

MX 9500013
NIS-mf-14594



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**VALORACION GENOTOXICA DE LA ALEACION
ZINCO MEDIANTE LA PRUEBA DE MUTACION
Y RECOMBINACION SOMATICA EN
Drosophila melanogaster.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
PATRICIA RAMIREZ VICTORIA

**DIRECTORA DE TESIS
DRA. JUDITH ISABEL GUZMAN RINCON**



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE

Jefe de la División de Estudios Profesionales

Facultad de Ciencias

Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron la pasante(s) PATRICIA RAMIREZ VICTORIA

con número de cuenta 8124910-1 con el Título:

VALORACION GENOTOXICA DE LA ALEACION ZINALCO

MEDIANTE LA PRUEBA DE MUTACION Y RECOMBINACION

SOMATICA EN Drosophila melanogaster

Otorgamos nuestro **Voto Aprobatorio** y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de BIOLOGO

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
DRA.	JUDITH ISABEL	GUZMAN RINCON	
Director de Tesis	DRA.	MARIA CRISTINA PIÑA BARBA	
M.en C.	MARIA DE LOS ANGELES	AGUILAR SANTAMARIA	
M.en C.	OLGA OLVERA	RAMIREZ	
Suplente	M.en C.	MARIA EUGENIA HERES PULIDO	
Suplente			

A LA PRESENCIA DE LOS GRANDES MAESTROS
QUE ME HAN GUIADO Y SEGUIRAN GUIANDO
MIS ESTUDIOS, MI PROFESION Y MI VIDA

CON TODC MI AMOR A MIS PADRES:

JESUS RAMIREZ ESPINOSA

MARIA DE LA LUZ VICTORIA ESPINOZA

**POR SU CONFIANZA, APOYO Y COMPRENSION, PERO SOBRE TODO
POR SU EJEMPLO Y CARIÑO QUE SERAN MI GUIA POR SIEMPRE.**

A MIS HERMANOS:

MARIA TERESA

GABRIEL IGNACIO Y EMILIA

MARIA CRISTINA

ADRIANA

LUZ MARIA Y DAVID

CARLOS HORACIO

**GRACIA POR SU CARIÑO, SU APOYO Y LOS GRANDES
MOMENTOS QUE HEMOS COMPARTIDO.**

ALWAYS VICTORY!

CON MUCHO CARIÑO PARA MIS SOBRINOS:

GABRIEL ALFONSO

MICHELLE ISABEL

ALEJANDRA VIOLETA

JESUS DANIEL

POR LA FELICIDAD QUE NOS HAN DADO

**CON MUCHO CARIÑO A LA DRA. JUDITH I. GUZMAN RINCON
POR SU AYUDA, APOYO Y CONFIANZA.**

**GRACIAS POR COMPARTIR CONMIGO SUS CONOCIMIENTOS Y
EXPERIENCIAS QUE HAN ENRIQUECIDO MI CARRERA
PROFESIONAL.**

GRACIAS POR SU INVALUABLE AMISTAD Y CARIÑO

CON ESPECIAL AGRADECIMIENTO Y CARIÑO A:

M.en C. OLGA OLVERA RAMIREZ

BIOL. MA. EUGENIA HERES PULIDO

M.en C. MA. ANGELES AGUILAR SANTAMARIA

DRA. MA. CRISTINA PIÑA BARBA

**POR LOS COMENTARIOS Y SUGERENCIAS QUE ENRIQUECIERON
ESTE MANUSCRITO.**

**A GLORIA MERCADO S. Y GUADALUPE CARRASCO Q.
POR SU SINCERA AMISTAD. GRACIAS POR SU APOYO**

**AGRADEZCO A LA TEC. DORA LUZ BARRON
SU APRECIABLE AYUDA Y ASISTENCIA DURANTE LA
REALIZACION DE ESTE TRABAJO.**

**AGRADEZCO AL IIM DE LA UNAM,
EN ESPECIAL A LA DRA. MA. CRISTINA PIÑA
SU AYUDA EN EN ANALISIS DEL SONICADO DEL ZINALCO.
A LA QUIM. MA. CARMEN LOPEZ (ININ)
SU VALIOSA COLABORACION EN EL ANALISIS
DE ACTIVACION NEUTRONICA.
AL BIOL. FRANCISCO ARENAS H. POR SU
DISPONIBILIDAD EN LA PREPARACION DEL SONICADO**

**AGRADEZCO AL PERSONAL DEL LABORATORIO DE GENETICA
DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES
EL APOYO QUE ME BRINDO DURANTE MI ESTANCIA.**

**AGRADEZCO A LAS AUTORIDADES DEL INSTITUTO NACIONAL DE
INVESTIGACIONES NUCLEARES Y AL LABORATORIO DE GENETICA DE ESTA
INSTITUCION, LAS FACILIDADES OTORGADAS PARA EL DESARROLLO E
IMPRESION DE ESTA TESIS.**

CONTENIDO

RESUMEN

iii

1.- INTRODUCCION

1.1 BIOMATERIALES

1.1.A) Definición.	1
1.1.B) Propiedades.	2
1.1.C) Tipos de biomateriales.	3
1.1.D) Biomateriales metálicos.	3

1.2 BIOCOMPATIBILIDAD

1.2.A) Concepto.	4
1.2.B) Biocompatibilidad de metales.	4
1.2.C) Interacción de los metales en los procesos biológicos.	5
1.2.D) Relación entre biocompatibilidad y toxicidad.	7

1.3 PRUEBAS DE BIOCOMPATIBILIDAD

1.3.A) Legislaciones internacionales que regulan la estandarización de las pruebas de biocompatibilidad.	8
1.3.B) Tipos de pruebas y sus respuestas toxicológicas.	9
1.3.C) Genética Toxicológica.	10
1.3.D) Modelos biológicos empleados para evaluar genotoxicidad.	11

1.4 TOXICOLOGIA DE LOS METALES

1.4.A) Abundancia de los metales en la naturaleza y su relación con los niveles encontrados en los seres vivos.	11
1.4.B) Niveles óptimos y deficiencia de los iones metálicos en el cuerpo humano.	13
1.4.C) Toxicidad de los metales en los organismos vivos y sus principales efectos.	13
1.4.D) Tamaño de partícula y efecto carcinogénico.	15

1.5 GENERALIDADES DEL ZINALCO

1.5.A) Aleación zinc-aluminio-cobre.	17
1.5.B) Principales características y usos del zinalco.	17
1.5.C) Ensayos biológicos con zinalco y su evaluación como	

un posible biomaterial.	18
1.6 <i>Drosophila melanogaster</i> COMO ORGANISMO DE PRUEBA Y EL ENSAYO DE MUTACION Y RECOMBINACION SOMATICA (SMART)	
1.6.A) Características de <i>Drosophila melanogaster</i> .	19
1.6.B) Prueba de mutación y recombinación somática.	22
 2.- O B J E T I V O S	 24
 3.- M A T E R I A L E S Y M E T O D O S	 25
 4.- R E S U L T A D O S	 32
 5.- D I S C U S I O N	 35
 6.- C O N C L U S I O N E S	 40
 7.- T A B L A S Y F I G U R A S	 41
 8.- R E F E R E N C I A S	 67
Apéndice A	75
Apéndice B	77

RESUMEN

La actividad genotóxica de la aleación zinc, aluminio, cobre, Zinalco, fue evaluada mediante la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en las alas de *Drosophila melanogaster*, utilizando las cruzas estandar (E) y de alta bioactivación (AB). Larvas de 72h de edad fueron tratadas crónicamente vía oral con concentraciones de 0, 1, 2, 4, 8 y 16mg de zinalco por ml de agua. El testigo positivo fue CrO₃ al 0.0025mM. El análisis estadístico se hizo mediante el programa de cómputo de Frei y Würgler con P=0.05. Otros aspectos como el tamaño de partícula, así como la ingestión de zinalco administrado fueron evaluados. Teniendo como resultado que el tamaño de partícula obtenido mediante sonificado fue de 16 µm de largo por 5.9 µm de ancho, y no resultó tóxico a las larvas. Además, utilizando la técnica de activación neutrónica se comprobó la ingestión del zinalco en las mismas. Con relación al efecto genotóxico, los tipos de manchas que se analizaron fueron simples (*mwh* o *flr*) pequeñas (1 ó 2 células) y grandes (más de 2 células) y dobles (*mwh* y *flr*). Ninguna de las concentraciones probadas fue genotóxica en las larvas de *D. melanogaster* de ambas cruzas.

INTRODUCCION

1.1 BIOMATERIALES

1.1.1.A) Definición

Los biomateriales son productos sintéticos hechos de metales, plásticos o cerámicos, que entran en contacto con los tejidos durante tiempos prolongados (Williams, 1981a).

El tiempo es un punto importante para distinguir a un biomaterial de un material utilizado sólo por un cirujano o médico (como el acero de un bisturí), en donde sólo hay una interacción breve del material con el paciente, este ejemplo nos muestra que la definición excluye a los materiales que tienen contacto con el tejido por un período de tiempo muy corto, pero incluye a todos los que interactúan más allá de pocas horas. Actualmente, un concepto generalizado precisa a un biomaterial como un material empleado clínicamente para reemplazar (directa o indirectamente) la función de algún órgano o miembro atrofiado del cuerpo, interactuando con el tejido por tiempo prolongado o permanentemente (Elves, 1981).

Uno de los principales aspectos aceptados del concepto de biomaterial es que debe ser diseñado especialmente para el órgano, miembro o cualquier otra estructura biológica con la que estará en contacto.

Los biomateriales son distinguidos de otros materiales por poseer una combinación de propiedades químicas, físicas, biomecánicas y biológicas que los hacen seguros, efectivos y confiables para ser usados en un ambiente fisiológico, el cual

resulta extremadamente adverso para la mayoría de los materiales conocidos. Además deben ser aceptados por el organismo sin causar problemas de rechazo o reacción inmunológica negativa al ser implantados en el cuerpo humano (Williams et al. 1985).

Con la implantación de cualquier sustancia extraña al organismo, se crea una interacción entre ambos. El material puede presentar cambios lentos de degradación debido al contacto con el tejido vivo, que siempre responderá rechazando al cuerpo extraño.

La relación material-sistema biológico, implica la coexistencia entre ambos, con óptimos resultados que dependen por un lado, de un índice mínimo de toxicidad y por el otro, de buenas propiedades biomecánicas (Haudenschild, 1984).

1.1.B) Propiedades

Un buen biomaterial es aquel que cumple con los siguientes requisitos:

- i) Biocompatibilidad.
No causar ningún daño al organismo que lo recibe ni ser dañado por él.
- ii) Estabilidad Química.
Tener mínima sensibilidad a la degradación o corrosión del material.
- iii) Propiedades Físicas y Mecánicas adecuadas.
Tener baja densidad, elevado módulo elástico, resistencia y dureza, entre otras.
- iv) Costo.
Precio accesible a todos los niveles del núcleo poblacional.

De estas características resalta la **biocompatibilidad**. Para su evaluación deben realizarse pruebas tanto *in vitro* como *in*

vivo, para comprobar que el material no sea tóxico, genotóxico o carcinogénico al organismo (Piña, 1992c).

1.1.C) Tipos de Biomateriales

Entre los principales tipos de biomateriales encontramos a los hechos de metales, de cerámicos, poliméricos, compuestos fibrosos y de múltiples combinaciones de materiales, por ejemplo:

Metálicos.- Acero, titanio y sus aleaciones, tántalo, oro, platino y aleaciones de cobalto y cromo.

Cerámicos.- Este tipo de biomaterial está basado en otros materiales como la alúmina, vidrio, fosfato de calcio, carbonato de calcio y circonia.

Poliméricos.- Polisiloxano y polisulfano.

Compuestos Fibrosos.- Basados principalmente en el carbón/carbón y carbón/cerámico.

Combinaciones Múltiples .- Encontramos, por ejemplo, a los que contienen un centro o núcleo metálico recubierto con material cerámico.

1.1.D) Biomateriales Metálicos

Son de gran interés, debido a su naturaleza química y su compleja interacción con los organismos vivos, por este motivo han evolucionado a medida que el hombre a descubierto combinaciones adecuadas para su aplicación.

Williams (1985) refiere la historia de los biomateriales como sigue:

En 1930, The American Iron and Steel Institute (AISI), designó numéricamente diferentes tipos de acero puro para aplicaciones clínicas en implantes, estos son, según catálogo el 302 y 304, posteriormente el 316 y 316L.

En 1936, Howmet Corporation (HC) introduce la aleación cobalto-

cromo-molibdeno (Co-Cr-Mb), que permite realizar formas más complejas y resistentes que las logradas con los aceros. En 1952, HC lanza al mercado la combinación cobalto-cromo-níquel (Co-Cr-Ni), mucho más resistente que la anterior y se usa en sitios donde se requiere la acción de mucha fuerza, por ejemplo en las articulaciones óseas.

El titanio (Ti) y sus aleaciones tienen la característica de presentar densidad y módulo de elasticidad más bajo que otros metales de uso común en implantes, además tienen alta resistencia y baja tasa de corrosión.

El tántalo (Ta), presenta características biomecánicas de mucha resistencia lo que permite su uso para enmendar suturas y elaborar placas craneales.

Todos estos materiales metálicos reúnen las características requeridas para emplearlos como biomateriales.

1.2 BIOCOMPATIBILIDAD

1.2.A) Concepto

Es el término para describir la interacción de un biomaterial con el medio fisiológico en la que no se presentan efectos adversos. El concepto encierra también las interacciones químicas que se dan entre el material y los fluidos con su respectiva respuesta fisiológica (Williams, 1981a).

1.2.B) Biocompatibilidad de metales.

Entre los problemas de **biocompatibilidad de materiales metálicos**, resaltan las interacciones electroquímicas, las relaciones iónicas, partículas insolubles en el tejido y la toxicidad. Por tanto, en este caso, la biocompatibilidad se

determina por el índice de liberación de los iones metálicos del implante, es decir, la tasa de corrosión (desgaste superficial que sucede cuando los metales se exponen a ambientes reactivos) y la probable toxicidad provocada por éstos (West, 1986).

1.2.C) Interacción de los metales en procesos biológicos.

Los tejidos humanos contienen pequeñas cantidades de varios metales, algunos son esenciales para procesos fisiológicos facilitando o controlando cambios bioquímicos específicos a nivel celular.

Un mecanismo relativamente sencillo es aquél en el que los iones metálicos cargados positivamente atraen a las partes negativas de otras moléculas como las proteínas, mediante enlaces que mantienen asociadas a dos moléculas diferentes, o bien, a dos o más partes de una macromolécula. Estas uniones mantienen juntas a las subunidades formando una riqueza multimolecular en los tejidos, como en el hueso o en las fibras musculares. Si los iones se encuentran firmemente asociados a las proteínas, pueden entonces, participar activamente en el metabolismo constituyendo metaloenzimas (De Fernicola y Jauge, 1985).

Estos iones también intervienen en la dinámica de los procesos biológicos, como en las reacciones de tipo reductor. Los metales pueden presentarse en diferentes estados de oxidación, dado que su habilidad para donar o aceptar electrones alternativamente posibilita su función como reductores catalíticos muy importantes (Lehninger, 1982).

La permeabilidad selectiva de las membranas celulares regula la concentración de los iones metálicos dentro y fuera de la célula. Los metales traza encontrados dentro de ésta, siempre están asociados con funciones catalíticas, son requeridos por

las metaloenzimas y las proteínas reductoras, para la formación de su centro activo o como cofactores. Sin embargo, la acumulación local de iones o su deficiencia en el sistema de transporte puede dar como resultado un incremento anormal en sus concentraciones, y en consecuencia ejercer efectos tóxicos al organismo, aunque esta toxicidad puede ser interferida por procesos enzimáticos (Anderson, 1979).

La mayoría de los datos toxicológicos que se tienen, están basados en observaciones hechas después de que una sustancia ha sido administrada al organismo. Sus efectos están relacionados con la toxicidad intrínseca de la misma y con su tasa de absorción (Williams *et al.* 1985).

Entre las rutas de administración de una sustancia tenemos: la ingestión, la inhalación, la absorción dermal, la vía intravenosa, la intramuscular, la subcutánea y la intraperitoneal. La Fig. 1, muestra estas rutas con sus respectivas distribuciones en todo el cuerpo humano (Williams, 1981b).

En este trabajo la aleación empleada se administró vía oral por lo que hubo de tomarse en cuenta que la absorción gastrointestinal de los metales, depende de diferentes factores:

1. Características físicas y químicas del ión.
2. pH del tracto gastrointestinal.
3. Permanencia del metal en el tracto.
4. Concentración y tipo de agente portador del metal ingerido.
5. Interacciones entre los metales metabólicamente similares.
6. Condición fisiológica del organismo.
7. Mecanismos bioquímicos que facilitan la absorción del

ión.

1.2.D) Relación entre biocompatibilidad y toxicidad.

Hay dos aspectos a considerar cuando se compara la toxicidad de sustancias extrañas administradas por diferentes rutas, estas son la **Toxicidad General** y la **Toxicidad Local**.

La **toxicidad general o de sistema**, se refiere a sustancias extrañas que entran al organismo por rutas como la ingestión, inhalación o vía dérmica y que pueden ser absorbidas por membranas celulares, ya sea en la mucosa intestinal, epitelio pulmonar o epidermis. Estas membranas ofrecen varios mecanismos de resistencia (por lo que la tasa de absorción es un factor limitante para la toxicidad). Si una sustancia es incapaz de pasar a través de la pared intestinal cuando es ingerida, puede o no provocar toxicidad en el sistema (aunque fuera citotóxica), pero una vez absorbida al torrente sanguíneo, la sustancia ejercerá sus efectos tóxicos (Williams, 1981b).

Los productos solubles inyectados vía intravenosa o intraperitoneal, se distribuyen rápidamente en el organismo, sin embargo, mediante las inyecciones intramuscular y subcutánea lo hacen muy lentamente. En todos estos casos, la absorción a través de barreras membranales no es necesaria, ya que son productos solubles que circulan libremente en el sistema (De Bruin, 1981).

Un implante intramuscular o subcutáneo elimina las barreras de absorción a través del epitelio u otras entidades membranales que puedan evitar su introducción al torrente sanguíneo, por lo tanto es relativamente fácil que el organismo los excrete (Fig. 1). Esto sucede con los iones liberados por implantes metálicos (Anderson, 1981).

En cuanto a la **toxicidad local**, es específica para una zona del cuerpo, está relacionada con el sitio de implantación de una sustancia o material en el organismo y depende de las características físicas y químicas del implante. Por lo tanto, es relevante comparar la biocompatibilidad de los materiales en diferentes condiciones; implantes en sitios específicos, como lentes en la córnea, dentadura en la mucosa oral, dispositivos en el endometrio, etc. (Williams, 1981b).

Lo anterior nos muestra que hay diferencias entre la toxicidad de un material que ha sido implantado y el administrado por otras rutas. Por lo que es importante que la valoración de la biocompatibilidad de biomateriales se realice mediante diferentes pruebas y a distintos niveles tisulares y celulares para determinar los efectos que provoca.

1.3 PRUEBAS DE BIOCOMPATIBILIDAD

1.3.A) Legislaciones internacionales que regulan la estandarización de las pruebas de biocompatibilidad.

Para la evaluación de biomateriales y su biocompatibilidad es necesaria la colaboración de diferentes disciplinas como la física, la química, la medicina, la biología y la ingeniería. Estas investigaciones interdisciplinarias se están llevando a cabo en muchos países, incluyendo México (Piña, 1992c).

En los Estados Unidos, The American Society for Testing and Material (ASTM-Standard), recomienda una serie de pruebas estandar para valorar la biocompatibilidad de un material, estas pruebas abarcan los eventos más significativos en relación al uso específico del material a evaluar; consideran aspectos físicos como la corrosión, mecánicos y de resistencia, entre otros. Cuando se han cubierto satisfactoriamente los

requerimientos físicos mínimos de biocompatibilidad para un material, es aconsejable realizar estudios, como los biomecánicos y toxicológicos (Williams, 1981a).

La ASTM-Standard y la Sociedad Ortopédica Alemana (DGOT) establecen que los materiales propuestos para aplicaciones ortopédicas deben probarse tanto en tejidos suaves como en tejido óseo, en experimentos a corto y largo plazo, tanto *in vitro* como *in vivo*, los cuales son estimados cualitativa y cuantitativamente. Las respuestas de los tejidos se dividen en reacciones locales y generales. Todos los materiales, independientemente de su estructura (placas, discos, polvos), deberán analizarse para evaluar estas reacciones (Griss et al. 1981).

1.3.B) Tipos de pruebas y sus respuestas toxicológicas

Las pruebas toxicológicas se realizan en sistemas biológicos establecidos en donde se desarrollan ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*.

En los experimentos *in vitro* el material se pone en contacto con cultivos celulares para determinar sus efectos. Es necesario repetir estos experimentos para cada tipo de célula que formará parte del ambiente del material y, aún cuando pase estas pruebas, sólo se puede sugerir que es útil como biomaterial, pues todavía deben realizarse otros tipos de pruebas para confirmar que es biocompatible (Gibbons, 1982).

Los ensayos *in vivo* se llevan a cabo implantando el material a diferentes niveles, subcutáneo, muscular y óseo en animales de laboratorio. Al cabo de varios meses el material se retira y se estudian los efectos que el implante causó al organismo. El tiempo de implantación debe ser al menos de un 20% de la vida media del animal, si después de este tiempo no se detecta daño, puede decirse que es biocompatible, pero este concepto

solamente se aceptará después de una serie de pruebas todavía más severas, como la de estabilidad química, degradación, dureza, resistencia, carga de compresión a la tensión, flexibilidad, etc. (Piña, 1992c).

Los resultados deben compararse con testigos paralelos, uno positivo, que consiste de una sustancia o material tóxico conocido que garantiza la sensibilidad del bioensayo, y otro negativo, en donde al sistema biológico se le agrega una sustancia inocua (Williams, 1985).

Las respuestas de estos bioensayos pueden dividirse en dos niveles de toxicidad:

- a) Citotoxicidad.- Donde se valora el daño a rutas metabólicas, membranas u organelos.
- b) Genotoxicidad.- Daños inducidos directa o indirectamente al genoma celular, provocando mutaciones que incluso pueden generar procesos carcinogénicos o alteraciones en la descendencia.

1.3.C) Genética Toxicológica

La genotoxicidad es estudiada por la Genética Toxicológica. Esta ciencia identifica y analiza la acción directa o indirecta de agentes que modifican los componentes hereditarios de los sistemas vivos. Tiene como objetivo primario detectar las propiedades de un grupo de agentes ("mutágenos") los cuales son altamente específicos para inducir cambios a los ácidos nucleicos, en particular para el ADN, y que producen efectos deletéreos (Brusick, 1988).

Estudios realizados en mamíferos demuestran una correlación entre la carcinogénesis y mutagénesis inducidos por agentes químicos. La genética toxicológica evalúa el daño en el ADN en las dos estirpes celulares, somáticas y germinales (Fig. 2) y tiene como principales funciones 1) desarrollar pruebas y métodos para definir el impacto de los agentes genotóxicos

encontrados en el ambiente, que alteran la integridad del material genético que dará origen a la siguiente generación (efecto en células germinales), y 2) elucidar la relación entre genotoxicidad y la iniciación de la transformación, inducción de tumores ó cáncer (efecto en células somáticas) (Vogel, 1991).

1.3.D) Modelos Biológicos empleados para evaluar genotoxicidad. Para realizar los estudios anteriores se cuenta con modelos animales, que implican el uso de una especie que exhiba una respuesta genotóxica similar a la de humanos bajo condiciones de exposición relativas (Clements et al 1990).

Los mamíferos eran uno de los grupos más empleados para este tipo de pruebas, posteriormente perdieron popularidad con el descubrimiento del complemento S9 microsomal, citocromo P-450, cultivo de células e inclusive pequeños animales de laboratorio, teniendo así nuevas alternativas para la realización de pruebas tanto *in vitro* como *in vivo* (Frölich y Würigler 1991).

De lo anterior podemos concluir que la biocompatibilidad debe ser determinada después de una serie de pruebas que evalúen las diferentes interacciones entre el material en cuestión y el individuo receptor. Las pruebas de genotoxicidad miden un parámetro muy importante de esta relación.

1.4 TOXICOLOGIA DE LOS METALES

1.4.A) Abundancia de los metales en la naturaleza y su relación con los niveles encontrados en los seres vivos.

Como se mencionó en el inciso 1.1.D, los metales tienen gran importancia en la elaboración de biomateriales, sin embargo,

estos pueden resultar de alto riesgo si no se conoce la interacción de su naturaleza química y el medio fisiológico con el que estará en contacto.

La reacción de cualquier molécula receptora con un químico, puede inducir serios efectos como cáncer, mutaciones, toxicidad fetal, reacciones hipersensitivas y necrosis de tejidos (De Bruin, 1981).

Existe una correlación entre los niveles de los metales en el cuerpo, tanto de vertebrados (Tabla 1) como invertebrados y su abundancia en la naturaleza, debido a que durante la evolución, las especies se han adaptado al ambiente desarrollando mecanismos homeostáticos para mantener la relación con ellos; si la concentración excede el nivel máximo tolerable, puede ser considerada como anormal y potencialmente peligrosa (Brusik, 1988). Por esta razón, cuando un implante metálico libera sus iones al tejido, deben de tomarse en cuenta los siguientes aspectos: 1) grado de alteración de los niveles normales del metal en el tejido, 2) efecto de la liberación de estos iones al mecanismo de homeostasis normal y 3) relación entre la toxicidad local y la toxicidad general o del sistema (Williams, 1981b).

De acuerdo con Underwood (1977), 26 de los 90 elementos naturales que conocemos son esenciales para la vida animal, estos incluyen los 11 llamados elementos mayores y 15 son referidos como metales traza o metales menores (Tabla 2). En vertebrados se consideran elementos traza aquellos cuyas concentraciones en los tejidos son menores que las del hierro; esto es diferente para los invertebrados terrestres, porque el nivel de Fe en sus tejidos es menor que los de metales traza conocidos en vertebrados (Hopkin, 1989)

Los elementos esenciales satisfacen los siguientes requisitos: 1) estar presentes en todos los tejidos vivos, siendo un componente esencial de alguna enzima, hormona u otra sustancia biológicamente activa, 2) presentar una concentración claramente constante de una especie a otra, 3) su disminución induce anormalidades fisiológicas y estructurales, 4) estas anormalidades son reversibles cuando se regresa al nivel normal y 5) estas anomalías están acompañadas de cambios bioquímicos específicos (Muntau, 1984).

1.4.B) Niveles óptimos y deficiencia de los iones metálicos en el cuerpo humano.

De acuerdo a los niveles óptimos del metal, su tasa de absorción en el estómago o intestino, rara vez se ve incrementada por el contenido dietético. La Fig. 3, muestra la Ley de Bertrand de la Concentración Nutritiva Óptima de los Elementos Esenciales, en esta se presentan los efectos benéficos en función de la concentración de metales. En cuanto a los elementos no esenciales esta ley no puede ser aplicada, porque estos metales se dividen en 2 categorías: los que son tóxicos aún en cantidades muy pequeñas como el cadmio, mercurio, plomo y berilio, y los que parecen ser fisiológicamente inactivos como el aluminio y el titanio (Hopkin, 1989).

1.4.C) Toxicidad de los metales en los organismos vivos y sus principales efectos.

La toxicidad se manifiesta cuando la concentración de los metales en los tejidos excede los niveles óptimos, que son específicos para cada metal (Newesly, 1991).

En cuanto a sus mecanismos de acción, tenemos que los elementos metálicos mayores ejercen sus efectos a través de una alteración electrolítica y elevada presión osmótica, como el sodio y el potasio, que son tóxicos debido a su capacidad para

formar complejos que interfieren con reacciones bioquímicas vitales, mientras que los metales traza son relativamente tóxicos y su efecto generalmente depende de la naturaleza y cantidad de otros metales presentes (Williams et al. 1985).

El cobre es un metal traza cuya concentración de iones en todo el cuerpo humano es aproximadamente de 1.7 ppm (Francis et al. 1988); su distribución depende de la presencia de otros metales en los tejidos y su concentración parece mayor en el hígado y en los tejidos adyacentes, su saturación en animales, ocasiona hepatitis o cirrosis seguida de una anemia aguda. Este efecto se desconoce en el hombre, excepto en el caso de la enfermedad de Wilson, genéticamente transmitida por un error metabólico que afecta la homeostasis del cobre (Mello-Filho y Meneghini, 1991).

Entre los elementos no esenciales se encuentra el aluminio. La toxicidad de este metal es poco conocida (Olive et al. 1991). En altas concentraciones puede interferir con la absorción de fosfato, produciendo un complejo de aluminio-fosfato en el intestino, causando un decremento en ATP y un incremento en ADP y AMP (Leonard y Gerber, 1988). La hemodiálisis ha sido asociada con la toxicidad del aluminio en algunos lugares en donde el agua usada en la diálisis tiene una alta concentración de estos iones (Kumar et al. 1990).

GENOTOXICIDAD

Ya que muchos de los metales traza son utilizados para la fabricación de biomateriales, es importante tomar en cuenta dos conceptos: el daño en el genoma inducido por el metal (genotoxicidad) y la alergia a los mismos (Pilliar et al. 1982).

La genotoxicidad de metales implica los efectos mutagénicos y carcinogénicos provocados por éstos. En los últimos años se ha

incrementado el interés por investigar el papel que juegan los iones metálicos en la inducción de tumores.

Según Sunderman (1977), cuatro metales (arsénico, cadmio, cromo y níquel) han sido identificados como carcinógenos para los humanos. El berilio, cobre, fierro, plomo, titanio y zinc, se han reportado como inductores de tumores en experimentos con animales.

Recientemente la atención se ha enfocado a las interacciones metal-ácido nucleico. Al respecto, Mello-Filho y Meneghini (1991), demostraron que el arsénico inhibe el aumento de la metil-timidina en cultivos de fibroblastos, obstruyendo la síntesis del ADN. Asimismo comprobaron que numerosos tipos de iones metálicos producen ineficiencia en la duplicación del ADN *in vitro*.

Los diferentes mecanismos de genotoxicidad, muestran que los iones metálicos tienen un papel significativo en la inducción de tumores por medio de sus relaciones con enzimas y probablemente con ácidos nucleicos, siendo potencialmente capaces de propiciar la formación de un tumor por medio de un implante (Williams, 1981b).

Por otro lado, la alergia que pueden provocar los metales frecuentemente se manifiesta como dermatitis. La sensibilidad a estas alergias, alerta al sistema inmunológico del cuerpo formando un anticuerpo. La presencia de iones metálicos liberados por el implante alrededor del tejido y su capacidad para ligarse con proteínas, proporciona condiciones para dar una reacción de rechazo por los tejidos (Haudenschild, 1984).

1.4.D) Tamaño de partícula y efecto carcinogénico.

Un aspecto importante en las reacciones toxicológicas de un metal, es el tamaño de partícula liberada en el cuerpo por un

implante.

Al respecto, se tiene información de bioensayos realizados para determinar la toxicidad que produce el tamaño de partícula de metal, asbestos u otros, y su relación con la inducción de tumores y procesos cancerosos.

Aeropartículas asociadas a compuestos de hidrocarburos aromáticos policíclicos de tamaño promedio de $10\mu\text{m}$, administradas por inhalación, resultaron ser genotóxicos para *Drosophila melanogaster* (Delgado et al. 1994).

Respecto a asbestos, partículas de tamaño $0.1\mu\text{m}$ a $0.5\mu\text{m}$ ocasionan fibrosis en ratas (Wagner, 1974).

Estudios realizados en ratas, inyectando vía intravenosa partículas de Al_2O_3 (alúmina) de $20\mu\text{m}$, produjeron una proliferación de células de von Kupfer en el hígado sin que causaran daño al organismo. Es importante mencionar que la alúmina se emplea como un biomaterial en implantes ortopédicos y dentales (Griss et al. 1981).

La alúmina implantada subcutáneamente en ratones, no revela ninguna respuesta inflamatoria o reacción progresiva en fibroblastos aún después de 5 meses. En este caso el tamaño de partícula administrada era de $0.5\mu\text{m}$ a $5\mu\text{m}$ (Griss et al. 1981).

La aleación Co-Cr-Mb inyectado en músculo de rata, provocó una incidencia de tumores en el 28% de los organismos puestos a prueba (22 de 80). El tamaño de partícula determinado fue de $0.1\mu\text{m}$ a $5\mu\text{m}$. En estudios posteriores se observó que la incidencia varía en las distintas cepas de ratas y otros animales en los que fue probado (Williams, 1981b).

El implante de fibra de vidrio en pleura de ratas, evidenció

que partículas mayores de $8\mu\text{m}$, tienen gran probabilidad de inducir un sarcoma pleural. En este caso la incidencia está directamente relacionada con el tamaño de la partícula (Williams, 1981b).

Tomando en cuenta estos antecedentes, no existe realmente un tamaño promedio de partícula que pueda decirse en general, que sea tóxica, ya que esto dependerá principalmente de la naturaleza y características del material (Pedley, 1981).

1.5 GENERALIDADES DEL ZINALCO

1.5.A) Aleación Zinc-Aluminio-Cobre

En 1976, se inició un programa de investigación en el Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM) de la UNAM sobre las propiedades del zinc y sus aleaciones con el objetivo de desarrollar nuevos campos de aplicaciones para este metal, del cual México es un gran productor (6° lugar a nivel mundial). Los resultados de las investigaciones condujeron más tarde al desarrollo de una nueva aleación llamada zinalco (Torres-Villaseñor, 1988).

El zinalco es una aleación eutectoide del Zn-Al (78% y 20%) modificada con Cu (2%) (Negrete *et al.* 1990) la cual presenta características físicas y mecánicas muy particulares (Tablas 3 y 4) (Torres-Villaseñor *et al.* 1990).

1.5.B) Principales características y usos del zinalco

Una de las propiedades más sorprendentes de esta aleación es la de comportarse como un plástico (característica de superplasticidad), ya que puede laminarse fácilmente y tiene excelentes cualidades para la forja, incluso mejores que las del latón. Su resistencia a la compresión es muy alta (del

orden del 65% mejor que la del Cu) antes de que presente grietas el material (Saenz et al. 1992). En suma, tiene las propiedades mecánicas adecuadas para usarse como material ortopédico (Piña et al. 1992b).

Debido a sus características, el zinalco ha suscitado un gran interés para valorarlo como un posible biomaterial (Piña et al. 1992a).

Al respecto, la UNAM a través de un programa general multidisciplinario, ha realizado investigaciones a nivel citotóxico en implantes de zinalco.

1.5.C) Ensayos biológicos con zinalco.

En 1991, Hernández y col. realizaron pruebas a corto plazo en cultivos de tejidos *in vitro* de fibroblastos y macrófagos. Al término de éstas no se observaron efectos de citotoxicidad en las células.

Ensayos realizados en linfocitos humanos por Aguilar y col. (1994), mostraron resultados negativos en cuanto a la citotoxicidad provocada por el zinalco en estas células.

Con respecto a la biocompatibilidad de la aleación, se efectuaron ensayos *in vivo* en animales de laboratorio, llevándose al cabo 2 experimentos. El primero consistió en implantar subcutáneamente placas rectangulares de 15x8x1mm de zinalco tal y como se produce en el país, en 5 ratas de la cepa Wistar. El tiempo de implantación fue de 6 meses, durante los cuales no se detectaron reacciones de rechazo en la piel y los organismos presentaron buena salud. Posteriormente, se sacrificaron las ratas y se retiraron las placas, éstas presentaron corrosión debido a la presencia de Fe' en la aleación (Piña et al. 1992b).

En el segundo experimento, se obtuvo el zinalco libre de impurezas, se trabajó con 30 ratas de la cepa Wistar, a 12 se les implantó el material a nivel subcutáneo, 12 a nivel muscular y 6 se mantuvieron como grupo testigo durante 4, 6 y 8 meses.

Los niveles de Zn y Cu en la sangre fueron prácticamente iguales en los grupos testigo y experimental. Se analizó la respuesta local del organismo al implante en los tejidos aledaños al mismo, se realizaron estudios histopatológicos a los órganos y tejidos susceptibles de sufrir daño por productos de corrosión liberados al torrente sanguíneo, no encontrándose efecto alguno. Se ha determinado que la velocidad de corrosión del material en suero es de 0.0075mm por año (Piña et al. 1992b).

De lo anterior se concluyó que el material no es tóxico al organismo y que el zinalco cumple con los requisitos de compatibilidad, por lo que se le ha valorado como un posible biomaterial.

Por otro lado, para evaluar los efectos genotóxicos *in vivo* del zinalco o de cualquier otro material o sustancia, es necesario contar con un sistema de prueba eficaz y confiable que nos permita evidenciarlo. Por esta razón, para el presente trabajo de tesis se eligió a *Drosophila melanogaster* como organismo de prueba por las características que a continuación se detallan.

1.6 *Drosophila melanogaster* COMO ORGANISMO DE PRUEBA Y EL ENSAYO DE MUTACION Y RECOMBINACION SOMATICA (SMART).

1.6.A) Características de *Drosophila melanogaster*.

Constantemente se implementan diferentes sistemas de prueba

para llevar a cabo estudios de mutagénesis y carcinogénesis, entre ellos los bacterianos y los de mamíferos de talla pequeña (ratones y conejos) son los más utilizados.

Los mamíferos están más relacionados fisiológicamente con el hombre, las pruebas *in vivo* pueden detectar rompimientos cromosómicos, mutaciones génicas y no disyunción. Sin embargo, el tiempo requerido así como el costo de este tipo de estudios, dificultan su realización (Victorin et al. 1990).

Los microorganismos ofrecen la ventaja de poder detectar mutaciones génicas con rapidez, ser económicos y tener alta sensibilidad. Los sistemas huésped-intermediario permiten además que se realice la activación metabólica *in vivo* de algunos mutágenos, sin embargo, las conclusiones obtenidas con este sistema, deben ser confirmadas en organismos pluricelulares, con metabolismo similar al del humano y en este sentido *Drosophila melanogaster* presenta algunas ventajas (Zordan et al. 1991).

Utilizada durante muchos años en estudios de genética básica, la *Drosophila* se ha constituido como uno de los organismos más adecuados para realizar experimentos sobre los efectos genéticos de diferentes mutágenos, ya que no solamente permite estudiar variaciones hereditarias, sino que además se han desarrollado técnicas que garantizan la existencia de muestras homogéneas en poblaciones celulares meióticas en algunas de las etapas sucesivas en su ciclo de vida, lo que permite utilizarlas como un indicador de daño genético (Guzmán et al. 1990).

En la actualidad, el sistema *Drosophila* está considerado como un bioensayo rutinario para detectar mutágenos, en parte, su utilidad se apoya en el conocimiento que se tiene acerca de su biología y desarrollo (Getz y Van Shaik, 1991).

Entre las ventajas de este organismo como sistema de prueba está la posibilidad de tener gran cantidad de individuos en espacios reducidos y ser un sistema eucariote que permite verificar la presencia de daño genético *in vivo* en un período de tiempo corto, ya que su ciclo de vida es proximalmente de 10 días a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (Ramos et al., 1993), por lo que el espectro de valoración de riesgo genético que es detectado con el uso de este insecto es muy amplio (Katz y Foley, 1993).

Otra ventaja, es que *Drosophila* puede realizar la mayoría de las funciones enzimáticas que se efectúan en los microsomas del hígado humano, lugar donde se activan gran cantidad de los carcinógenos y mutágenos indirectos. El retículo endoplásmico, es considerado el responsable del metabolismo de drogas y pesticidas en insectos; las enzimas involucradas tienen acción de oxidasas y se caracterizan por carecer de especificidad al sustrato, tal como ocurre en el hígado de mamíferos (Frölich y Würzler, 1989, Guzmán y Graf, 1995).

Drosophila es un organismo holometábolo, porque tiene metamorfosis completa, se inicia con el huevo y atraviesa por varios estadios larvales y la pupa, hasta llegar al imago o adulto (Fig. 4). La mosca adulta surge en gran parte de grupos de células denominadas imagales, que se encuentran en los estadios larvales, organizadas en paquetes llamados discos imagales. Los discos son bolsas epiteliales que durante la metamorfosis se evaginan y diferencian para formar las estructuras del adulto (Fig. 5) (Graf et al. 1984).

Si durante el proceso de diferenciación de las células de los discos, ocurre una alteración heredable, éstas darán origen a una estirpe celular con la misma característica alterada originando así un clon que será observado como una mancha en la estructura imagal correspondiente si se emplean los marcadores fenotípicos adecuados (Van Shaik y Graf, 1993).

Debido a que se han detectado y caracterizado mutaciones en *D. melanogaster* que alteran la diferenciación final de las células que darán origen a los tricomas, es posible utilizarlas como marcadores fenotípicos (Graf et al. 1990).

1.6.B) Prueba de mutación y recombinación somática (SMART).

El ensayo SMART tanto de ojo como de ala en *Drosophila* se basa en la expresión de mutaciones recesivas en células somáticas de organismos heterocigóticos originándose por la pérdida de heterocigocidad. En el ensayo del ala se presenta fenotípicamente como una mancha sobre la cutícula del ala en el adulto.

SMART permite detectar cambios ocurridos en las células de los discos imagales de ojos (Rodríguez-Arnaíz y Hernández, 1994) y alas (Howe y Clements, 1990, Negishi et al. 1991, Tripathy et al. 1989) de los organismos adultos. De esta manera detecta la actividad genotóxica de agentes químicos que inducen diferentes tipos de mutaciones además de recombinación mitótica (Graf et al. 1990, Manguson y Ramel, 1990).

Una de las ventajas más importantes de esta prueba es que solamente se necesita una generación de *D. melanogaster* para la obtención de resultados, también permite conocer si los compuestos evaluados tienen un efecto directo (mutágeno) o indirecto (promutágeno).

Con el objeto de conocer la actividad de los promutágenos (compuestos que requieren activación del citocromo P450 para que sus formas mutagénicas puedan ligarse al ADN y actuar como mutágeno), Frölich y Würigler (1989 y 1991) construyeron dos nuevas líneas que incluyen a los cromosomas 1 y 2 de la línea Oregon R(R) resistente al DDT la cual se caracteriza por tener niveles elevados de éste citocromo, esperando que la respuesta genotóxica de esta línea sea mayor por la actividad de esta

monooxidasa (Graf y Van Shaik, 1992).

Por lo tanto, basándose en los antecedentes mencionados y teniendo en consideración la capacidad de respuesta del bioensayo SMART para evaluar efectos genotóxicos, surgió el interés de valorar la genotoxicidad del zinalco como un aspecto más dentro de un macroproyecto multidisciplinario en el cual, uno de los principales objetivos es analizar el potencial de esta aleación como un biomaterial.

Los resultados de su evaluación citotóxica e histocompatibilidad sugieren el planteamiento de las siguientes hipótesis:

H_0 = El zinalco no produce efectos genotóxicos en larvas de *D. melanogaster*.

H_A = El zinalco produce efectos genotóxicos en larvas de *D. melanogaster*.

Para tal propósito se plantearon los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

GENERAL

- 1.- Evaluar el efecto genotóxico del zinalco para su uso potencial como un posible biomaterial.

PARTICULARE.

- 1.- Determinar utilizando la técnica de microscopía electrónica, el tamaño de partícula del zinalco que pueda ser ingerido por las larvas.
- 2.- Cuantificar la ingestión del zinalco administrado en larvas de *D. melanogaster* mediante el análisis de activación neutrónica.
- 3.- Evaluar la genotoxicidad del zinalco por medio de la prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART).

MATERIALES Y METODOS

En el apéndice A se enlistan los materiales utilizados.

El cronograma general de los métodos seguidos en este trabajo de tesis, está representado en la Fig. 6.

En previos experimentos realizados al que se describe, se emplearon partículas de zinalco con un diámetro de 25 a 50 μ m que resultaron ser tóxicas a las larvas de *D. melanogaster* posiblemente por la obstrucción de conductos internos, por lo que se procedió a fraccionar estas partículas mediante el método de sonicación.

SONICACION DEL ZINALCO

El método consiste en que las ondas continuas producidas por la corriente eléctrica en el agua, inducen una alta vibración que provoca que las partículas se fracturen haciéndose más pequeñas (Aoki et al. 1984).

Se depositaron en 6 tubos de ensayo las siguientes cantidades 0, 45, 90, 180, 360 y 720mg de zinalco en 45ml de agua cada uno dentro del aparato sonicador.

El tiempo de sonicación fué de 3 horas (este período se determinó en experimentos previos realizados por Aguilar y col. [comunicación personal] en los que se observó que en este tiempo se producen partículas de zinalco con un tamaño menor a las 5 μ m, adecuado para realizar experimentos de citotoxicidad en linfocitos). Cada 10 min. durante las 3h de sonicación, se agitaron los tubos para que la muestra quedara suspendida. De este modo se logró que la sonicación fuera homogénea.

Posteriormente, parte del zinalco se analizó por microscopía electrónica para determinar el tamaño de partícula obtenido por

la sonicación. Este análisis se realizó en el Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM.

BIOLOGICOS

Se utilizaron las siguientes líneas progenitoras:

- a) *flr'*/TM3,Ser
- b) *ORR1/ORR1;ORR2/ORR2;flr'*/TM3,Ser
- c) *mwh/mwh*

Obtención de hembras vírgenes y machos.

Para realizar las cruzas se procedió a esterizar a los organismos, observarlos en el microscopio de disección, se aislaron a las hembras vírgenes de las líneas *flr'*/TM3,Ser y *ORR/ORR;flr'*/TM3,Ser, así como machos *mwh/mwh*, aproximadamente cada 6h puesto que alcanzan su madurez sexual a las 8h después de nacer (Rodríguez-Arnaiz y Ramos, 1992).

Cruzas

- 1) ♀♀ *flr'*TM3,Ser x ♂♂ *mwh*, craza estándar (E)
- 2) ♀♀ *ORR1/ORR1;ORR2/ORR2;flr'*TM3,Ser x ♂♂ *mwh*, craza de alta bioactivación (AB).

Obtención de larvas

72h después de realizadas las cruzas, se colectaron los huevos colocando a los progenitores en frascos con medio fresco durante 6h, después de las cuales fueron removidos. Los adultos y los huevos fueron incubados a 24°C. 3 días después se separaron las larvas empleando el método de Nöthinger (1970), el procedimiento se basa en la formación de un gradiente de densidad que hace que las larvas que se encuentran en el frasco, floten separándose del medio de cultivo, disminuyendo así el efecto de manipulación. Para protegerlas de la alta osmolaridad, se utilizó una solución de sacarosa al 20%.

Diseño experimental

Los tratamientos se administraron a larvas transheterocigas de 72 hrs. de edad resultantes de las cruza antes mencionadas.

La edad es un factor importante puesto que de ella depende el número de células blanco y el tamaño del clón producido. Se ha comprobado que un clón es más grande cuando se induce en larvas jóvenes, en ese caso, los individuos adultos mostrarán pocas manchas que tendrán gran tamaño debido a que en larvas juvenes, el número de células que forma el disco imagal es pequeño, pero las células se dividen varios ciclos. Si el tratamiento se aplica a larvas de mayor edad, el clón es más pequeño y las manchas más numerosas, porque el número de células blanco es mayor pero pasan por menos ciclos de división (Würgler y Graf, 1990).

Es importante señalar que previo a cualquier ensayo de valoración genotóxica a través de SMART-ala, se debe seleccionar el protocolo adecuado, tanto para la ruta de administración como para la edad larval al momento de realizar el experimento (Graf et al. 1992).

El protocolo seleccionado (Fig. 7) consistió en la exposición crónica por vía oral de las larvas del segundo estadio durante 48h. El tratamiento se administró a larvas procedentes de las cruza estándar y alta bioactivación en experimentos que se corrieron paralelamente.

Las larvas, se dividieron en 7 grupos con igual número de individuos y fueron colocadas en tubos homeopáticos con 1.5g de medio de cultivo sintético para *Drosophila* reconstituído con 5ml de agua conteniendo al zinalco en concentraciones de 0, 1, 2, 4, 8 y 16mg/ml de agua. Al séptimo grupo se le administró una solución de CrO_3 0.0025mM y fué el control positivo por su efecto genotóxico descrito en *Drosophila melanogaster* por

Olvera et al. (1993). finalmente los tubos se taparon con tapones de poliuretano y se incubaron a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 30h y otras durante 8 días.

Las larvas incubadas por 30h se analizaron por medio de activación neutrónica para cuantificar la ingestión del zinalco.

Esta técnica se encuentra entre los cuatro principales métodos más efectivos e importantes que se utilizan para determinar la concentración de metales en los tejidos de invertebrados terrestres (Tabla 5). Ha sido empleada para el análisis de arsénico en ortópteros y de distintos elementos en la lombriz de tierra (Hopking, 1989).

Algunas de sus ventajas son que los organismos se analizan sin previa degradación o descomposición de los mismos, las interferencias químicas son despreciables, bajo ciertas condiciones es posible analizar el material en vivo, y tiene una gran capacidad de detección (Matsumoto y Fuwa, 1986).

La técnica consiste en irradiar a las larvas empleando neutrones térmicos de un reactor. Al ser irradiadas, los núcleos de los elementos que componen el material (Zn-Al-Cu) capturan neutrones y se convierten en radionúclidos, los que al decaer emiten radiación, ésta se evalúa empleando un sistema de espectrofotometría gamma, determinando así la cantidad de estos elementos en el organismo (Matsumoto y Fuwa, 1986).

Este estudio se realizó en el Centro Nuclear de México en el reactor Triga Mark III tipo piscina de uranio, enriquecido con un flujo nominal de $1.3 \times 10^{11} \text{ n/seg cm}^2$.

Para determinar la genotoxicidad, al terminar el período de exposición (8 días después), los adultos que emergieron fueron

conervados en alcohol al 70%. Posteriormente se procedió a separarles las alas y montarlas en preparaciones permanentes con solución Fauré para su análisis al microscopio (Graf et al. 1994).

La descripción de los marcadores involucrados es la siguiente:

a) *mw*: "multiple wing hair" (pelos múltiples en el ala)

La línea portadora de este genotipo, se reconoce fenotípicamente porque expresa una alteración en el número de tricomas por célula en el ala, llegando a presentar de 2 hasta 5 en lugar de 1, como sería en el fenotipo silvestre (Fig. 8). Este locus se localiza en el cromosoma 3 a 0.0 unidades de mapa (Sierra et al. 1991).

b) *flr*: "flare" (pelos en forma de flama). Se reconoce por la presencia de tricomas en forma irregular en el tórax y el abdomen (Fig. 9 y 10). Se ubica a 39 unidades del mapa sobre el cromosoma 3, y en condición homóciga es letal, por lo tanto, para mantener esta línea, se necesita la presencia de un cromosoma balanceador con inversiones múltiples, (*TM3*), que además porta el marcador dominante "serratia" (*Ser*), el cual permite el reconocimiento fenotípico de la línea *flr'*/*TM3Ser*, por la expresión de "serratia" (alas con bordes discontinuos). El marcador *Ser*, es también letal en condición homocigota, por lo que la descendencia de la línea está formada por individuos heterócigos para los marcadores *flr'* y *Ser* (Fig. 11), es decir, individuos *flr'*/*TM3Ser* (Lidsley y Zimm 1992).

c) *ORR1* y *ORR2*: Estos marcadores están presentes en el primero y segundo cromosoma de la línea Oregon R(R), y presentan una mayor actividad metabólica dependiente del complejo microsómico P-450 (Frölich y Würzler, 1989), el incremento de su capacidad metabólica se debe al gene RI, ubicado en el cromosoma 2, a 65.0 unidades de mapa.

Es importante mencionar que estos marcadores son los que se observan cuando se analizan los resultados, determinándose cada clón de acuerdo con los siguientes criterios (Graf et al. 1984):

1) Ubicación en el ala.- Debe anotarse de acuerdo con el sector del ala predeterminado en un mapa, donde la región distal queda dividida en siete secciones: A,B,C,C',D,D' y E (Fig. 12, García- Bellido y Merriam, 1971).

2) Tamaño de las manchas.

- a) Pequeñas de 1 o 2 células afectadas.
- b) Grandes con 3 o más células afectadas.

3) Fenotipo de mancha.

- a) Pequeñas simples con fenotipo *mwh* o *flr'*.
- b) Grandes simples con fenotipo *mwh* o *flr'*.
- c) Dobles o gemelas con fenotipo *mwh* y *flr'* en un area adyacente.

REGISTRO DE DATOS

Cuando una larva es tratada con algún compuesto, podemos evidenciar su efecto genotóxico al analizar las estructuras de la mosca adulta, en este caso, l.s alas. De las cruza desarrolladas en este trabajo, se produjeron dos tipos de descendientes: los que presentan alas de tipo "serratia" (*mwh/TM3,Ser*) y los que presentan alas normales (*mwh/flr'*), en este caso sólo se analizaron las del tipo normal.

El análisis se llevó a cabo en un microscópio óptico marca Zeiss a 40x aumentos analizando ambas superficies del ala.

El total de manchas se analizan por separado. Sin embargo, se debe considerar que aunque la mayoría de los clones grandes son continuos, algunos pueden presentar interrupciones debido a la

separación parcial de las células del clon durante el desarrollo por presiones tisulares o movimientos independientes. Por lo tanto, se contabilizan como clones independientes aquellos que se encuentren separados por tres hileras o más de tricomas normales (Würgler y Graf, 1990).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL SISTEMA SMART.

Frei y Würgler (1988) publicaron una comparación de métodos estadísticos para decidir a través de la prueba de mutagénesis SMART-ala, los tipos de respuesta. Los métodos estadísticos comparados fueron la prueba binominal condicional, la prueba de χ^2 para proporciones y un método alternativo basado en el establecimiento de límites de confianza observados en las frecuencias de mutación.

En principio estos métodos son equivalentes y conducen a las mismas conclusiones, por lo que Frei y Würgler utilizando el método que establece intervalos de confianza, generan el software SMART versión PC (sin publicar), que permite un manejo más ágil y una forma estandarizada en el reporte de los resultados para esta prueba.

Este programa fue utilizado para el procesamiento de los datos, cuyos resultados se presentan en el capítulo siguiente.

RESULTADOS

TAMAÑO DE PARTICULA

Como se mencionó previamente, los primeros experimentos realizados con partículas de zinalco de un tamaño entre 25μ y 50μ , resultaron ser tóxicas para las larvas.

Después de sonicar las partículas, se observó que los tratamientos administrados no modificaban la viabilidad de las mismas.

El análisis de microscopía electrónica mostró un tamaño de partícula promedio de $16\mu\text{m}$ de largo por $5.9\mu\text{m}$ de ancho (Fig. 13).

ACTIVACION NEUTRONICA

Los resultados de tres experimentos mostraron un incremento en ppm de los elementos de la aleación en las dosis de 4 y 16mg/ml con respecto al grupo testigo.

Hubo diferencias significativas entre las cruzas estándar y de alta bioactivación de acuerdo al análisis multifactorial de varianza ANOVA (Statgraphics ver. 5.0) con un valor $\alpha=0.041$ (Tabla 6, Fig. 14).

Comparando el grupo control con los de 4 y 16mg/ml , se observa que hay un incremento de las concentraciones de los elementos dependiente de la dosis, mateniéndose una diferencia significativa entre las cruzas E y AB, de acuerdo al mismo análisis estadístico.

Los resultados también muestran que el zinc está presente en una mayor proporción en ppm en las larvas tratadas, siguiéndole el aluminio y cobre (Tabla 6, Fig. 14).

EVALUACION DEL ZINALCO MEDIANTE LA PRUEBA SMART

Con respecto a la valoración genotóxica del zinalco por medio del bioensayo SMART-ala, en las tablas 7 y 8, se presentan los resultados obtenidos.

Los grupos testigos resultantes de cuatro experimentos presentaron una frecuencia de manchas muy semejante, por lo que fueron tratados como un grupo único de 172 alas para la cruza E y 160 alas para la de AB.

Las manchas chicas fueron las más abundantes en todos los tratamientos, con frecuencias de 0.250, 0.254, 0.314, 0.398, 0.450, para la cruza estándar, y de 0.214, 0.263, 0.313, 0.178, 0.350 y 0.750 para la cruza de alta bioactivación en los tratamientos de 1, 4, 8 y 16mg de zinalco por ml de agua respectivamente (Tablas 7 y 8).

El testigo positivo (CrO_3) produjo una frecuencia de manchas elevada, siendo más en la cruza E (0.937) que en la de AB (0.750).

Para manchas grandes, gemelas y totales el comportamiento fue muy semejante, y no se pudieron detectar diferencias significativas para ninguno de los grupos tratados con zinalco. Sin embargo, el tratamiento con trióxido de cromo incrementó significativamente la frecuencia de todos los tipos de manchas.

El análisis estadístico mostró un respuesta negativa en todas las concentraciones de zinalco administradas en las larvas, no habiendo diferencia entre las cruas (Figs. 15, 16, 17 y 18; Tablas 7 y 8).

DISCUSION

Uno de los primeros problemas presentados para la valoración genotóxica del zinalco, radicó en el hecho de que el material no es un compuesto soluble, por lo que fue necesario preparar una suspensión lo más homogénea posible pulverizando la aleación hasta formar partículas suficientemente pequeñas que permitieran su ingreso al interior de la larva.

Los resultados obtenidos demuestran que este tamaño de partícula no representa un riesgo desde el punto de vista genotóxico, aunque haya sido mayor que los reportados por Wagner (1974), Williams (1981b) y Delgado (1994).

Los primeros experimentos realizados con zinalco en *D. melanogaster*, dieron como resultado la toxicidad en los organismos, la diferencia entre estos experimentos y los reportados en este trabajo fue básicamente el tamaño de partícula (25 a 50 μ m) que resultó ser demasiado grande para las larvas.

En linfocitos humanos, en dosis de 200mg de zinalco/ml de agua, con un tamaño de partícula menor a 5 μ m, no provocaron efectos tóxicos ni genotóxicos a las células (Aguilar et al. 1994).

Varios autores atribuyen el daño causado por partículas de metal a diferentes factores y no solo al tamaño de las mismas, como la composición y acción química del metal, el peso y forma de las partículas, entre otros (Hench, 1985). Pedley (1981) menciona que el tipo de daño también depende de la especie, cepa o línea del organismo experimental, así como del nivel celular en el que se trabaje.

Por otra parte, un aspecto importante para la realización de las pruebas de mutagenicidad, es la introducción y permanencia del zinalco en las larvas de *D. melanogaster*, a este respecto, podía cuestionarse el ingreso del particulado y por lo tanto la evaluación adecuada de su genotoxicidad. El uso de la activación neutrónica como una técnica muy validada nos permitió evidenciar el ingreso y la persistencia del material en ellas de acuerdo a los resultados obtenidos, reflejando un incremento en los diferentes elementos componentes del zinalco (Zn, Al, Cu) con respecto al grupo testigo. Este incremento fue dependiente de la dosis, y mostró una proporción diferencial entre los elementos que la componen.

La relación porcentual de los elementos no se mantuvo como se presentan originalmente en la aleación, es decir, del 78%, 20% y 2% de Zn-Al-Cu respectivamente, sino que cambió esta relación a 96% para el zinc, 3% para el aluminio y 0.4% para el cobre. Esto podría deberse a varios factores como la proporción en que se encontraban estos elementos en el sonicado cuando fue administrado, por lo tanto, al ingerir las larvas el particulado, probablemente la mayor cantidad de polvos ingeridos fue de zinc, esto es posible ya que es el componente más abundante y si a esto sumamos que es el cuarto ión metálico en mayor proporción en la *Drosophila* (Nelwiyn et al. 1983), su porcentaje se incrementa.

Con respecto al aluminio y cobre, no se podría hablar de una pérdida de estos elementos en las larvas vía excreción. Probablemente la razón sea la proporción en la que se encontraban estos elementos en el sonicado al ser administrados.

Considerando brevemente este aspecto, tenemos que el polvo de zinalco proporcionado para su análisis genotóxico, fue tomado de una placa con las proporciones ya conocidas de la aleación,

pero cabe mencionar que el 2% de cobre, no se encuentra distribuido uniformemente en ella, sino que se encuentra embebido en ciertas partes de la misma, por lo que fue muy posible que el porcentaje de cobre en el polvo, desde un principio haya sido menor. Además caba la posibilidad de pérdida de los elementos (aunque sea en una mínima proporción) por el continuo manejo del polvo (durante el sonicado, la administración, etc.).

Por tal motivo, se propone para posteriores ensayos un análisis cuántico de los elementos en el sonicado.

Otro aspecto de discusión serían los mecanismos necesarios para la absorción gastrointestinal, que dependen, como se vió con anterioridad, de las características físicas y químicas del material.

Estudios previos muestran que bajo condiciones extremas de corrosión, el comportamiento de la aleación es el típico de cualquier material expuesto a estas pruebas. Es decir, forman una capa de óxidos que recubren el material, en el caso del zinalco fue de $Al_2O_3 \cdot x H_2O$ (Genescá y Uruchurto, 1994).

Otro factor que controla la ingestión, almacenamiento y excreción de metales en invertebrados terrestres estableciendo una tasa de asimilación y toxicidad es la anatomía del intestino.

Al respecto, se ha demostrado en dípteros, que el intestino medio es el sitio principal de almacenamiento de metales como el cadmio y cobre (Tabla 9) (Aoki et al. 1984), siendo además el principal sitio de secreción de enzimas y de absorción de productos de digestión. Por su parte, el zinc es almacenado en los túbulos de Malpighio (Fig. 19, Tabla 9) (White y Rainbow, 1985).

Estudios realizados por diferentes autores muestran que algunos metales como el hierro, cobre y el zinc, entre otros, son absorbidos por las células del intestino medio siempre que el pH del tracto sea igual o menor a 4.0 (Fig. 19) (Hopkin, 1989). En *Drosophila melanogaster* se ha encontrado en el intestino de larvas un pH menor a 3.0 (Graf, comunicación personal). De cualquier forma, el material permaneció dentro de la larva durante el período de desarrollo larvario, permitiéndolo en tal caso, realizar su evaluación genotóxica.

Esto nos sugiere que los iones metálicos liberados por el zinalco en su paso a través del tracto gastrointestinal de la larva, si la aleación fuera descompuesta en sus elementos originales, probablemente serían absorbidos por los microvilli de la pared intestinal (Terra y Ferreira, 1981).

Si bien, la técnica evidenció la presencia del zinc, aluminio y cobre dentro de las larvas tratadas demostrando su ingestión, esta prueba no determina si el zinalco se encuentra como tal o si ha sido descompuesto en sus componentes.

Por lo tanto, podemos asegurar que el zinalco fue ingerido por las larvas, pero no sabemos si éste permaneció como tal o la evaluación se hizo a los productos generados por el metabolismo de la larva, de cualquier manera, es de esperar que al menos una parte del producto haya permanecido intacto.

Si tomamos esto en cuenta y observamos los resultados obtenidos con el bioensayo SMART-ala, podemos asegurar que este bioensayo es sensible y que las condiciones a las que se llevaron al cabo los experimentos fueron adecuados puesto que el testigo positivo mostró una frecuencia significativa de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales como se esperaba. Sin embargo, la frecuencia de manchas encontrada para los grupos tratados con zinalco fue similar a la frecuencia encontrada en

el grupo testigo, sin importar la dosis de zinalco administrada.

Esto nos sugiere que el tratamiento fue inocuo desde el punto de vista genotóxico.

CONCLUSIONES

1.- El zinalco administrado por vía oral utilizando el tamaño de partícula obtenido por sonicación, no resultó tóxico a ninguna de las dosis administradas.

2.- Mediante la técnica de activación neutrónica se pudo demostrar que las larvas tratadas con las diferentes dosis de zinalco fueron capaces de ingerirlo puesto que al hacer el análisis se puso en evidencia un incremento en los contenidos de zinc, aluminio y cobre.

3.- El zinalco no mostró ninguna actividad genotóxica tanto en la cruza E como en la AB. Sugiriendo que en las condiciones a las que se llevaron al cabo los experimentos no actuó como mutágeno directo ni como mutágeno indirecto.

4.- Sin embargo, como ocurre para todos los sistemas de prueba, los resultados de esta valoración deben ser siempre confirmados con los resultados obtenidos en otros sistemas para poder definir adecuadamente el perfil genotóxico de la aleación.

Dentro de las perspectivas de trabajo con zinalco, se pretende evaluar *in vivo* la genotoxicidad de los productos de corrosión ya determinados, porque no se ha descartado la posibilidad de que éstos causen daño genético a largo plazo.

Tabla 1. Concentración de los elementos en la corteza terrestre y en tejidos de vertebrados (Williams, 1981).

ELEMENTOS	EN LA CORTEZA TERRESTRE (PPM)	EN TEJIDOS DE VERTEBRADOS (PPM)
MAYORES		
Calcio	36,300	15,000
Sodio	28,300	1,500
Potasio	25,900	2,000
Magnesio	20,900	500
Azufre	5,200	2,500
Fósforo	1,200	10,000
Cloro	200	1,500
MENORES		
Silicio	280,000	120
Hierro	50,000	70
Manganeso	1,000	0.2
Fluor	700	2-400 (a)
Cromo	200	0.2
Vanadio	110	0.1
Níquel	80	0.1
Zinc	65	100
Cobre	45	2
Cobalto	23	0.05
Yodo	6	0.3 (b)
Estaño	3	1
Arsénico	2	0.05
Molibdeno	1	0.2
Selenio	0.1	0.5
NO ESENCIALES		
Aluminio	18,000	1
Titunium	4,400	0.2
Boro	20	0.5
Plomo	15	0.5
Mercurio	0.5	0.2
Cadmio	0.2	0.1
Plata	0.1	0.01
Berilio	0.01	0.001
Oro	0.005	0.001

- (a) El nivel alto corresponde en los tejidos mineralizados.
(b) La mayoría está contenido en la tiroides.

**Tabla 2. Elementos Esenciales comunes en vertebrados.
(Underwood, 1977)**

ELEMENTOS MAYORES	ELEMENTOS MENORES
Hidrógeno Carbono Nitrógeno Oxígeno Sodio Magnesio Fósforo Azufre Cloro Potasio Calcio	Fluor Silicio Vanadio Cromo Manganeso Fierro Cobalto Níquel Cobre Zinc Arsénico Selenio Molibdeno Estaño Yodo

Tabla 3. Propiedades Físicas del Zinalco
(Torres-Villaseñor et al. 1990)

Temperatura de Fusión	421 a 481 °C
Densidad	5.5 g/cc
Módulo Elástico	110-130 GPa
Conductividad Eléctrica	37% *
Conductividad Térmica	37% *
Coef. de Expansión Térmico	25 m/mk
Color	Blanco grisáceo

* mayor que la del cobre

Tabla 4. Propiedades Mecánicas del Zinalco
(Torres-Villaseñor et al. 1990)

	Fundición en arena	Fundición inyección	Extruído 270-300°C	Laminado
Resistencia a la tensión (MPa)	290-300	310-320	380-410	270-290
Esfuerzo de cedencia (MPa)	280-300	290-310	280-320	300-310
Def. Máxima %	3-5	8-10	30-35	80-100
Dureza (Rb)	50-55	60-65	40-55	25-30

Tabla 5. Rango de sensibilidad de técnicas analíticas para determinar metales (Matsumoto y Fuwa, 1986).

M E T O D O	LIMITE DE D E T E C C I O N
Espectrometría de absorción atómica:	
flama	1 ng g ⁻¹
sin flama	0.01 ng g ⁻¹
Espectrometría de emisión por conducción	1 ng g ⁻¹
Análisis por activación neutrónica	1 ng g ⁻¹
Fluorescencia de rayos x:	
energía dispersiva	50 µg g ⁻¹
longitud de onda dispersiva	5 µg g ⁻¹

Tabla 6. Análisis de varianza que muestra las diferencias significativas con respecto a las ppm encontradas entre el Zn-Al-Cu, las concentraciones y las cruzas.
(análisis de varianza multifactorial ANOVA, $P=0.05$)

ANALISIS	SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE F	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
CRUZAS	6.6215	4.393	0.0414
METALES	1.4503	4.811	0.0125
CONCENTRACION	1.2975	4.304	0.0191

Tabla 7. Frecuencias de manchas obtenidas en las alas de *D. melanogaster* en presencia de zinalco en la cruz a estandar.

Conc. (mg/ml)	No. ALAS	CHICAS (1-2 CEL) m=2	GRANDES (>2 CEL.) m=5	GEMELAS m=5	TOTALES m=2
0	172	0.348- (60)	0.040- (7)	0.011- (2)	0.401- (69)
1	40	0.250- (10)	0.125- (5)	0.000i (0)	0.375- (15)
2	118	0.254- (30)	0.067- (8)	0.016- (2)	0.337- (40)
4	124	0.314- (39)	0.032- (4)	0.048- (6)	0.395- (49)
8	108	0.398- (43)	0.064- (7)	0.000i (0)	0.462- (50)
16	40	0.450- (18)	0.000i (0)	0.025- (1)	0.475- (19)
CrO,	160	0.937+(150)	0.425+(68)	0.187+(30)	1.612+(258)

Diagnosis estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988).
 +=positivo, -=negativo, i=no concluyente, m=factor de multiplicación.

Tabla 8. Frecuencias de manchas obtenidas en las alas de *D. melanogaster* en presencia de zinalco en la crusa de Alta Bioactivación.

Conc. (mg/ml)	No. ALAS	CHICAS (1-2 CEL.) m=2	GRANDES (>2 CEL.) m=5	GEMELAS m=5	TOTALES m=2
0	160	0.293- (47)	0.050- (8)	0.006- (1)	0.350- (56)
1	28	0.214- (6)	0.107- (3)	0.000i (0)	0.321- (9)
2	114	0.263- (30)	0.061- (7)	0.017- (2)	0.341- (37)
4	118	0.313- (37)	0.017- (2)	0.020- (4)	0.364- (43)
8	28	0.178- (5)	0.143- (4)	0.000i (0)	0.321- (9)
16	40	0.350- (14)	0.050- (2)	0.000i (0)	0.400- (16)
CrO,	120	0.750+ (90)	0.266+(32)	0.116+(14)	1.133+(136)

Diagnosis estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988).
 +=positivo, -=negativo, i=no concluyente, m=factor de multiplicación.

Tabla 9. Distribución de zinc y cobre en dípteros de diferentes edades con una dieta de sacarosa (control), complementada con 500 μ g g⁻¹ peso humedo de sulfato de zinc o cobre.
(De Sohal y Lamb 1979, tomado de Hopking 1989).

Dieta	Edad (días)	Concentración de Zn (μ g g ⁻¹ peso humedo)		
		Túbulos de Malpighio	Intestino Medio	Resto del cuerpo
Control	1	0	0	4
	10	0	0	7
	17	0	0	11
	25	0	0	7
500 μ g g ⁻¹ Zn SO ₄	1	40	2	41
	10	77	4	55
	17	105	1	70
	25	182	11	84
		Concentración de Cu (μ g g ⁻¹ peso humedo)		
Control	1	4	3	7
	10	4	24	22
	17	5	40	26
500 μ g g ⁻¹ CuSO ₄	1	5	6	7
	10	8	59	45
	17	14	77	35

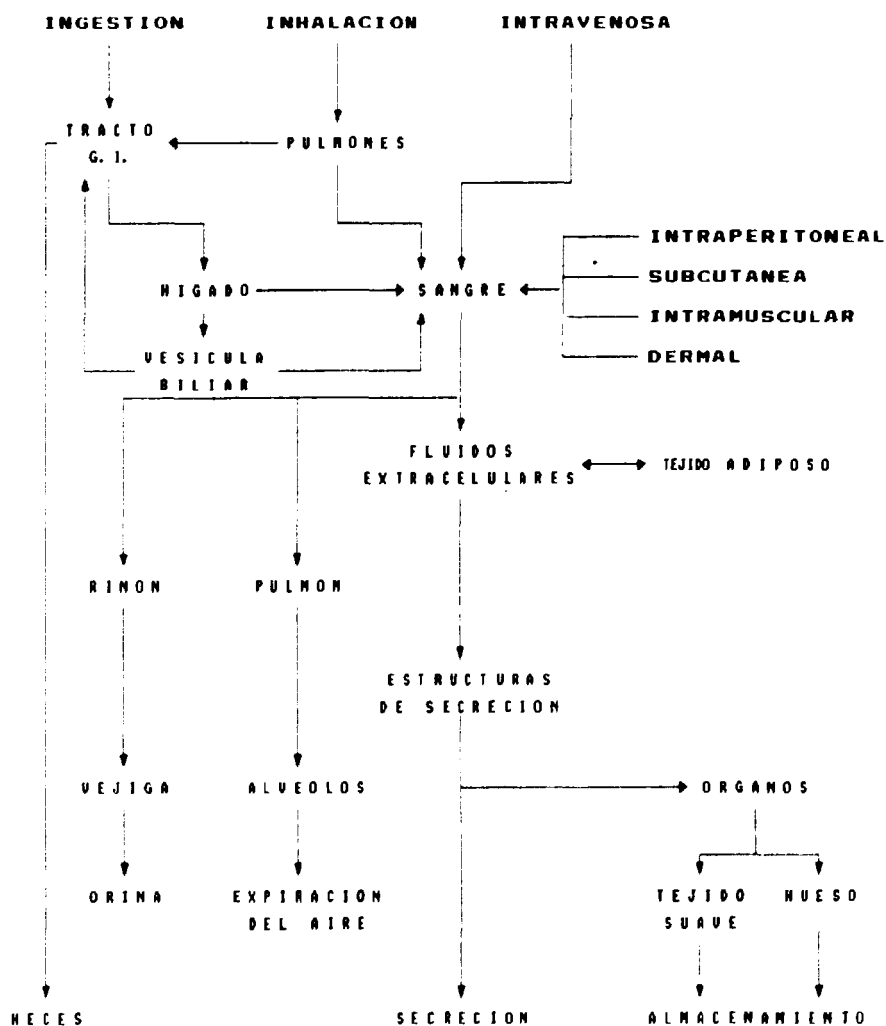


Fig. 1 Rutas de absorción, distribución y excreción de sustancias extrañas en el organismo. (Williams, 1981b)

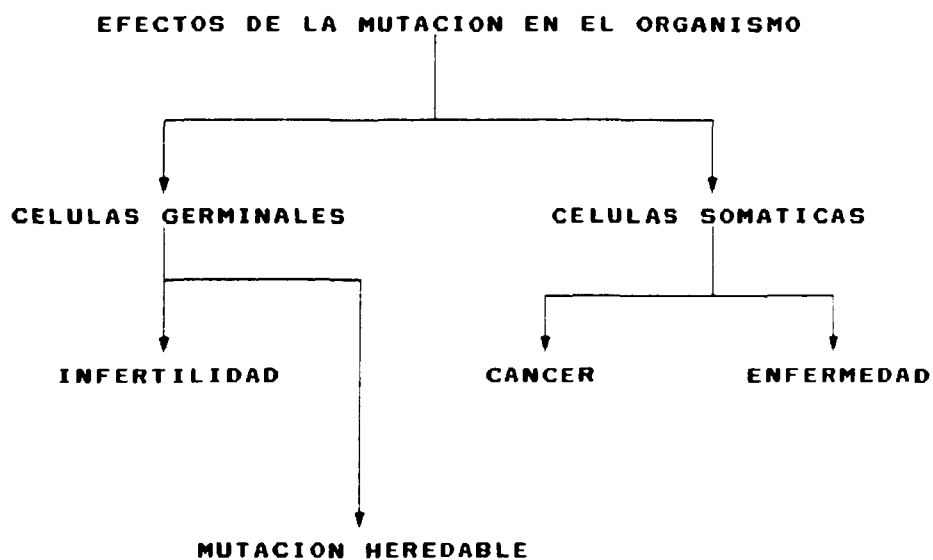


Fig. 2 Efectos adversos de químicos genotóxicos (Vogel, 1991)

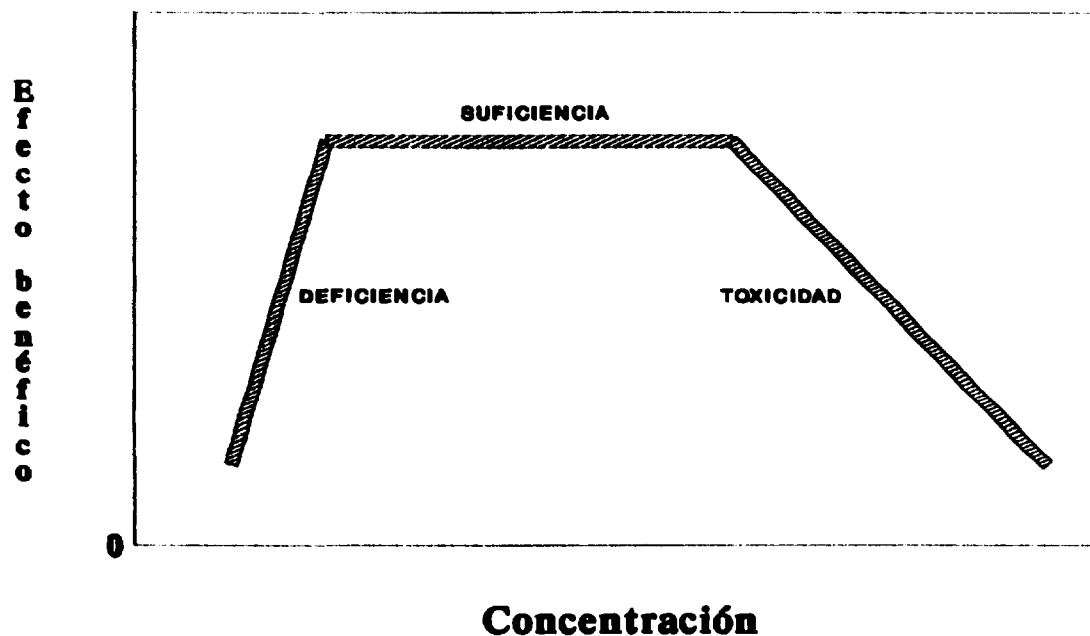


Fig. 3 Ley de Bertrand de la concentración nutritiva óptima de los elementos esenciales (Williams, 1981a)

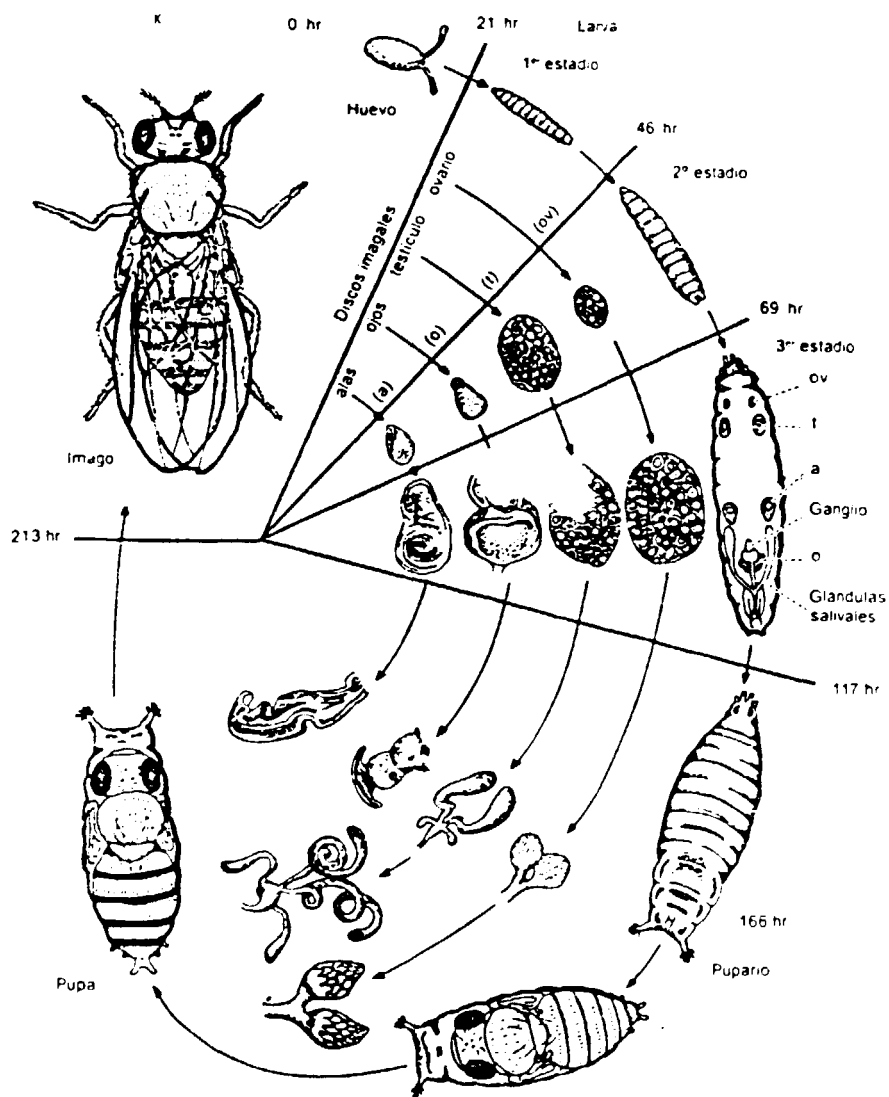


Fig. 4. Ciclo de vida de *D. melanogaster* que muestra el desarrollo de las estructuras de los órganos del adulto. (Tomado de Ramos et al. 1993)

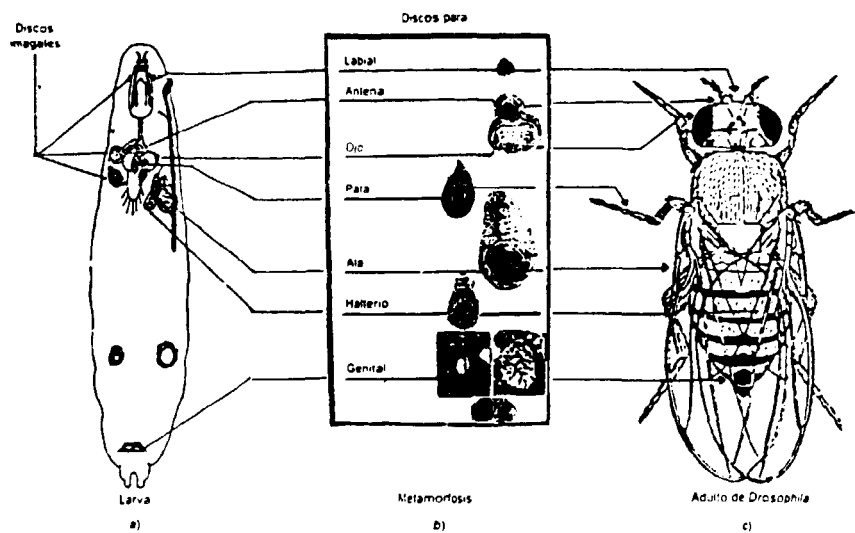


Fig. 5. Los discos imaginales de *Drosophila melanogaster* darán lugar a las diversas estructuras del adulto por una serie de divisiones mitóticas (Gilbert, 1990. Tomado de Ramos et al. 1993)

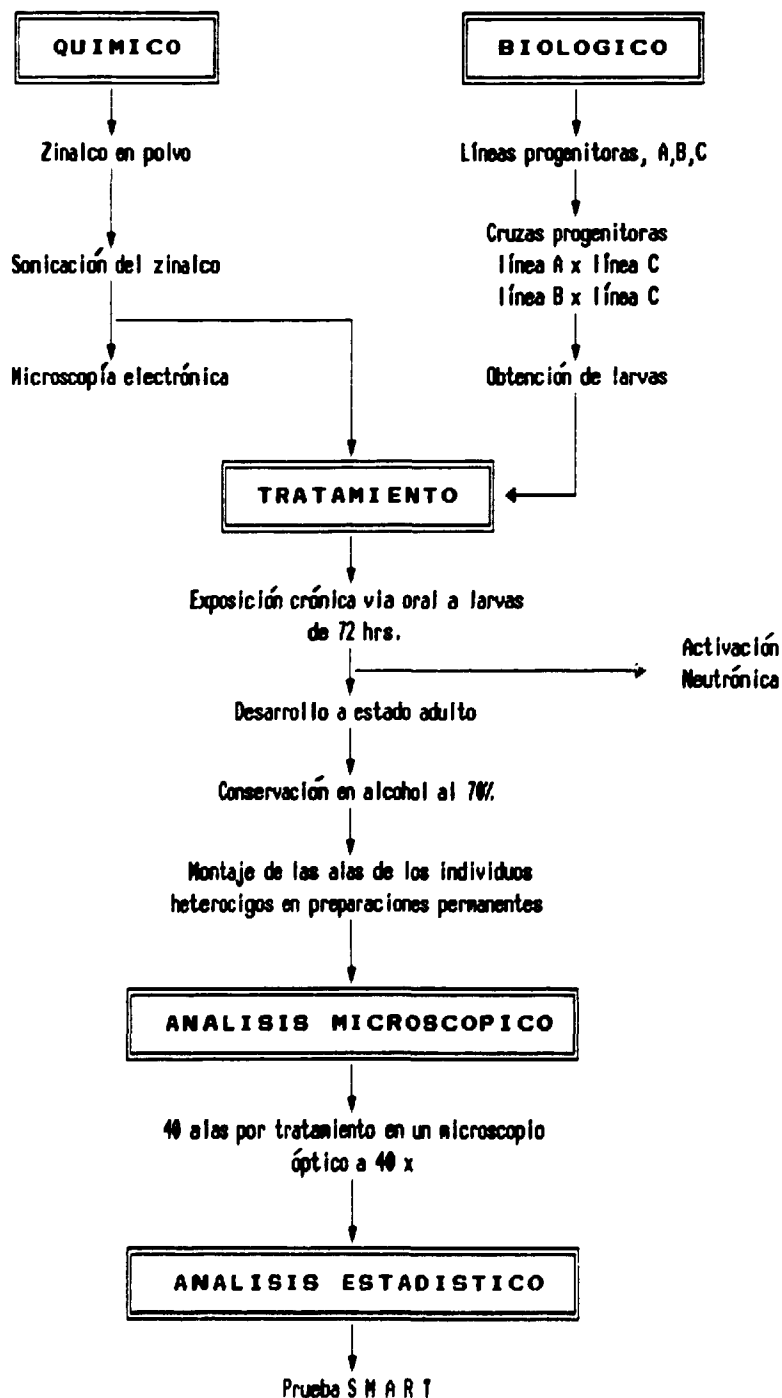


Fig. 6 Cronograma del método

Cruzas: A) ♀♀ *F1r'*/TM3,Ser x B) ♂♂ *mwh/mwh*

B) ♀♀ *ORR1/ORR1;ORR2/ORR2;F1r'*/TM3,Ser x C) ♂♂ *mwh/mwh*

Edad de las larvas al tratamiento: 72 hrs.

Compuesto: ZINALCO

Tratamiento: CRONICO VIA ORAL

Gpo. Control: 5ml DE AGUA EN 1.5g DE MEDIO SINTETICO
PARA *D. melanogaster*.

Gpos. Experimentales: 1, 2, 4, 8 y 16mg/ml de agua

Repeticiones: 3

Análisis Microscópico: SE ANALIZARON LAS ALAS A 40x Y SE
REGISTRO EL NUMERO, TIPO Y TAMAÑO
DE MANCHA POR ZONA.

Análisis Estadístico: PROGRAMA DE COMPUTO SMART (FREI Y
WÜRGLE 1989)

Fig. 7. Características del Protocolo

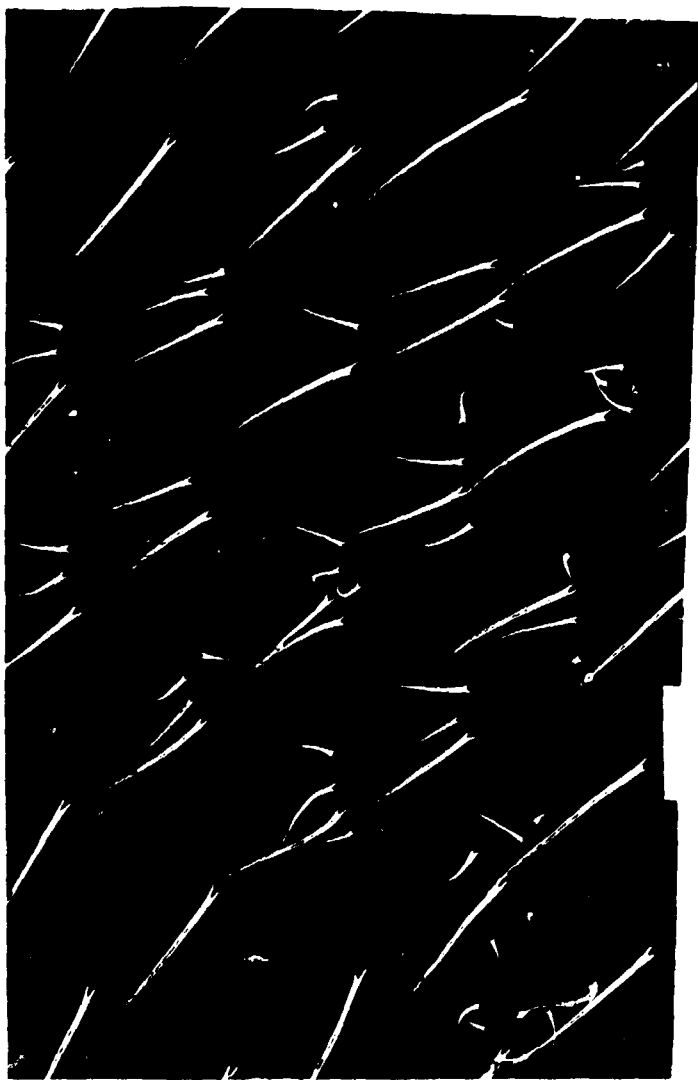


Fig. 8. Fenotipo del marcador *mwh*
(20mm:10 μ m) 40KV

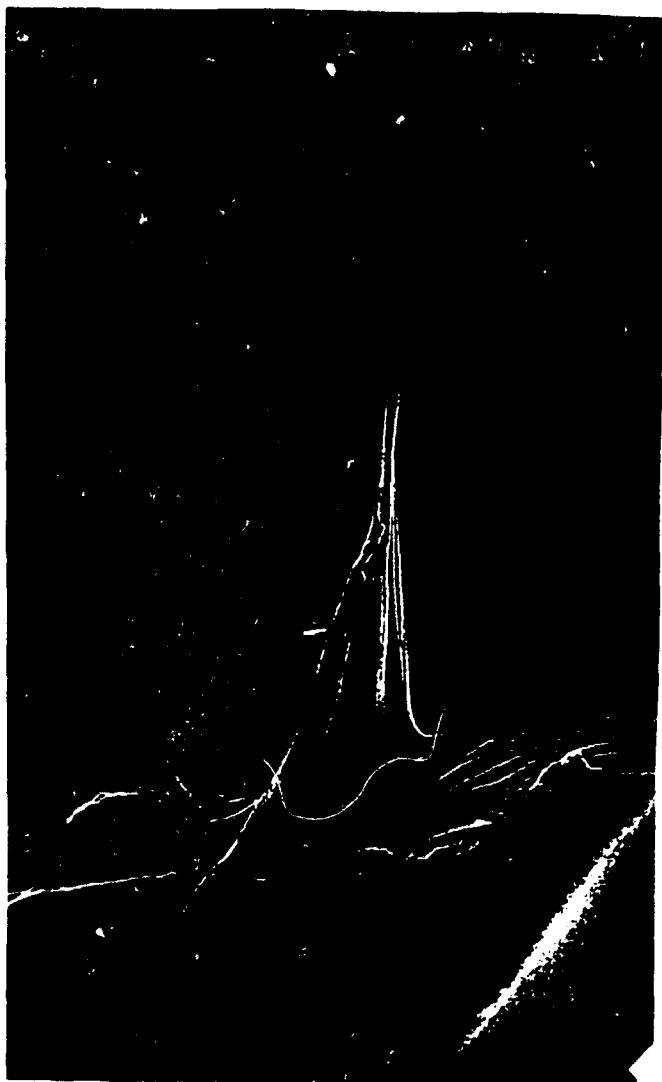


Fig. 9. Fenotipo del marcador *flr'*
(10mm:1 μ m) 40KV



Fig. 10. Mancha alar con el fenotipo *flr'*
(20mm:10 μ m) 40KV

Mantenimiento de la
línea de hembras: *flr'*/TM3,Ser

	<i>flr'</i>	TM3,Ser
<i>flr'</i>	<i>flr'</i> / <i>flr'</i> LETAL	<i>flr'</i> /TM3,Ser Serratia
TM3,Ser	<i>flr'</i> /TM3,Ser Serratia	TM3,Ser/TM3,Ser LETAL

Fig. 11. Esquema de letales balanceados en la cruce

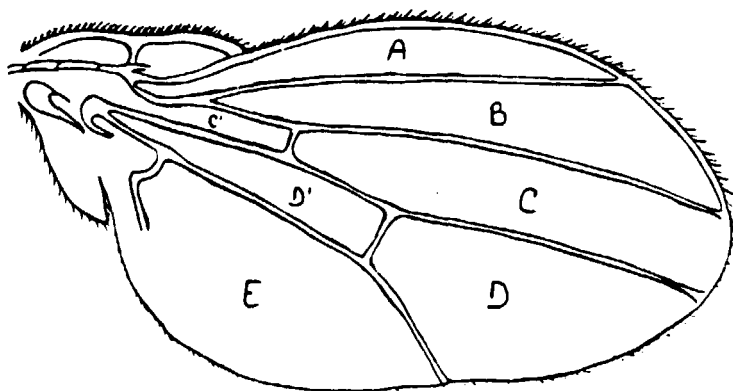


Fig. 12. Secciones en que se divide el ala de *D. melanogaster*.
(García-Bellido, 1971)

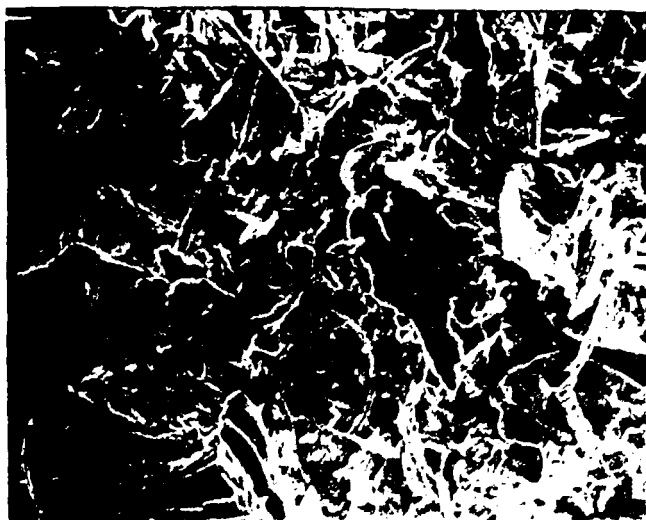


Fig. 13 Fotomicrografía del zinalco sonicado
durante 3h. 1000x
(50mm : 100 μ m)

CONCENTRACIONES (PPM) DE Zn, Al Y Cu EN LAS LARVAS DE LAS CRUZAS E Y A.B.

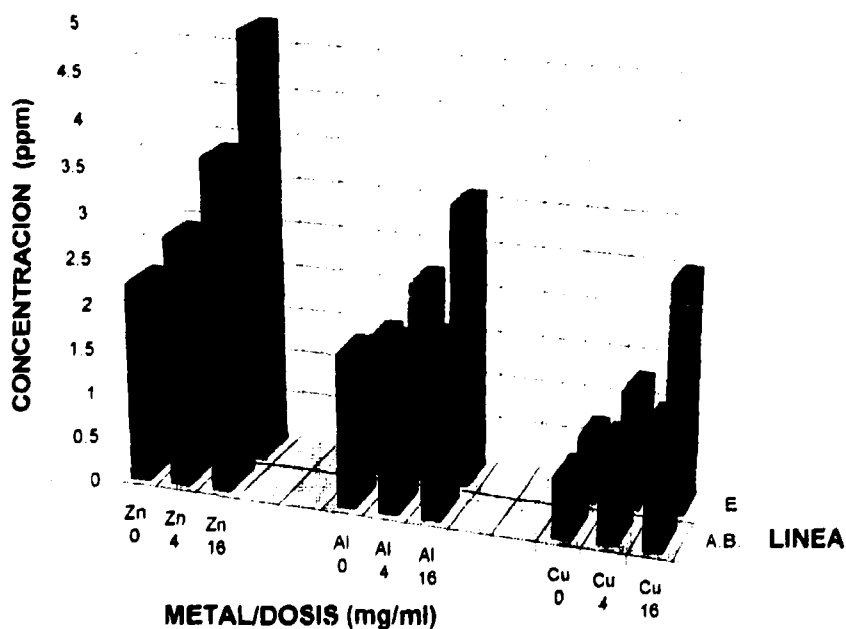


FIG. 14

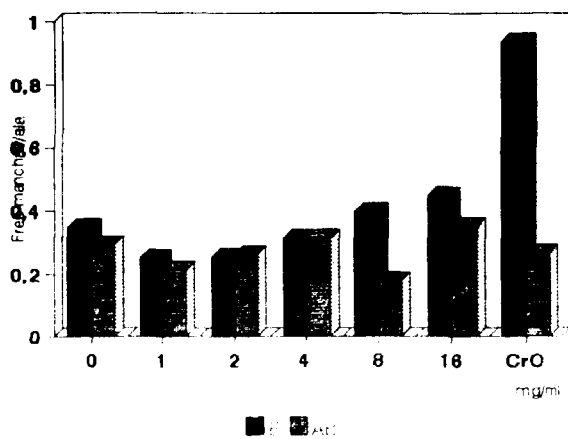


Fig. 15 Frecuencia de manchas pequeñas en las cruces F y AB

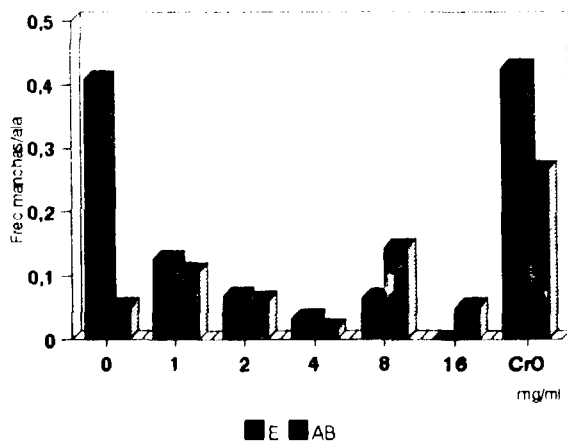


Fig. 16 Frecuencia de manchas grandes en las cruces E y AB

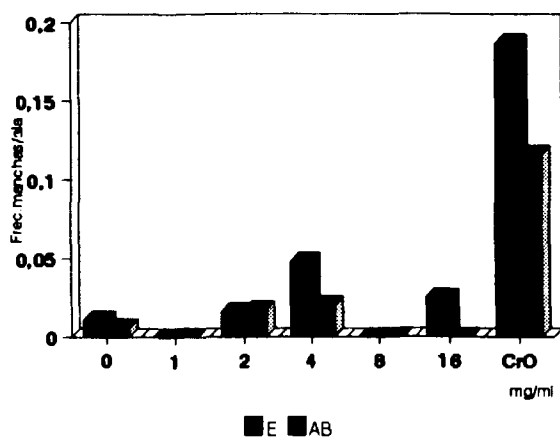


Fig.17 Frecuencia de manchas gemelas en las cruas E y AB

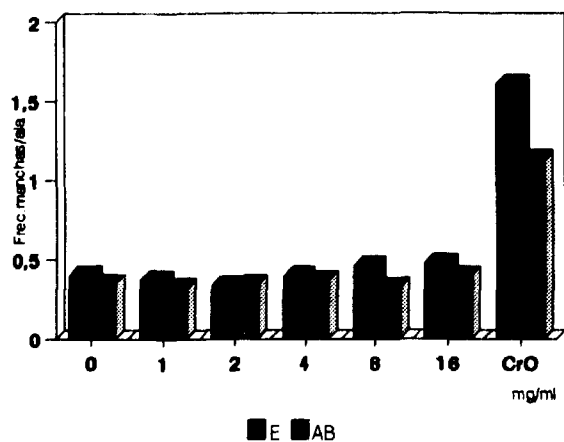


Fig. 18 Frecuencia de manchas totales en las cruas E y AB

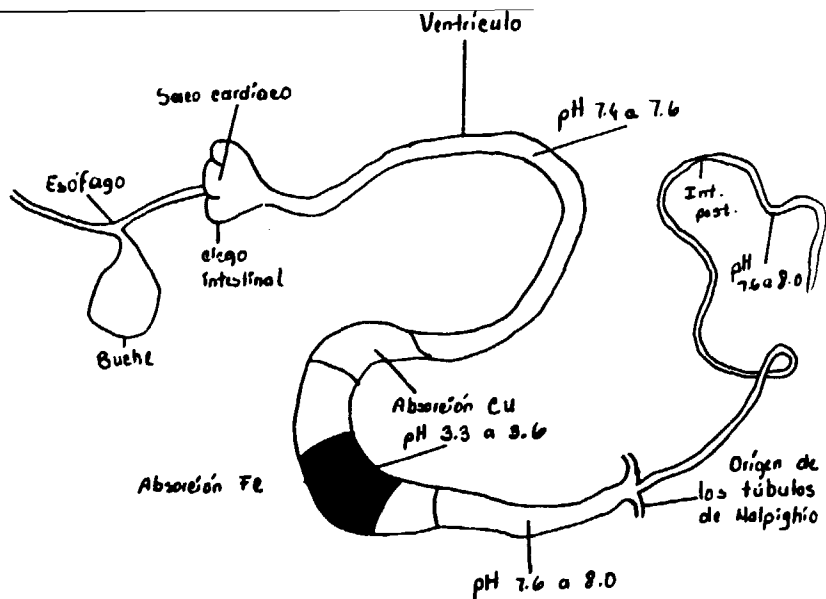


Fig. 19 Diagrama del intestino de *Lucilia cuprina* larva (Diptera), mostrando el pH del intestino y las regiones de absorción de Fe y Cu. (Hopkin, 1989)

REFERENCIAS

Aguilar, M.A., I. Pomar, G. Partida, A. Fernández y C. Piña (1994) A Cytotoxicity Test of Zinalco. Recient advances in science, technology and application of Zn-Al alloys. Proceedings of the 3rd International Conference on An-Al alloys. Ed. G. Torres Villaseñor, Y. Zhu y C. Piña. México, D.F. 201-203

Anderson, M. (1979) Mn^{2+} ions pass through Ca^{2+} channels in myoepithelial cells. *J.Exp.Biol.* **82**:227-238.

Anderson, J.M. (1981) The biocompatibility of human implants. In: *Fundamental Aspects of Biocompatibility*. Vol.II. CRC Press, New York, E.U. 205-218.

Aoki, Y., R.T.Suzuki y K. Kubota (1984) Accumulation of cadmium and induction of its binding protein in the digestive tract of fleshfly (*Sarcophaga peregrina*) *Comp. Biochem. Physiol.* **77C**, 279-282.

Brusick, D. (1988) Principles of genetic toxicology. 2a. ed Plenum Press, New York, E.U. 284pp.

Clements, J., D.Howe, A.Lowry y F.Phillips (1990) The effects of range of anti-cancer drugs in the white-ivory somatic mutation test in *Drosophila*. *Mutation Res.* **174**, 275-277.

De Bruin, A. (1981) The metabolic fate of foreign compounds. In: *Fundamental aspects of biocompatibility*. Vol.II. CRC, New York, E.U. 3-37.

De Fernicola, N. y P.Jauge (1985) Nociones básicas de toxicología. ECO/OPS/OMS. México. 113pp.

Delgado, A., R.Ortíz y R.Villalobos-Pietrini (1994) Genotoxicidad producida por aeropartículas. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 10 supl. 1, 25.

Elves, H. (1981) Immunological aspects of biomaterials. In: *Fundamental aspects of biocompatibility*. Vol. II. Ed. by F.D. Williams. CRC New York. 159-173.

Francis, A.R., T.K., Shetty y R.K. Bhattacharya (1988) Modifying role of dietary factors on the mutagenicity of aflatoxin B₁: In vitro effect of trace elements. *Mutation Res.* **199**, 85-93.

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

Frölich A. y F.E. Würgler. (1989) New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test, *Mutation Res.*, **216**, 179-187.

Frölich, A. y F.E. Würgler (1991) Increased P450 content and increased alarinate-epoxidase activity in an improved set of tester strains for the *Drosophila* SMART assay with the wings. *Mutation Res.* **252**, 194.

García-Bellido, A., J.R. Merriam (1971) Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.*, **24**, 61-87.

Genescá, J. y J. Uruchurto (1994) Corrosion resistance of zinc-aluminum alloy in sodium chloride solution. Recent advances in science, technology and application of Zn-Al alloys. Proceedings of the 3rd International Conference on Al-Al alloys. Ed. G. Torres Villaseñor, Y. Zhu y C. Piña. México, D.F. 215-218.

Getz, Ch. y N. Van Shaik (1991) Somatic Mutation in the wings of *Drosophila melanogaster* females dysgenic due to P elements when reared at 29°C. *Mutation Res.* **248**, 187-194.

Gibbons, D. (1982) What can we predict before it's implanted? In: *Biomaterial. An Interfacial approach*. Ed. Hench. E.U. 139-150.

Graf, U., F.E. Würgler, H. Katz, H. Frei, H. Juon, G.B. Hall y P.G. Kale (1984) Somatic Mutation And Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* **6** 153-188.

Graf, U., C.B.Hall y N.Van Shaik (1990) On the use of excision repair defective cells in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environm. Mol. Mutagen.* **16**, 225-237.

Graf, U., O.S.Heo y O.Olvera (1992) The genotoxicity of chromium (VI) oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is over 90% due to mitotic recombination. *Mutation Res.* **266**, 197-203

Graf, U. (1994) Analysis of the relationship between Age of Larvae at Mutagen Treatment and Frequency and Size of Spots in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Environm. Mol. Mutagen.* in press.

Graf, U., A.Alonso Morgara, R.Castro y E. Díaz Carrillo (1994) Genotoxicity testing of different types of beverages in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. *Fd.Chem.Toxic.* in press.

Graf, U. y N.Van Shaik (1992) Improve, High bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* **271**, 59-67.

Griss, J., B.Kcigel, R.Dobs y P.Rustac. (1981). The implants materials. Immunological aspects. In: *Fundamentals Aspects of Biocompatibility*. Vol. II. CRC. New York, E.U. 89-103.

Guzmán, R.J., F.E.Würgler y E.W.Vogel (1990) Training course on *Drosophila* somatic genotoxicity assays in Mexico. *Mutation Res.* **234**, 107-109.

Guzmán, R.J. y U.Graf (1995) *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. Proceedings of the 37th Conference of the IAGLR, Plemun Press. en prensa.

Haudenschild, C. (1984) Host response: Biological performance of biomaterial in the human body, In: *Contemporary biomaterials. Material and host response, clinical applications, new technology and legal aspects*. Ed. John W. Boretos Murray Eden. New Jersey, E.U. 128-131.

Hench, P. (1985) The chemical action of metals. New York Press. USA. 487pp

Hernández, G., S. Macouzet, M. Bolaños. (1991) Medidas del grado de citotoxicidad en macrófagos y fibroblastos de la aleación zinalco para su posible uso como biomaterial en ortopedia. Congreso Nal. Física. Cd. México.

Hopking, S.P. (1989) Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. Elsevier Applied Science Publ. LTD Pollution Monitoring Series Ed. Prof. K. Mellanby. Inglaterra. 366pp.

Howe, D. y J. Clements (1990) The white-ivory somatic mutation test in *Drosophila*. The effect of larvae age, increasing the number of copies of w(i) and the response to some reference mutagens. *Mutation Res.* **228**, 193-202.

Katz, A.J. y T.A. Foley (1993) Effect of Temperature on frequencies of spots in *Drosophila* wing-spots assay. *Environm. Mol. Mutagen.* **22**, 54-58.

Kumar, A., G. Talukder y A. Sharma (1990) Effects of aluminium sulphate on human leukocyte chromosomes *in vitro*. *Mutation Res.* **199**, 85-93.

Lehninger, A. (1982) Bioquímica. Omega, España 1117pp.

Léonard, A. y G.B. Gerber (1988) Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of aluminium. *Mutation Res.* **196** 247-257.

Lindsley, D.L. y G.G. Zimm (1992) The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego. 1133pp.

Mangusson, J y C. Ramel (1990) Inhibitor of poly(ADP-ribose) transferase potentiates the recombinogenic but not the mutagenic action of alkylating agents in somatic cells *in vivo* in *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis.* **5**, 511-514.

Matsumoto, K. y K. Fuwa (1986) The estimation of cadmium in biological samples. In: *Cadmium* (E.C. Foulkes, Ed.) Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 80. Berlín, Alemania. 1-31.

Mello-Filho, A.C. y R. Meneghini (1991) Iron is the intracellular metal involved in the production of DNA damage by oxygen radicals. *Mutation Res.* **251**, 109-113.

Muntau, H. (1984) Newer essential trace elements and analytical reliability. In: *Trace Element Analytical Chemistry in Medicine and Biology*. Vol. 3 (P Brätter & P. Schramel, Eds) pp 563-580. Berlin, Alemania.

Negrete, J., L. Valdés, G. Torres-Villaseñor. (1990) Microstructure and mechanical properties of Zn-Al alloys at room temperature. *Metallurgical Transactions*, Vol. 14A, 1931-1934.

Negishi, T., T. Shiotani, K. Fujikawa y H. Hayatsu (1991) The genotoxicities of N-nitrosamines in *Drosophila melanogaster* in vivo: the correlation of mutagenicity in the wing spot test with the DNA damage detected by the DNA repair test. *Mutation Res.* **252**, 119-128.

Nelwin, C., D. Gossle, L. Bate y K. Jacobson (1983) Quantitative aspects of metal ion in context and toxicity in *Drosophila*. *Toxicology*, **26**:295-312.

Newesly, H. (1991) Standardization of Biocompatibility Testing In: *Biomaterials Degradation*. Edit. M.A. Barbosa, Elsevier Science Publishers B.V., E.U. 363-682.

Nöthiger, R. (1970) Sucrose density separation: A method for collecting large numbers of *Drosophila* larvae, *Dros. Inform. Serv.* **45**, 117.

Octive, J.C., M. Wood y A.C. Johnson (1991) Mutagenic effects of aluminium. *Mutation Res.* **264**, 135-137.

Olvera, O., S. Zimmering, C. Arceo y M. Cruces (1993) The protective effects of Chlorophyllin in treatment with chromium (VI) oxide in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* **301**, 201-204.

Pedley, R. (1981) Reaction tissues to the biomaterials. New York Press. USA. 428pp.

Pilliar, R.M., D.F. Williams y R. Vowels (1982) Fracture toughness testing of in vivo aged biomaterials In: *Biomaterial An Interfacial Approach*. Hench Ed. E.U. 548pp.

Piña, C., E. Vázquez, G. Torres. (1992a) Estudio por microscopía electrónica de la aleación zinalco para aplicaciones como biomaterial. 1er. Congreso Atlántico de Microscopía Electrónica.

Piña, C., G. Torres-Villaseñor, G. Hernández, N. Pérez, A. Olivera, P. Izquierdo, J. Luna del Villar, T. Casaubon, L. Saldivar, N. Munguía, T. Fortoul. (1992b) Investigaciones en biomateriales desarrolladas en la UNAM (Implantes de zinalco). IV Congreso Nal. de Cirugía Veterinaria. Cuernavaca, Mor. México.

Piña, C. (1992c) De Garfio a robocop. En la Ciencia. Vol. 11:41 21-27.

Ramos, P., Abundis, H., Gaytán, J. C., Ordáz, G., Orozco, P., Maldonado, J., Hernández, J., González, E., Reyes, P., Galicia, E. y Muñoz, A. (1993) Manual de laboratorio de genética para *Drosophila melanogaster* Mc.Graw-Hill, México. 131pp.

Rodríguez-Arnaiz, R y J. Hernandez (1994) Activity of aromatic amines in the eye: w/w+ somatic assay of *Drosophila melanogaster*. Environ. Mol. Mutagen. 24:75-79.

Rodríguez-Arnaiz, R. y P. Ramos (1992) *Drosophila* como sistema para detectar agentes genotóxicos. Pequeños manuales. Ed. Ciencias, UNAM. México. 50pp.

Sáenz, A., J. Negrete, L. Valdés. G. Torres-Villaseñor. (1992) Propiedades superplásticas a temperatura ambiente de la aleación An-Al-Cu. IV Encuentro de Investigación Metalúrgica. Sotillo, Coah. México.

Sierra, L. M., A. R., Barros, M. García, J. A. Ferreira y M. A. Comendador (1991) Acrolein genotoxicity in *Drosophila melanogaster*. I. Somatic and germinal mutagenesis under repair proficient conditions. Mutation Res. 260, 247-256.

Sunderman, F. W. (1977) A review of the metabolism and toxicity of níquel. Ann. Clin. Lab. Sci. 7, 377.

Terra, W. F. y C. Ferreira (1981) The physiological role of the peritrophic membrane and trehalase: digestive enzymes in the midgut and excreta of starved larvae of *Rhynchosciara*. j. Insect Physiol. 27:325-331.

Torres-Villaseñor, G. (1988) Microestructura y propiedades mecánicas del zinalco. *Ciencias* **39**:103-111.

Torres-Villaseñor, G., J. Negrete, J. Hinojosa. (1990) El zinalco nuevo material nuevas tecnologías. II Congreso Nal. sobre Tecnología Metalúrgica. IMP.

Tripathy, N.K., R.K. Patnaik y M.J. Nabi (1989) Genotoxicity of tartrazine studied in two somatic assays of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* **224**, 479-483.

Underwood, E.J. (1977) Trace Elements in Human and Animal Nutrition (4th edition). Academic Press, New York, E.U.

Van Shaik., N. y U. Graf (1993) Structure-activity relationship tricyclic antidepressant and related compound in the wings somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* **286**, 155-163.

Vogel, E.W. (1991) Genotoxics Chemicals. An Introduction into basic principles of genetic toxicology. Sylvius Lab. Holanda. 66pp.

Victorin, K., L. Busk, H. Cederbert y J. Magnusson (1990) Genotoxic activity of 1,3-butadiene and nitrogen dioxide and their photochemical reaction products in *Drosophila* and the mouse bone marrow micronucleus assay. *Mutation Res.* **228**, 203-209.

Wagner, R. (1974) The citotoxicity effect of asbests in bone marrow rats. *Environm. Mol. Mutagen.* **236**, 118-126.

West, J. (1986) Corrosión y oxidación. Ed. Limusa, México. 219pp.

White, S.L. y P.S. Rainbow (1985) On the metabolic requirements for copper and zinc. *Mar. Environ. Res.* **16**, 215-229.

Williams, D. (1981a) Biomaterials and biocompatibility: An introduction, In: *Fundamental aspects of biocompatibility*. Vol. 1. CRC Press, New York, E.U. pp 1-7.

Williams,D. (1981b) Biomaterials and biocompatibility: An introduction, *In: Fundamental aspects of biocompatibility*. Vol. II. CRC Press, New York, E.U.

Williams,J. (1985) Metals as implant material. *In: Biomedical materials*. Pittsburg. 18-35.

Williams,J., M.Nichols, W.Zingg. (1985) Tissue reactions. *In: Biomedical Materials*. Pittsburgh, E.U. 105-111.

Würgler,F.E. y U.Graf (1990) Genotoxicity assays with somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Rev. Latinoamer. Genet.*, Vol. extraord., 131-196.

Zordan,M., A.Russo, R.Costa, N.Blanco, C.Beltrame y A.G. Levis (1991) The genotoxicity of nitrilotriacetic acid (NTA) in a somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* **262**, 253-261.

A P E N D I C E A

MATERIALES UTILIZADOS PARA:

Determinación del tamaño de partícula:

- Zinalco en polvo, proporcionado por el Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM.
- Aparato sonicador LR técnica alemana 115v, 60 ciclos.
- Microscópio electrónico de barrido marca Joel. IIMUNAM.

Análisis por activación neutrónica:

- Reactor Triga Mark III, tipo piscina

Prueba de genotoxicidad:

- Medio de cultivo para *Drosophila* (Rodríguez-Arnaíz y Ramos, 1992)

Aislamiento de hembras y machos:

- Microscópio de disección
- Eterizador
- Agujas de disección
- Tubos homeopáticos (35ml) con medio de cultivo

Colecta de huevos:

- Frascos de 250ml con medio de cultivo

Colecta de larvas:

- Embudo de separación
- Embudo de plástico
- Tela de malla
- Piceta
- Soporte universal
- Pincel
- Vaso de precipitado de 100ml

Tratamiento:

- Zinalco sonicado
- Trióxido de cromo (Sigma, México)
- Tubos homeopáticos con medio sintético para *Drosophila* (Carolina Biological Supply Co.)

Montaje de alas:

- Microscopio de disección
- Agujas de relojero
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Solución Fauré (Graf et al. 1984)
- pesas de 250g

A P E N D I C E B

Tabla 1. Concentración de los elementos en la corteza terrestre y en los tejidos humanos.	41
Tabla 2. Elementos esenciales comunes en vertebrados.	42
Tabla 3. Propiedades físicas del zinalco.	43
Tabla 4. Propiedades mecánicas del zinalco.	44
Tabla 5. Rango de sensibilidad de técnicas analíticas.	45
Tabla 6. Análisis de varianza para los resultados en ppm del Zn-Al-Cu.	46
Tabla 7. Frecuencias de manchas en la cruz a estándar.	47
Tabla 8. Frecuencias de manchas en la cruz a de alta bioactivación.	48
Tabla 9. Distribución de Zn y Cu en dípteros.	49
Fig. 1 Rutas de absorción distribución y excreción de sustancias extrañas en el organismo.	50
Fig. 2 Efectos adversos de químicos genotóxicos.	51
Fig. 3 Ley de Bertrand.	52
Fig. 4 Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i> .	53
Fig. 5 Discos imagales de <i>D. melanogaster</i> .	54
Fig. 6 Cronograma del método.	55
Fig. 7 Características del protocolo.	56
Fig. 8 Fenotipo del marcador <i>mwh</i> .	57
Fig. 9 Fenotipo del marcador <i>flr3</i> .	58
Fig.10 Mancha alar con fenotipo <i>flr3</i> .	59
Fig.11 Esquema de letales balanceados en la cruz a.	60
Fig.12 Secciones del ala de <i>D. melanogaster</i> .	61
Fig.13 Fotomicrografía del sonicado de Zinalco.	62
Fig.14 Histograma de resultados obtenidos en ppm de Zn-Al-Cu.	63
Fig.15 Histograma de frecuencias de manchas pequeñas en las cruces E y AB.	64
Fig.16 Histograma de frecuencias de manchas grandes en las cruces E y AB.	64

Fig.17	Histograma de frecuencias de manchas gemelas en las cruas E y AB.	65
Fig.18	Histograma de frecuencias de manchas totales en las cruas E y AB.	65
Fig.19	Tracto digestivo de dípteros.	66