el oocito en el estado 14 es también más sensible a la acción del MUSTRON. Para ello se empleó la técnica (b) de subcultivo. Los resultados obtenidos en la filial segunda, que figuran en la Tabla 5 confirman esta mayor sensibilidad del oocito maduro con respecto a estados anteriores de su desarrollo.

Tabla 5.- Letales inducidos en hembras de dos y seis días por medio de MUSTRON.

	Edad de las hembras	
	2 días	6 días
Concentración	$7 \times 10^{-2} M$	$7 \times 10^{-2} M$
Técnica de subcultivo	(a)	(b)
N.º hembras tratadas	100	185
N.º cromosomas probados	1.886	984
N.º letales	1	6
% letales	0,05	0,60

B- Experiencias con THIO TBPA

Como en el caso del MUSTRON, el efecto mutagénico del THIO TBPA se comprobó primeramente en los machos, (tabla 1). Análogamente a lo realizado con MUSTRON se probó la acción del THIO TBPA en hembras de dos y seis días, en experiencias para detección de letales recesivos ligados al sexo. Los resultados obtenidos (Tabla 6) indican que también en hembras en un eficiente mutágeno. Además, como en el caso del MUSTRON y de los Rayos X el estado 14 presenta mayor sensibilidad a su acción.

Para las experiencias, se trataron hembras "Sinle" de dos y seis días y se procedió de acuerdo al esquema de cruzamiento N^o 4. Los resultados obtenidos figuran en la tabla 6.

Tabla 6.- Letales inducidos en hembras de dos y seis días por medio de THIO TBPA.

	Edad de las hembras	
	2 días	6 días
Concentración	$3 \times 10^{-2} \text{ M}$	$3 \times 10^{-2} \text{ M}$
Técnica de subcultivo	(a) 1er sub.	(b)
N ^o de hembras tratadas	110	400
N ^o de cromosomas probados	415	1.241
N ^o de letales	9	72
% de letales	2,16	5,80

C- Experiencias con Rayos X

Para establecer una comparación con el efecto producido por los alquilantes y por los tratamiento combinados que se detallan más adelante se hicieron dos experiencias de inducción de letales recesivos ligados al sexo, con RAYOS X.

Se trataron hembras "Sinle" de dos y seis días y se procedió de acuerdo al esquema de cruzamiento N^o 4. La técnica de irradiación utilizada es la descrita en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos figuran en la tabla 7.

Tabla 7.- Letales inducidos en hembras de dos y seis días por medio de Rayos X.

	Edad de las hembras	
	2 días	6 días
Dosis	800r	800r
Técnica de subcultivos	(a)	(b)
N ^o de hembras tratadas	100	200
N ^o de cromosomas probados	1.600	1.006
N ^o de letales	-	15
% de letales	-	1,49

D- Tratamientos combinados: Alquilantes y Rayos X

Las radiaciones ionizantes tienen, entre otros efectos, el de aumentar la permeabilidad de las membranas celulares. Teniéndose en cuenta este hecho, se hicieron una serie de pretratamientos con Rayos X, para observar si de ese modo se facilita la penetración de los alquilantes al oocito. Originalmente planeadas para investigar si la escasa acción mutagénica del MUSTRON en las hembras, es debida a dificultades que encuentra esta droga para penetrar en el oocito, las experiencias se extendieron para incluir el THIO TEPA y completar así los datos obtenidos. Los resultados indicaron la conveniencia de realizar experimentos en que la irradiación se hiciera después de administrado el alquilante, pues como puede verse en la Figura 2, los dos alquilantes se comportan en forma muy distinta cuando son empleados en combinación con Rayos X.

Antes de considerar la acción mutagénica de estos tratamientos combinados, es interesante mencionar el efecto que éstos ejercen directamente sobre las hembras tratadas.

a.- Rayos X y MUSTRON. Aun cuando las hembras resisten bien una solución de MUSTRON 7×10^{-2} M, así como también una dosis de 400 u 800r, cuando se combina la acción de ambos agentes, en pretratamientos con radiaciones, muere una elevada proporción de las hembras tratadas. Variando el intervalo transcurrido entre la irradiación y la inyección y manteniendo constante la dosis de MUSTRON se observaron los porcentajes de recuperación que figuran en la tabla 8

En el caso de postratamientos con Rayos X, con un intervalo de 30 minutos entre la inyección y la irradiación la recuperación al-

canzó al 80 % y con un intervalo de 20 horas llegó al 93 %. Es decir que el efecto altamente tóxico de los pretratamientos no se produce.

Tabla 8.- Porcentajes de hembras recuperadas después de un pretratamiento con Rayos X y una dosis de MUSTRON 7×10^{-2} M después de diferentes intervalos.

Nº de hembras tratadas	Irradiación	Intervalo hasta la inyección	% de hembras recuperadas
95	400r	4 horas	27,3
210	800r	4 "	20
83	800r	12 "	46,9
204 ⁺	800r	12 "	60,7
103	800r	16 "	33,9

(+) Hembras de seis días. Todas las demás de dos días.

b.- Rayos X y THIO TEPA. En un pretratamiento con Rayos X, con intervalo de 12 horas hasta la inyección no se observó mortalidad. En los casos de postratamientos la recuperación alcanzó el 92 %, con intervalo de 30 minutos y el 88 % con intervalo de 20 horas.

En todos los experimentos para detección de letales recesivos ligados al sexo, realizados para estudiar el efecto mutagénico de tratamientos combinados, se utilizaron hembras "Sinle" y se siguió el esquema de cruzamiento Nº 4. Se irradió de acuerdo a la técnica descripta en Materiales y Métodos.

1.- Tratamientos combinados: con MUSTRON

a) Pretratamiento con Rayos X.

Se estudió si las diferencias observadas entre hembras de dos y seis días, tratadas con alquilantes solos y con Rayos X también se presentaban en estos tratamientos combiandos. Como puede verse en la Tabla 9 donde figuran los resultados, también en este caso se advierte una mayor sensibilidad del oocito maduro.

Para todas las experiencias se usó la misma concentración de MUSTRON: $7 \times 10^{-2}M$. Para las hembras de dos días, se siguió la técnica (a) de subcultivos, los resultados obtenidos figuran en la tabla. 9.

Tabla 9.- Letales recesivos ligados al sexo inducidos en sucesivos subcultivos de hembras de dos días por medio de un pretratamiento con Rayos X y una dosis de MUSTRON $7 \times 10^{-2}M$ después de diferentes intervalos.

Subcultivo	Irr. 400r Int. 4h		Irr. 800r Int. 4h		Irr. 800r Int. 12h		Irr. 800r Int. 16h	
	Nº crom.	%let.	Nº crom.	%let.	Nº crom.	%let.	Nº crom.	%let.
A	227	1,7	339	1,7	279	2,8	333	1,5
B	296	1,0	384	0,5	305	1,6	278	1,4
C	296	0,3	399	0,2	347	0,2	326	1,2
D	288	-			333	-	325	-

Los resultados de estas experiencias indican que el intervalo óptimo entre la irradiación y la inyección de alquilante es de 12

horas. En los experimentos siguientes se utilizó este intervalo por ser aquél en que se obtuvieron mayores frecuencias de mutación.

En el caso de las hembras de seis días, se siguió la técnica (b) de subcultivos. Los resultados observados se dan en la tabla 10.

Tabla 10.- Letales recesivos ligados al sexo, inducidos en hembras de dos y seis días por medio de un pretratamiento con Rayos X (800r) y una dosis de MUSTRON ($7 \times 10^{-2}M$) con un intervalo de 12 horas.

	Edad de las hembras	
	2 días	6 días
N ^a de hembras tratadas	83	204
N ^a de hembras recuperadas	39	124
Técnica de subcultivo	(a) 1 ^{er} Sub.	(b)
N ^a de cromosomas probados	279	668
N ^a de letales	8	24
% de letales	2,8	3,59

b.- Postratamientos con Rayos X. En estas experiencias se utilizan hembras de seis días de edad, que se inyectaron con MUSTRON $7 \times 10^{-2}M$. Después de un intervalo de 30 minutos en el primer caso, y de 20 horas en el segundo, se irradiaron con una dosis de 800r. Los resultados observados que se dan en la tabla 11, muestran que con el intervalo mayor la frecuencia de letales obtenidos es más elevada.

Tabla 11.- Letales recesivos ligados al sexo, inducidos en hembras de seis días por medio de una dosis de MUSTRON ($7 \times 10^{-2}M$) y un postratamiento con Rayos X (800r) con diferentes intervalos.

	Intervalos	
	30 min.	20 horas
N ^o de hembras tratadas	317	91
N ^o de hembras recuperadas	255	85
N ^o de cromosomas probados	1.067	512
N ^o de letales	12	10
% de letales	1,12	1,95

2. Tratamientos combinados. con THIO TEPA

a.-Pretratamientos con Rayos X. Del mismo modo que se hiciera en los pretratamientos con MUSTRON, se comparó la acción mutagénica ejercida por Rayos X y THIO TEPA, administrados con un intervalo de 12 horas, en hembras de dos y seis días de edad. En este caso, como puede verse en la Tabla 12, no se advierte una mayor frecuencia en las mutaciones inducidas en las hembras de seis días, a diferencia de lo encontrado en todos los casos anteriores. Para todos los experimentos se usó la misma concentración de THIO TEPA; $3 \times 10^{-2}M$.

Tabla 12.- Letales recesivos ligados al sexo, inducidos en hembras de dos y seis días por medio de un pretratamiento con Rayos X (800r) y una dosis de THIO TEPA ($3 \times 10^{-2}M$) con un intervalo de 12 horas.

	Edad de las hembras	
	2 días	6 días
Nº de hembras tratadas	110	110
Técnica de subcultivos	(a) <u>1er</u> sub.	(b)
Nº de cromosomas probados	394	660
Nº de letales	8	15
% de letales	2,03	2,27

b.- Postratamiento con Rayos X. Como se hiciera en los postratamientos con MUSTRON, se utilizaron para estos experimentos hembras de seis días de edad, que se inyectaron con THIO TEPA $3 \times 10^{-2}M$ y se irradiaron con 800r después de un intervalo de 30 minutos en un caso y de 90 horas en el otro.

Los resultados observados, que se dan en la tabla 13, indican que cuando el intervalo transcurrido hasta la irradiación es mayor, se induce una frecuencia de letales marcadamente más elevada.

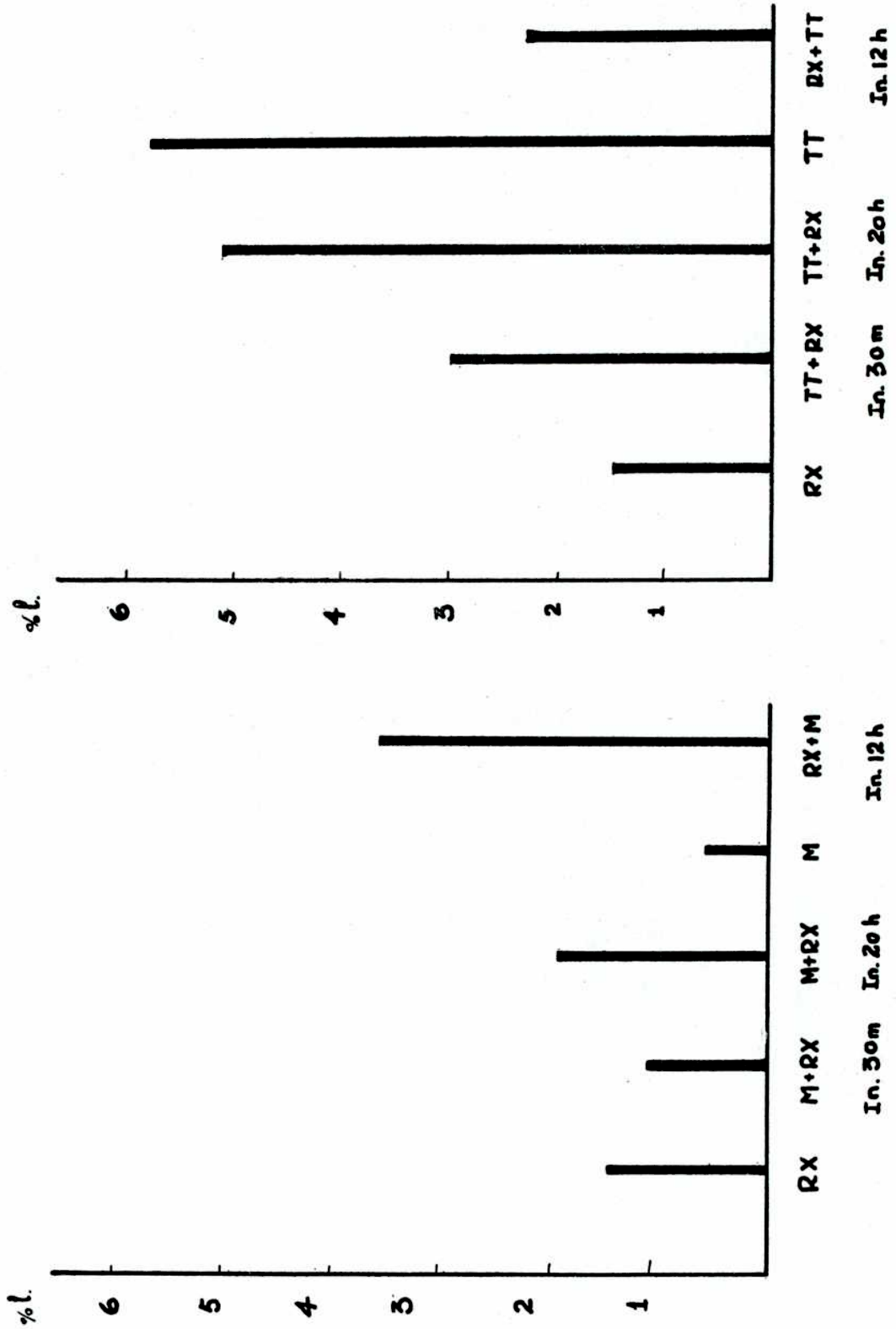
Tabla 13.- Letales recesivos ligados al sexo, inducidos en hembras de seis días por medio de una dosis de THIO TEPA ($3 \times 10^{-2}M$) y un postratamiento con Rayos X (800r) con diferentes intervalos.

	Intervalos	
	30 min.	20 horas
Nº de hembras tratadas	494	180
Nº de hembras recuperadas	456	159
Nº de cromosomas probados	1.510	470
Nº de letales	45	24
% de letales	2,98	5,10

Tabla 14.- Cuadro comparativo del efecto mutagénico de MUSTRON ($7 \times 10^{-2}M$), de THIO TEPA ($3 \times 10^{-2}M$) de Rayos X 800r) y de los tratamientos combinados, sobre el estado 14 del ocito de Drosophila melanogaster.

	Alquilante		Alquilante+Rayos X Intervalo: 30m.		Alquilante+Rayos X Intervalo: 20 horas		Rayos X		Rayos X+Alquilante Intervalo: 12 horas	
	Nacrom.	% let.	Nacrom.	% let.	Nacrom.	% let.	Nacrom.	% let.	Nacrom.	% let.
MUSTRON	984	0,60	1.067	1,12	612	1,96	1.006	1,49	668	3,59
THIO TEPA	1.241	5,80	1.510	2,98	470	5,10	1.006	1,49	660	2,27

Figura 2.- Gráfico comparativo de las frecuencias de letales inducidos en el estado I4 del oocito de Drosophila melanogaster por medio de MUSTRON ($7 \times 10^{-2}M$), THIO TEPA ($3 \times 10^{-2}M$), Rayos X (800r) y tratamientos combinados.



IV- Discusión y conclusiones

Surgen de esta serie de trabajos, algunos hechos evidentes, que se discuten a continuación.

1.- Eficacia mutagénica de MUSTRON y THIO TEPA

Las pruebas de inducción de letales recesivos ligados al sexo, tanto en machos, (tabla 2) como en hembras (tablas 5 y 6) acusan porcentajes más elevados de mutación con THIO TEPA. Las frecuencias de letales observadas en machos concuerdan con las obtenidas por Henke, Höne y Kunkel (1956) con MUSTRON y con las de Lüers (1959) con THIO TEPA. No se conocen otros datos sobre mutagénesis inducida en hembras por medio de alquilantes ya que la mayoría de los trabajos han sido realizados con machos, por lo tanto no pueden establecerse comparaciones con los resultados obtenidos en estas experiencias. Sin embargo se deduce de los resultados observados aquí, que el sexo no establece diferencias entre ambos agentes en cuanto a su eficacia mutagénica, ya que son comparables las frecuencias de mutación obtenidas con cada uno de ellos en machos y en hembras.

2.- Sensibilidad del material hereditario en espermatogénesis al THIO TEPA

El estado del material hereditario varía en forma continua durante los sucesivos estados de la espermatogénesis. Los cromosomas van sufriendo una progresiva condensación, al mismo tiempo que se va reduciendo la cantidad de citoplasma presente, de modo que en el esperma maduro los cromosomas están muy condensados y hay un mínimo de citoplasma.

Es interesante tratar de relacionar estos cambios, con la eficiencia mutagénica que se observa con THIO TEPA, al fraccionar la

descendencia, con el objeto de estudiar células germinales progresivamente más jóvenes en el momento del tratamiento.

Según Fahmy y Fahmy (1958) el hecho de que sustancias pertenecientes al mismo grupo de alquilantes, induzcan el mismo tipo de curva, indica que la respuesta al agente inductor depende del estado del material hereditario durante la espermatogénesis.

La diferente sensibilidad de las células durante ese período, podría deberse a las modificaciones que se producen en los cromosomas. Estas modificaciones traerían aparejadas variaciones en la accesibilidad a los grupos reactivos del ADN. Al mismo tiempo, los cambios en las condiciones físico-químicas de la célula, por ejemplo en el pH, podrían facilitar la reacción entre mutágeno y ADN en determinados momentos.

Si se supone que el THIO TEPA (cuya acción sobre el ADN aun no se conoce) actúa del mismo modo que el TEM (Szybalski, 1960) ya que ambas sustancias pertenecen al grupo de las polietileneiminas, podría esperarse que la sensibilidad del material hereditario durante los distintos estados de la espermatogénesis fuese similar para esos dos agentes. Los resultados observados en este trabajo (Tabla 1) coinciden con los de Lüers (1959), quien administró THIO TEPA en la comida de machos adultos, si bien no llevó sus experiencias más allá del tercer subcultivo. Por otra parte en experimentos realizados con TEM por Fahmy y Fahmy (1955) en las mismas condiciones standard aplicadas al presente trabajo, se dan valores diferentes para subcultivos correspondientes (Figura 1).

Esto significa, que con dos sustancias pertenecientes al mismo grupo, se obtienen curvas de sensibilidad muy distintas, a diferencia de lo encontrado por Fahmy y Fahmy (1958) trabajando con mostaza aminadas, mostazas ácido-carboxílicas y mostazas amino-acídicas. Para cada uno de estos grupos de sustancias hay una curva característica que no es afectada por diferencias menores en la molécula. El caso de TEM y el THIO TEPA indicaría que compuestos pertenecientes al mismo grupo de alquilantes pueden tener distintos tipos de curva. Un caso análogo a éste, estudiado también por Fahmy y Fahmy (1958) es el de los cloroetil y fluoroetil metanosulfonatos, en los cuales las diferencias halladas en la sensibilidad de las células en espermatogénesis se han explicado por la formación "in vivo" de productos mutagénicos secundarios.

Aunque los agentes mutagénicos, pueden alterar el ritmo normal de producción de esperma, las diferencias observadas en tre THIO TEPA y TEM indican que la eficiencia mutagénica de un compuesto no sólo depende del estado del material hereditario si no también de la configuración molecular del mutágeno.

3.- Sensibilidad del material hereditario en oogénesis a MUSTRON y THIO TEPA.

La sensibilidad del oocito en distintos estados de maduración, a los alquilantes empleados, se mide, como en los casos anteriores como frecuencia de letales recesivos ligados al sexo. Los porcentajes observados con THIO TEPA y MUSTRON muestran una sensibilidad marcadamente mayor del oocito maduro (estado 14) con

respecto a estados anteriores de desarrollo. (Tablas 5 y 6) Reproduciendo una experiencia de Parker (1960) se obtuvo un resultado similar en hembras tratadas con Rayos X (Tabla 7). Es posible que pueda atribuirse esta mayor sensibilidad del oocito maduro al estado especial de los cromosomas, en la etapa inmediata anterior a la fertilización.

4.- Efecto de la acción combinada de Rayos X y alquilantes.

Cuando se combina la acción de los alquilantes con la de los Rayos X, se observan notables diferencias con cada uno de los compuestos usados. Estas diferencias pueden atribuirse: 1) a distintos modos de acción de cada una de las drogas con el ADN. 2) a interacciones distintas de cada una con los Rayos X. Debe tenerse en cuenta también, que estos dos mecanismos pueden no ser excluyentes.

Si se considera el primer caso, el MUSTRON actúa por alquilación del N 7 de la guanina; mientras que, como se discutió anteriormente, aunque existen datos sobre la reacción del TBM con el ADN, no se sabe si este mecanismo puede extenderse al THIO TEPA. En el segundo caso, no es fácil explicar la acción compleja de los Rayos X, que se ejerce tanto en forma directa, como indirectamente, a través de compuestos formados después de la irradiación.

a) Efecto combinado de MUSTRON con Rayos X.

Al someter las hembras a un pretratamiento con Rayos X, 12 horas antes de la inyección de MUSTRON (Tabla 14 y figura 2) aumenta sensiblemente la frecuencia de mutaciones con respecto a las obtenidas con cada uno de estos agentes por separado. Por otra parte, un postratamiento con Rayos X, 30 minutos después de

la inyección produce una disminución de mutaciones con respecto a las observadas con radiaciones solamente, y un ligero aumento con respecto a las producidas por el MUSTRON solo. Si se irradian las hembras 20 horas después de inyectadas, el efecto mutagénico aumenta por encima de aquel obtenido con cada uno de los agentes, sin alcanzar al producido por el pretratamiento.

Se sabe que las radiaciones ionizantes aumentan la permeabilidad de las membranas celulares. Este aumento puede producirse por distintos mecanismos. Brinkman y Lamberte (1960) postulan que este aumento de la permeabilidad se debe, en los mamíferos a la despolimerización del ácido hialurónico, por acción directa de las radiaciones o por liberación o activación de hialuronidasa. Es posible que en *Drosophila* actúe un mecanismo similar que al aumentar la permeabilidad de las membranas del oocito permita mayor acceso de la droga al mismo. Es evidente que ese aumento de la permeabilidad debida a las radiaciones debe mantenerse no menos de doce horas para permitir la mayor entrada dealquilante. Es probable que la mortalidad observada en las hembras así tratadas se deba a una mayor difusión del MUSTRON en todo el organismo de la mosca (Tabla 8).

Los resultados obtenidos con los postratamientos podrían explicarse considerando que como el MUSTRON no es un compuesto muy estable, al irradiarse la hembra 30 minutos después de inyectada, la cantidad de droga activa disponible ya ha quedado disminuida en el momento en que la permeabilidad es óptima. Cuando la irradiación se hace después de un intervalo de 20 horas el resultado parecería indicar una suma de efectos, como si los Rayos X y el MUSTRON actuasen independientemente, sobre el cromosoma.

b) Efecto combinado de THIO TEPA con Rayos X.

El pretratamiento con Rayos X, 12 horas antes de la inyección de THIO TEPA produce (contrariamente a lo observado con MUSTRON) u una marcada disminución en la frecuencia de las mutaciones con re respecto a las obtenidas con THIO TEPA solo. Esa frecuencia es de todos modos mayor que la observada en el tratamiento con Rayos X solamente (Tabla 14 y figura 2). Irradiando 30 minutos después de la inyección se observa una frecuencia de mutación algo superior a aquella producida por el pretratamiento. La irradiación 20 horas des pués de la inyección produce un porcentaje de mutación aproximado al producido por el THIO TEPA solo.

Si se considera el aumento de la permeabilidad de las membranas por las radiaciones, la disminución en la frecuencia de mutaciones, frente a las obtenidas con THIO TEPA solo podría explicarse si se tiene en cuenta que como esta droga es un mutágeno muy activo, al facilitar mayor acceso de la misma al oocito podría inducir una cantidad de letales dominantes, en cuyo caso, no se detectarían to dos los letales recesivos. Otra hipótesis (Shubert, 1963) supone que peróxidos formados después de la irradiación inactivan cierta cantidad de THIO TEPA, disminuyendo la cantidad disponible de este agente. Este efecto de los peróxidos, no se ejercería sobre el MUS TRON, porque las mostazas nitrogenadas adquieren en medio fisiológico una forma que las protege de la acción oxidativa de los peró xidos.

Cuando se irradia 30 minutos después de administrado el THIO TEPA, como esta droga es bastante estable, se mantiene en suficiente cantidad para ser inactivada por los peróxidos formados.

Cuando se irradia después de 20 horas, de administrada la droga, es ta inactivación no tendría lugar, puesto que el THIO TEPA ya habría ejercido su acción.

Es interesante notar que en ningún caso el THIO TEPA y los Rayos X producen, en cuanto a letales recesivos ligados al sexo, un efecto aditivo. Ya que no debe descartarse que los Rayos X producen una cantidad de letales recesivos. Si bien existe la posibilidad de que en todos los casos se induzcan letales dominantes, que no permitan detectar todos los recesivos posibles, esto mismo podría suceder en los tratamientos combinados con MUSTRON.

Si bien los resultados observados en toda esta serie de trabajos, no pueden indicar, por la naturaleza de los mismos, cuales son los centros afectados por la alquilación, contribuyen sin embargo a sustentar la idea de que el MUSTRON y el THIO TEPA podrían utilizar mecanismos distintos para ejercer su acción mutagénica.

En resumen, las conclusiones que surgen de esta serie de trabajos son las siguientes:

- 1.- La Polietileneimina THIO TEPA, es un agente mutagénico más eficiente que la mostaza nitrogenada MUSTRON, manifestado tanto en material hereditario masculino como femenino.
- 2.- Se comprobó que la sensibilidad del material hereditario en espermatoogénesis a la acción mutagénica del THIO TEPA, presenta máximos y mínimos característicos.
- 3.- Se comprobó que la sensibilidad del oocito a la acción mutagénica de MUSTRON y THIO TEPA es marcadamente mayor en su estado de madurez (estado 14) que en estados anteriores de su desarrollo.

4.- El efecto diferente de ambos agentes, manifestado cuando éstos se usan en combinación con Rayos X, sugiere la existencia de un modo de acción o interacción distinto de cada uno de ellos.

Bibliografía

- Alexander, P., Cousens, S.F. y Stacey, K.A. 1957- The reactions of the mutagenic alkylating agents with proteins and nucleic acids. Ciba Found. Symp. on Drug Resistance in Microorganisms. 294-318.
- Barron, E.S.G., Bartelst, G.R. y Miller, Z.B. 1948- Effect of N mustards on enzymes and tissue metabolism. I-The effect on enzymes. J. Exptl. Med. 87, 489-501.
- Brookes, P. y Lawley, P.D. 1960- The Reaction of mustard gas with nucleic acids "in vitro" and "in vivo". Biochem. J. 77, 478-484.
- _____ 1961- The reaction of mono and di-functional alkylating agents with nucleic acids. Biochem. J. 80, 496-503.
- Cooper, K.W. 1950- Normal spermatogenesis in Drosophila. En: Biology of Drosophila. Ed. Demerec N.Y. Wiley & Sons Inc. London. Chapman & Hall Ltd. 18-44.
- Fahmy, O.G. y Fahmy, M.J. 1955 b- Cytogenetic analysis of the action of carcinogen and tumor inhibitors in Drosophila melanogaster. IV The cell stage during spermatogenesis and the induction of intra and intergenic mutations by TEM. J. Genetics 53, 563-584.
- _____ 1958- Mutagenicity of alkylating compounds. En: Mutagenic effects of alkylating agents. Discussion. An. N.Y. Acad. Sci. 68, 736-748.
- _____ 1960- Mutagenicity in the sperm of Drosophila and the structure of the "Nitrogen mustard" molecule. Heredity 15, 115-128.
- _____ 1961- Cytogenetic analysis of the action of carcinogens and tumor inhibitors in Drosophila melanogaster X. The nature of the mutations induced by the mesyloxy esters in relation to molecular cross-linkage. Genetics 46, 447-458.
- _____ 1961- Cytogenetic analysis of the action of carcinogens and tumor inhibitors in Drosophila melanogaster. Mutagenic efficiency of the mesyloxy esters on sperm in relation to molecular structure. Genetics 46, 1.111-1.1124.

- Haddow, A., Kon, G.A.R. y Ross, W.C.J. 1948- Effects upon tumors of various haloalkylarylamines. *Nature Lond.* 162, 824-825.
- Henke, H., Höne, G. y Künkel, H.A. 1956- Recessive sex-linked lethals in successive broods of *Drosophila melanogaster* after N-oxide treatment. *DIS*, 116.
- King, R.C., Rubinson, A. y Smith, R.F. 1956- Oogenesis in adult *Drosophila melanogaster*. *Growth* 20, 121-157.
- _____ 1957- Oogenesis in adult *Drosophila melanogaster*. II. Stage distribution as a function of age. *Growth* 21, 95-102.
- Lawley, P.D. y Brookes, P. 1962- Ionization of DNA bases or bases analogues as a possible explanation of mutagenesis, with special reference to 5-bromodeoxyuridine. *J.Mol.Biol.* 4, 216-219.
- Lorkiewicz, Z. y Szybalski, W. 1961- Mechanism of chemical mutagenesis. IV. Reaction between TEM and nucleic acid components. *J.Bacter.* 82, 195-201.
- Loveless, P. y Ross, C.J. 1950- Chromosome alteration and tumor inhibition by Nitrogen mustards; the hypothesis of cross-linking alkylation. *Nature Lon.* 166, 1.113-1.114.
- Lüers, H. 1959- The mutagenicity of THIO TEPA. *DIS*, 145.
- Oster, I.I. y Pooley, E. 1960- A comparison of the mutagenic effects of monofunctional and polyfunctional alkylating agents. *Genetics* 45, 1.004-1.005.
- Parker, D.R. 1960- The induction of recessive lethals in *Drosophila melanogaster* oocytes. *Genetics* 45, 135-138.
- Ross, W.C.J. 1962- Biological alkylating agents. Butterworths, London 5-18.
- _____ 'Warwick, G.P. y Roberts, J.J. 1955- Aryl-2haloalkylamines. XIV. Some compounds possessing latent cytotoxic activity. *J.Chem.Soc. Lond.* 3.110-3.116.
- _____, 1958- "in vitro" reactions of biological alkylating agents. *An.N.Y. Academ. Sci.* 68, 669-681.

- Schubert, J. 1963- Copper and Peroxides in Radiobiology and medicine.
(En prensa).
- Szybalski, W. 1960- The mechanism of chemical mutagenesis with special
reference to TEM action. Develop. Ind. Microb. 1, 231-241.
- Watson, J.D. y Crick, F.H.C. 1953- Molecular structure of nucleic acids.
A structure for Deoxyribose nucleic acid. Nature Lond. 171, 737-738.
- Wood, J.L., Rachele, J.R., Stevens, C.M., Carpenter, F.H. y du Vigneaud V. 1948-
The reaction of some radioactive mustard-type vesicants with pu-
rified proteins. J. Amer. Chem. Soc. 70, 2547-2550.

W. H. K. Meyer Barnett

✓ 1951