



**V REUNION  
DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA  
DE MUTAGENESIS AMBIENTAL**

**Córdoba, 8-10 de junio, 1994**

---

**Centro Cultural CajaSur**

**V REUNION CIENTIFICA DE LA SOCIEDAD  
ESPAÑOLA DE MUTAGENESIS AMBIENTAL**

**Córdoba, 8 al 10 de junio de 1994**

**Organizado por el grupo *Desarrollo y Aplicación  
de Ensayos Genotóxicos* del Departamento de  
Genética de la Universidad de Córdoba**

**Comité Organizador:**

Presidencia: C. Pueyo de la Cuesta

Miembros: N. Abril Díaz

E. Alejandro-Durán

M.J. Prieto Alamo

Secretaría: M.D. Mesa Gutiérrez

P. Rodríguez Lope

PROGRAMA CIENTÍFICO

8 de junio de 1994

**Patrocinada por:**

Consejería de Educación y Ciencia de la Junta de Andalucía

Excmo. Ayuntamiento de Córdoba

Universidad de Córdoba

Consejo Social

Junta de Gobierno

CajaSur-Obra Social y Cultural

**Colaboran:**

Comercial Mycar, S.A.

Bio-Rad Laboratories, S.A.

Papelería Ibertécnica



**JUNTA DE ANDALUCÍA**  
Consejería de Educación y Ciencia



UNIVERSIDAD DE CORDOBA



AYUNTAMIENTO  
DE CORDOBA



SOCIEDAD ESPAÑOLA DE  
INGENIEROS AMBIENTALES



CajaSur

## PROGRAMA CIENTIFICO

### Miercoles 8 de junio de 1994

20:30 Cóctel de Bienvenida (Hotel Alfaros) y entrega de documentación.

### Jueves 9 de junio

08:30 Entrega de documentación

09:00 Conferencia:

*"Efectos genotóxicos y citotóxicos de inhibidores de topoisomerasas de ADN en células de mamíferos"*. Dr. Felipe Cortés. Universidad de Sevilla

10:00 Sesión inaugural.

10:30 1ª Sesión de comunicaciones orales

Moderador: Dr. F. Cortés. Universidad de Sevilla.

1. *Estudio del efecto genotóxico de cuatro inhibidores de topoisomerasas en Drosophila melanogaster y en linfocitos humanos*.  
Ribas G., Torres C., Umberto G., Xamena N., Creus A. y Marcos R.
2. *Papel de las enzimas antioxidantes y sistemas de reparación del ADN en la mutagénesis por estrés oxidativo en Escherichia coli*.  
Ruiz-Laguna J., Prieto-Alamo M.J., Abril N. y Pueyo C.
3. *Respuesta adaptativa al daño por radiación en linfocitos humanos en G0 condicionados con peróxido de hidrógeno o bajas dosis de rayos X*.  
Flores M.J., Cortés F., Dominguez I., Piñero J. y Mateos J.C
4. *Caracterización de líneas utilizables en el test SMAR w/w<sup>+</sup> en la detección de agentes productores de estrés oxidativo*.  
Gaivão I. y Comendador M.A.

11:30 Pausa-Café

12:00 2ª Sesión de comunicaciones orales

Moderador: Dra. María Sierra. Universidad de Oviedo.

5. *Ensayo de carcinógenos no genotóxicos en el test white-ivory*.  
Consuegra S., Sierra L.M., Ferreiro J.A. y Comendador M.A.



6. *El test white-ivory bajo condiciones de reparación deficientes.*  
Ferreiro J.A., Consuegra S., Sierra L.M. y Comendador M.A.
  7. *Ampliación de los estudios sobre el uso de mutantes white-ivory de Drosophila melanogaster en la detección de genotoxicidad.*  
Suárez S., Batiste-Alentorn M., Soriano S., Cabré O., Velázquez A., Xamena N., Creus A. y Marcos R.
  8. *Hibridación in situ fluorescente (chromosome painting) como método útil para detectar aberraciones cromosómicas estables en mutagénesis.*  
García Sagredo J.M., Vallcorba I., Vázquez Mazariego Y., López-Yarto A. y Ferro M.T.
  9. *Seguimiento citogenético en individuos expuestos a bajas dosis de rayos X.*  
Leone P., Córdova A., Gutiérrez S., Peñaherrera M.S., Sánchez M.E. y Paz-y-Miño C.
- 14:00 Almuerzo
- 16:00 Conferencia:  
"El papel de *Drosophila melanogaster* como organismo modelo en los estudios de genotoxicidad". Dr. Miguel Angel Comendador. Universidad de Oviedo
- 17:00 Pausa-Café
- 17:30 3ª Sesión de comunicaciones orales  
Moderador: Dr. Ricardo Marcos. Universidad Autónoma de Barcelona.
10. *Análisis de catorce plaguicidas mediante el ensayo S.M.A.R.T.: Comparación entre cruzamiento estándar y cruzamiento de alta bioactivación.*  
Osaba L., Graf U., Aguirre A. y Alonso A.
  11. *Aplicación de hibridación in situ, anticuerpos anticinetocoro e inhibidores de la reparación al ensayo de micronúcleos. Estudio del potencial genotóxico de 10 plaguicidas.*  
Surrallés J., Xamena N., Creus A. y Marcos R.
  12. *Estudio de la posible interacción entre el ácido húmico y distintos herbicidas en la inducción de efectos genotóxicos en linfocitos humanos y en Drosophila.*  
Torres C., Ribas G., Umbert G., Xamena N., Creus A. y Marcos R.
  13. *Estudio citogenético longitudinal de una población de trabajadores agrícolas.*  
Carbonell E., Umbert G., Xamena N., Creus A. y Marcos R.
  14. *Mutagenicidad/carcinogenicidad de los plaguicidas en el sistema comunitario.*  
Herrera A., Caballo C., Valcarce E., Serrano E., Tacoronte E. y Fresno A.
- 18:45 Reunión anual de la S.E.M.A.
- 20:00 Visita a la Mezquita
- 21:00 Recepción Oficial (Jardines del Alcázar de los Reyes Cristianos)

**Viernes 10 de junio de 1994**

- 09:00 Conferencia:  
"Técnicas moleculares en los estudios de mutagénesis ambiental". Dr. Juan López Barea. Universidad de Córdoba.
- 10:00 4ª Sesión de comunicaciones orales  
Moderador: Dr. M. A. Comendador. Universidad de Oviedo.
15. *Papel de las MFO en la activación del 2-AF mediada por S9 de rata y fracciones de Persea americana.*  
Chiapella C., Riera J., Rivera E. y Llagostera M.
16. *Activación de aminas aromáticas en moluscos procedentes de zonas con diferentes niveles de producción.*  
Díaz-Méndez F.M., Rodríguez-Ariza A., Pueyo C. y López-Barea J.
17. *Activación de aminas aromáticas en hígado de peces: efecto del tratamiento con xenobióticos.*  
Rodríguez-Ariza A., Díaz-Méndez F.M., López-Barea J. y Pueyo C.
18. *Hipermutabilidad producida por la mutación mus308 de Drosophila melanogaster.*  
Aguirrezabalaga I., Sierra L.M. y Comendador M.A.
- 11:00 Pausa-Café
- 11:30 Conferencia:  
"The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in Drosophila melanogaster: Recent advances and status of validation". Dr. Ulrich Graf. University of Zurich, Suiza
- 12:30 5ª Sesión de comunicaciones orales  
Moderador: Dr. Gabriel Dorado. Universidad de Córdoba.
19. *Mutagénesis en sitios de restricción (RSM) aplicada a DNA bacteriano.*  
Leal J.F.M., Kostic T., Abril N., López-Barea J., Pueyo C. y Dorado G.
20. *Aplicación de la mutagénesis en sitios de restricción (RSM) a DNA humano.*  
Dorado G., Leal J.F.M., y López-Barea J.
21. *La técnica RE/PCR aplicada a la determinación in vitro de espectros de mutación somáticos en Drosophila melanogaster.*  
Santamaría I., Aguirrezabalaga I., Comendador M.A. y Sierra L.M.
- 14:00 Almuerzo
- 16:00 6ª Sesión de comunicaciones orales  
Moderador: Dra. Carmen Pueyo. Universidad de Córdoba

22. *Especificidad mutagénica de la AFB<sub>1</sub> en los genes lacI y supF de Escherichia coli.*  
Abril N., Prieto-Alamo M.J., Luque-Romero F.L. y Pueyo C.
  23. *Espectro de mutación inducido por EMS en el gen supF: Mutagénesis in vitro vs. mutagénesis in vivo en Escherichia coli.*  
Ferrezuelo F., Jurado J., Luque-Romero F.L., Hera C. y Pueyo C.
  24. *Especificidad mutagénica de agentes alquilantes en Escherichia coli. Influencia de la alquiltransferasa constitutiva (proteína Ogt).*  
Vidal A., Abril N. y Pueyo C.
  25. *El espectro de mutación inducido por DES en condiciones deficientes de reparación por escisión en Drosophila melanogaster depende de la dosis.*  
Sierra L.M., Comendador M.A. y Aguirrezabalaga I.
  26. *La mayoría de las mutaciones inducidas por ENU en espermatogonias de Drosophila melanogaster ocurren en sitios AT.*  
Tosal L., Comendador M.A. y Sierra L.M.
  27. *Análisis molecular de mutantes de Drosophila melanogaster obtenidos a partir de cepas portadoras del retrotransposón B104 inserto en el locus white.*  
Soriano S., Suárez S., Velázquez A., Creus A., Marcos R., Cabré O. y Xamena N.
- 17:30 Pausa-Café
- 18:00 Conferencia de clausura:  
"UV-induced mutation spectra: From shuttle vectors to human tumours". Dr. Alain Sarasin, Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer. Villejuif, Francia.
- 22:00 Cena de clausura (Restaurante *Las Palmeras del Caballo Rojo*)

ESTRATEGIAS DE INVESTIGACION EN SISTEMAS DE PRODUCCION DE LEONARDO GARCIA  
DE ALONSO Y CELIA GARCIA DE MADRUGA

Leonardo García de Alonso y Celia García de Madrugá  
Departamento de Recursos Humanos, Universidad de Córdoba, Facultad de Agronomía,  
Campus de Valancón

## CONFERENCIAS

Las conferencias de la SEMA se celebran desde su creación en Córdoba, en un ambiente de cordialidad y de intercambio de experiencias. En esta ocasión, la SEMA ha organizado una conferencia sobre el tema de la investigación en sistemas de producción, que se celebrará el día 8 de junio en Córdoba, a las 10 de la mañana.

El tema de la conferencia es "Estrategias de Investigación en Sistemas de Producción". El ponente será el Sr. Leonardo García de Alonso, profesor de Recursos Humanos en la Universidad de Córdoba. La conferencia se celebrará en el aula magna del edificio de la Facultad de Agronomía, Campus de Valancón, a las 10 de la mañana del día 8 de junio. El Sr. García de Alonso es un experto en el tema de la investigación en sistemas de producción, y su conferencia será de gran interés para todos los asistentes.

La SEMA desea agradecer al Sr. García de Alonso su colaboración y su interés en participar en esta actividad. Asimismo, desea agradecer a todos los miembros de la SEMA su colaboración y su interés en esta actividad. La SEMA desea agradecer también a todos los asistentes a esta actividad su colaboración y su interés en esta actividad.

La SEMA desea agradecer también a todos los asistentes a esta actividad su colaboración y su interés en esta actividad. La SEMA desea agradecer también a todos los asistentes a esta actividad su colaboración y su interés en esta actividad. La SEMA desea agradecer también a todos los asistentes a esta actividad su colaboración y su interés en esta actividad.



**EFFECTOS GENOTOXICOS Y CITOTOXICOS DE INHIBIDORES DE TOPOISOMERASAS DE ADN EN CELULAS DE MAMIFEROS.**

**F. Cortés, J. Piñero, T. Ortiz y F. Palitti<sup>1</sup>**

Dpto. de Biología Celular. Universidad de Sevilla. <sup>1</sup>Dpto. de Agrobiología e Agroquímica. Universidad de Viterbo (Italia).

Las topoisomerasas de ADN son enzimas que se encargan de llevar a cabo los cambios topológicos que necesita el ADN para realizar importantes funciones tales como la replicación, transcripción, segregación, recombinación reparadora, etc. Dichos cambios topológicos los efectúan las topoisomerasas a través de roturas y reuniones del ADN que han de tener lugar de forma concertada para que el funcionamiento sea correcto.

El interés general por el estudio de las topoisomerasas ha cobrado gran auge al descubrirse que dichas enzimas son el blanco de una serie de drogas antitumorales de reconocida eficacia, basándose estos avances en la acción de las quinolonas sobre las girasas bacterianas (Liu, 1989). Se acepta hoy día de forma unánime que los inhibidores o más propiamente llamados "venenos" anti-topoisomerasas como la camptotecina (CPT) (anti-topo I) o el m-Amsa (anti-topo II), actúan a nivel molecular mediante la estabilización del complejo de rotura, uniéndose al mismo y abortando la reacción en este paso, de manera que se impide la posterior reunión de las cadenas rotas y unidas covalentemente a la enzima.

Los inhibidores de topoisomerasas inducen con gran eficacia tanto aberraciones cromosómicas como intercambios entre cromátidas hermanas (SCEs). En lo que se refiere a la inducción de muerte celular, que es lo que interesa desde el punto de vista de la terapia antitumoral, existe evidencia suficiente de que la colisión de la horquilla de replicación del ADN en movimiento con los complejos de rotura estabilizados por la droga (ADN-topoisomerasa-veneno) convertirían dichos complejos, que normalmente son reversibles, en lesiones letales (Holm y col., 1989; Hsiang y col. 1989), presuntamente por la acción de endonucleasas, aunque existe cierta controversia sobre el papel de la topo II.

Los estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio del Departamento de Biología Celular de la Universidad de Sevilla en colaboración con el profesor F. Palitti, de las Universidades de Roma y Viterbo (Italia) se han centrado en los siguientes aspectos: (1) Caracterización de la línea celular mutante EM9 de CHO, hipersensible a la radiación ionizante y drogas alquilantes, ya que presenta una extraordinaria frecuencia de SCEs al incorporarse Bromodeoxiuridina (BrdU) en el ADN, (2) Importancia de la replicación activa del ADN para el daño citogenético causado por inhibidores de topoisomerasas, (3) Optimización del daño citogenético y citotoxicidad mediante tratamientos combinados con inhibidores de topoisomerasas.



EL PAPEL DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* COMO ORGANISMO MODELO  
EN ESTUDIOS DE GENOTOXICIDAD.

Comendador MA

Area de Genética. Dpto de Biología Funcional. Universidad de Oviedo. 33071. Oviedo.

Desde el inicio de la Genética, *D. melanogaster* ha jugado un papel central como organismo modelo; baste pensar en los trabajos pioneros de Bridges, Sturtevant y Muller. Asimismo, *D. melanogaster* fue el organismo en el que se pudo demostrar por primera vez el poder mutagénico de la radiación ionizante y de los compuestos químicos.

Las razones por las que este organismo ha jugado este papel preponderante van desde su facilidad de cultivo y corto ciclo de vida hasta el alto grado de conocimiento que se tiene de su genética y desarrollo. Ello hizo que se pudieran desarrollar una variedad de ensayos de genotoxicidad, entre los que juega un papel esencial el de letales recesivos ligados al sexo (SLRLT), hasta el punto de que este ensayo figuraba en las baterías oficiales de evaluación.

Por distintas consideraciones, este sistema perdió parte de su importancia como elemento clave de los ensayos de genotoxicidad y su extrapolación al hombre. Sin embargo, el desarrollo de los ensayos de mutación y recombinación somática (SMART) pueden hacer recuperar a *Drosophila* el papel que tuvo.

Por otra parte, el avance en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en el proceso mutacional pone de manifiesto, y cada vez con mayor intensidad, que *Drosophila* puede ser uno de los mejores modelos animales *in vivo* para estudiar diferentes procesos.

En la presentación se hará una revisión de diferentes aspectos de la biología y genética de *Drosophila* que avalan la esperanza de que este organismo recupere su status en los estudios de mutagenicidad.



**ALGUNAS TECNICAS MOLECULARES APLICADAS EN LOS ESTUDIOS DE MUTAGENESIS AMBIENTAL**

Juan López Barea

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular e Instituto de Biología Básica y Aplicada, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, Avda. de Medina Azahara s/n, 14071 Córdoba, España.

Muchos xenobióticos presentes en el medio ambiente reaccionan con el DNA produciendo mutaciones. Al ser compuestos electrófilos forman aductos al unirse covalentemente con las regiones nucleófilas del DNA. Los aductos de pequeño tamaño son inducidos por los agentes alquilantes sencillos o los daños oxidativos, pero los hidrocarburos aromáticos policíclicos dan aductos muy voluminosos.

Los aductos voluminosos se detectan por posmarcado con  $^{32}\text{P}$ , tras digerir el DNA con nucleasas que liberan dNp y dN\*p y marcar su 5'-OH con [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]ATP. Los  $^{32}\text{pdN}^*\text{p}$  derivados de los aductos se separan por cromatografía bidimensional y se identifican por autorradiografía. Aunque el método es muy sensible ( $1/10^8$  nucleótidos) no identifica los aductos, que aparecen también en respuesta a factores como la edad o la dieta.

La separación por HPLC y la detección electroquímica permite identificar y cuantificar aductos, tanto en el DNA como los liberados en orina por la reparación. Las columnas de inmunoafinidad para 8-OHdG y 8-OHGua combinadas con el HPLC-EC han permitido estudiar la epidemiología de los daños oxidativos en el DNA de ratas y humanos.

La Biología Molecular aplicada a la mutagénesis detecta mutaciones en sitios de restricción (RSM). Las secuencias de DNA de tipo silvestre se digieren exhaustivamente con la endonucleasa elegida, mientras que las secuencias mutantes (que son resistentes) se amplifican por PCR con oligonucleótidos que flanquean la secuencia diana. Experimentos de reconstrucción con el gen *araA* de *E. coli* demuestran que se detectan 1-3 moléculas de DNA mutante para el sitio de restricción *EcoRI* en presencia de  $10^7$  moléculas de tipo silvestre.

Financiado por: CICYT AMB93-0628, STEP-CT91-0147, CICYT PB91-0846



THE WING SOMATIC MUTATION AND RECOMBINATION TEST (SMART)  
IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*: RECENT ADVANCES AND STATUS  
OF VALIDATION

Ulrich Graf

Institute of Toxicology, Swiss Federal Institute of Technology (ETH) and  
University of Zurich, CH-8603 Schwerzenbach, Switzerland

The wing SMART is based on the principle that the loss of heterozygosity of suitable marker genes in cells of the imaginal disks in larvae can lead to the formation of clones of mutant cells which are then expressed as mutant spots on the wings of the adult flies. Crosses are made with flies carrying recessive mutations to produce the marker-heterozygous progeny: the two markers *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0.3) and *flare* (*flr<sup>3</sup>*, 3-38.8) on the left arm of chromosome 3 are employed. The larvae derived from these crosses are then treated chronically or acutely by oral administration or inhalation with the test compounds. Methods are available for a quantitative measurement of the amount of the chemical compounds taken up by the larvae. After eclosion, the adult flies are scored for the presence of single and twin spots on the wings. Both frequency and size of these two classes of spots are recorded. The different classes of spots can be due to different mechanisms: various types of mutational events (point mutation, deletion, specific types of translocation) as well as mitotic recombination, and maybe also monosomy. The analysis of two different genotypes (one with structurally normal chromosomes, one with a multiply inverted balancer chromosome) allows for a quantitative determination of the recombinogenic activity of genotoxins. The wing SMART is sensitive to a broad spectrum of genotoxic agents which belong to different chemical classes. It has also been used for genotoxicity testing of complex mixtures which form part of the human diet. Furthermore, special strains and crosses have been devised which possess an increased bioactivation capacity for promutagens and procarcinogens. It is estimated that a total of over 350 compounds have been tested in this assay so far. The wing SMART is ideally suited for the study of structure-activity relationships of groups of chemical compounds. In addition, it has been used successfully also for investigations of antigenotoxicity of specific compounds or mixtures.



## UV-INDUCED MUTATION SPECTRA : FROM SHUTTLE VECTORS TO HUMAN TUMOURS

Sarasin Alain  
Laboratory of Molecular Genetics  
Institut de Recherches sur le Cancer  
BP 8 - 94801 VILLEJUIF Cedex - FRANCE

Sun exposure is one of the major environmental carcinogens in humans leading to skin ageing and skin tumours on exposed parts of the body. In order to understand UV-induced skin carcinogenesis we make use of the existence of human genetic diseases characterized by hypersensitivity to UV and high cancer-proneness. Thus, xeroderma pigmentosum patients (XP) are the best example of a direct link between unrepaired DNA lesions and cancer induction.

The use of shuttle vectors allowed us to follow mutation frequencies and mutation spectra of UV-induced targets (supF or lac Z' genes) after their passage in normal or repair-deficient cells. The mutation frequency is much higher in XP compared to normal cells. UV-induced mutations are always located opposite pyrimidine-pyrimidine sequences, are often C to T transitions with a very high proportion of mutations C-C to T-T, characteristic of UV-light. The spectra of mutations were not basically different between normal and DNA repair-deficient diseases, except for a greater amount of tandem mutations in XP cells.

Taking into account this characteristic mutation pattern, we have looked for mutation induction in ras oncogenes and the p53 tumor suppressor genes isolated from XP skin tumours. We were able to detect point mutations on these two types of genes in about 40-50 % of skin tumours. Interestingly, the mutation spectra found on the p53 genes (and to a lesser extent on ras genes) were exactly identical to those found using model systems, such as bacteria, phage, virus, shuttle vectors or endogeneous genes after treatment by UV. All mutations, found in XP and non-XP skin tumours were located at py-py sequences. The majority of these mutations were C to T transitions. In non-XP skin tumours, about 15 % of point mutations on the p53 gene correspond to double mutations C-C to T-T which are considered as a signature for UV-induced mutations. In XP skin tumours, this number increases dramatically to 55 %. Moreover, most mutations were due to translesion synthesis of unrepaired UV-lesions left on the non-transcribed strand of the p53 gene. This result is the first direct evidence for the existence of preferential repair in human tissues in vivo and demonstrates quite clearly the fundamental role of unrepaired sun-induced DNA lesions as a clear initiator of human skin carcinogenesis.



ESTUDIO DEL EFECTO GENOTÍPICO DE CUATRO CULTIVARES DE  
SOLANUM TUBEROSUM EN DIFERENTES AMBIENTES Y EN DIFERENTES  
SITIOS.

Alfonso, C. Torres, G. Harón, M. Nájera, A. Cruz y A. Martínez  
Unidad de Genética, Univ. de Córdoba, Facultad de Agronomía, Córdoba, España

Los resultados de los estudios de los efectos de los genotipos de Solanum tuberosum y de los ambientes de cultivo, así como de la interacción genotipo x ambiente, se analizaron por métodos de análisis de varianza y regresión.

**COMUNICACIONES ORALES**

El efecto genotípico de los cultivares de Solanum tuberosum en diferentes ambientes de cultivo se estudió en un experimento de campo en el año 1993. Se utilizaron cuatro cultivares (A, B, C y D) y se analizaron los efectos de los ambientes de cultivo (1, 2, 3 y 4) y de la interacción genotipo x ambiente. Los resultados se analizaron por métodos de análisis de varianza y regresión.

El efecto genotípico de los cultivares de Solanum tuberosum en diferentes ambientes de cultivo se estudió en un experimento de campo en el año 1993. Se utilizaron cuatro cultivares (A, B, C y D) y se analizaron los efectos de los ambientes de cultivo (1, 2, 3 y 4) y de la interacción genotipo x ambiente. Los resultados se analizaron por métodos de análisis de varianza y regresión.

Los resultados de los estudios de los efectos de los genotipos de Solanum tuberosum y de los ambientes de cultivo, así como de la interacción genotipo x ambiente, se analizaron por métodos de análisis de varianza y regresión.

Los resultados de los estudios de los efectos de los genotipos de Solanum tuberosum y de los ambientes de cultivo, así como de la interacción genotipo x ambiente, se analizaron por métodos de análisis de varianza y regresión.

**ESTUDIO DEL EFECTO GENOTOXICO DE CUATRO INHIBIDORES DE TOPOISOMERASAS EN *Drosophila melanogaster* Y EN LINFOCITOS HUMANOS.**

Ribas G., C. Torres, G. Umbert, N. Xamena, A. Creus y R. Marcos.  
Unitat de Genètica. Dpt. de Genètica i Microbiologia , UAB, Bellaterra.

Las topoisomerasas son enzimas implicados en mecanismos de replicación y de reparación del ADN, por lo que su inhibición puede afectar la expresión espontánea y/o inducida de distintos procesos mutagénicos.

En esta comunicación se presentan los resultados obtenidos hasta el momento en el estudio de cuatro inhibidores de topoisomerasas: camptotecina (CPT), m-amsacrina (m-AMSA), etopósido (VP-16) y ácido nalidíxico (NAL). Los dos primeros son inhibidores específicos de la topoisomerasa II, el VP-16 es un inhibidor de la topoisomerasa de tipo I y el NAL es un inhibidor de la girasa bacteriana.

El efecto genotóxico de los cuatro inhibidores ha sido estudiado en cultivos de linfocitos de sangre periférica humana, mediante el ensayo de intercambios entre cromátidas hermanas (SCE). En *Drosophila melanogaster* sólo se han evaluado hasta ahora el NAL y la m-AMSA en el ensayo de mutación y recombinación somática *mwh/flr*<sup>3</sup>.

Los primeros resultados obtenidos indican que los inhibidores estudiados son tóxicos en cultivos de linfocitos, manifestando la CPT y el VP-16 una elevada toxicidad. Todos ellos inducen incrementos muy significativos de la frecuencia de SCE, siendo su relación de efectividad la siguiente:  
CPT > VP-16 > m-AMSA > NAL.

Los resultados preliminares en *Drosophila melanogaster* indican una débil respuesta del NAL, mientras que la m-AMSA está siendo evaluada actualmente.



**PAPEL DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES Y SISTEMAS DE REPARACION DEL ADN EN LA MUTAGENESIS POR ESTRES OXIDATIVO EN *Escherichia coli*.**

Ruiz-Laguna J., Prieto-Alamo M.J., Abril N., Pueyo C.

Departamento de Genética. Fac. de Ciencias. Universidad de Córdoba. 14071-Córdoba

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la importancia de las defensas primarias (catalasa y SOD) en comparación con los sistemas de reparación del ADN en la protección frente a los daños oxidativos, así como el papel de la 8OHG en la mutagénesis por estrés oxidativo. Para ello se han construido estirpes de *E. coli* deficientes en enzimas antioxidantes (*kat<sup>-</sup>* y *sod<sup>-</sup>*) y/o proteínas reparadoras que protegen a la célula de la acción genotóxica de la 8OHG (*fpg<sup>-</sup>* y *mutY<sup>-</sup>*). La proteína Fpg protegió a las bacterias de la acción mutagénica y letal del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado por el café (177 mutantes Ara<sup>r</sup>/mg en la estirpe *fpg<sup>-</sup>* vs 83 mutantes Ara<sup>r</sup>/mg en el parental silvestre). No obstante, el papel protector de la catalasa, la defensa primaria frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fue 8 veces mayor (1494 mutantes Ara<sup>r</sup>/mg en la estirpe *kat<sup>-</sup>*). De forma similar, la SOD constituyó la principal defensa frente a la acción genotóxica de la plumbagina (generador de anión superóxido), en comparación con la catalasa o la Fpg-glicosilasa. La acción protectora de la SOD frente a la hiperoxigenación se puso de manifiesto en el mutante *sod<sup>-</sup>*, que multiplicó por 2,8 su frecuencia de mutación espontánea. Por el contrario, la ausencia de catalasa no tuvo ningún efecto, independientemente de la presencia de las proteínas Fpg o MutY. La deficiencia en FPG-glicosilasa incrementó la frecuencia de mutación espontánea de forma similar a la deficiencia en catalasa o en SOD (unas 2 veces). Sin embargo, la deficiencia en MutY supuso un incremento de dicha frecuencia de 4,6 veces. El incremento en la frecuencia de mutación espontánea que conlleva la ausencia de la proteína Fpg fue independiente del sistema de reparación fiel por escisión y del sistema SOS, de acuerdo con las características mutagénicas de la 8OHG, una lesión no voluminosa y directamente mutagénica. En contraposición, el incremento asociado a la deficiencia en catalasa resultó claramente dependiente de la presencia del plásmido pKM101 y/o la deficiencia *uvrB<sup>-</sup>*. Los resultados sugieren que otras lesiones, además de la 8OHG, desempeñan un papel en la mutagenicidad por especies activas de oxígeno.

(Financiado por la Junta de Andalucía. Grupo 3167).

RESPUESTA ADAPTATIVA AL DAÑO POR RADIACION EN LINFOCITOS HUMANOS EN G0 CONDICIONADOS CON PEROXIDO DE HIDROGENO O BAJA DOSIS DE RAYOS X.

Flores, M.J., Cortés, F., Domínguez, I., Piñero, J. y Mateos, J.C.<sup>1</sup>

Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.

<sup>1</sup> Centro Regional de Oncología "Duques del Infantado", Sevilla.

Hemos estudiado la respuesta adaptativa en linfocitos humanos en G0 condicionados con peróxido de hidrógeno o con dosis baja de rayos X siendo el tratamiento challenge posterior de rayos X a una dosis de 1.5 Gy, después de la estimulación. El tratamiento condicionante con peróxido fue dado a distintos tiempos antes de la estimulación, mientras que la irradiación con baja dosis se administró a distintas tasas de dosis justo antes de estimular los linfocitos. El efecto protector contra el daño por radiación (detectado como micronúcleos en células binucleadas inducidas por la citocalasina B) de la preexposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es evidente, independientemente del tiempo del tratamiento condicionante durante G0. Para la células irradiadas con rayos X a baja dosis, sin embargo, la adaptación parece depender de la tasa de dosis, y nunca alcanza el nivel observado en las células tratadas con el peróxido.



CARACTERIZACION DE LINEAS UTILIZABLES EN EL TEST SMAR W/W+ EN LA DETECCION DE AGENTES PRODUCTORES DE ESTRES OXIDATIVO.

Gaivão I<sup>‡‡</sup> y Comendador MA<sup>†</sup>

‡ Departamento de Genética. Universidade de Tras-os-Montes e Alto Douro. 5000 Villa-Real. † Area de Genética. Dpto de Biología Funcional. Universidad de Oviedo. 33071. Oviedo.

El test SMAR w/w+ ha probado su potencialidad en la detección de una amplia variedad de agentes químicos con una gran diversidad de modos de acción. Sin embargo, en aquellos casos en que los compuestos que se ensayan precisan de activación metabólica, los resultados son dependientes del fondo genético de las líneas probadoras.

Entre los compuestos cuya acción genotóxica está influenciada por las transformaciones metabólicas se encuentran aquéllos que son productores de estrés oxidativo y ello por dos razones. Por una parte, por la capacidad de cada organismo de producir especies reactivas de oxígeno, y por otra por su potencialidad para eliminarlas.

El objetivo de este trabajo ha sido caracterizar un grupo de seis líneas probadoras, previamente ensayadas para otros compuestos, analizando por una parte la respuesta que producen frente a menadiona y paraquat, por otra determinando dos actividades enzimáticas (superóxidodismutasa y catalasa) implicadas en la eliminación del radical superóxido y el peróxido de hidrógeno, respectivamente, y por último, estimando su capacidad de producción neta de radicales libres.



ENSAYO DE CARCINÓGENOS NO GENOTÓXICOS EN EL TEST *WHITE-IVORY*.

Consuegra S, Sierra LM, Ferreiro JA y Comendador MA.

Area de Genética. Dpto de Biología Funcional. Universidad de Oviedo. 33071. Oviedo.

Una amplia variedad de agentes genotóxicos, tanto físicos como químicos han mostrado que son capaces de incrementar la frecuencia de recombinación y de fenómenos asociados a ella. En particular, durante los últimos años se está acumulando cada vez más información acerca del efecto de los agentes genotóxicos en la inducción de recombinación intracromosómica. Schiestl (1989) utilizando un sistema de levaduras, ensayó un gran número de compuestos, incluyendo carcinógenos no genotóxicos, y sugirió que un posible modo de acción de estos agentes era la inducción de ese tipo de recombinación.

El ensayo *white-ivory* ( $w^i$ ) de *Drosophila melanogaster* se basa en la reversión de  $w^i$  a  $w^+$  por la escisión del fragmento duplicado de 2.9 Kb., probablemente como consecuencia de un proceso de recombinación intracromosómica.

En esta comunicación se presentan los resultados obtenidos con este ensayo con los siguientes compuestos: uretano, etionina, tioacetamida, acetamida, auramina, amitrole y safrole. Hasta el momento todos ellos se han testado utilizando tratamientos crónicos desde la fase de huevo, obteniéndose resultados positivos únicamente con uretano, mientras que etionina ha sido débilmente positiva. Por otra parte, ya que el resto de los compuestos ha dado resultados inconcluyentes o negativos en este ensayo, procederemos a estudiar su capacidad genotóxica tras el tratamiento superficial de larvas del segundo estadio.

Los resultados obtenidos con estos compuestos tras ambos tipos de tratamientos serán discutidos en relación con los resultados de Schiestl en levaduras, así como con los obtenidos en otros ensayos SMAR.

EL TEST *WHITE-IVORY* BAJO CONDICIONES DE REPARACION DEFICIENTES.

Ferreiro JA, Consuegra S, Sierra LM y Comendador MA.

Area de Genética. Dpto de Biología Funcional. Universidad de Oviedo. 33071. Oviedo.

El ensayo *white-ivory* ( $w^i$ ) de *Drosophila melanogaster* ha puesto de manifiesto que agentes genotóxicos con diferentes mecanismos de acción, entre los que se incluyen agentes alquilantes monofuncionales, crosslinkers, productores de "bulky adducts", etc, incrementan la frecuencia de reversión del gen  $w^i$ .

Con el objetivo de determinar la influencia que en la frecuencia de reversión pudiera tener el sistema de reparación por escisión, se ha construido una línea deficiente para este sistema ( $C(1)DX,yf/y2,(w^i)_4:mus(2)201$ ).

En un primer acercamiento hemos estudiado la genotoxicidad de cuatro compuestos con diferente mecanismo de acción (MMS, EMS, ENU y HMPA) que habían sido testados previamente con este mismo ensayo en condiciones eficientes de reparación y con una metodología similar.

Los cuatro compuestos mostraron ser positivos incrementando la actividad (estimada como el número de ojos mosaico inducidos por  $\mu\text{M}$  de sustancia) respecto a cuando el ensayo se realiza en condiciones eficientes.

Estos resultados podrían apoyar la hipótesis de la recombinación intracromosómica como el mecanismo de reversión de  $w^i$ .



AMPLIACIÓN DE LOS ESTUDIOS SOBRE EL USO DE MUTANTES *WHITE-IVORY* DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* EN LA DETECCIÓN DE GENOTOXICIDAD.

Suárez, S., Batiste-Alentorn, M., Soriano, S., Cabré, O., Velázquez, A., Xamena, N., Creus, A., Marcos, R.

Unitat de Genètica, Dept. Genètica i Microbiologia, UAB, 08193 Bellaterra.

En estos últimos años hemos realizado diversos estudios sobre la utilización del mutante ligado al sexo *white-ivory* ( $w^i$ ) de *D. melanogaster* en ensayos de detección de mutación y recombinación somática. Esta mutación se caracteriza por la presencia de un fragmento de ADN duplicado de 2,9kb en la posición 2795 del locus *white*. La escisión de este fragmento da lugar a la reversión del fenotipo, lo cual es fácilmente detectable debido a que los mutantes  $w^i$  presentan un color claro de ojos a diferencia del color rojo de los individuos salvajes.

Un sistema alternativo al  $w^i$  es el que presenta una tetraplicación del mismo [ $(w^i)_4$ ], mostrando una mayor sensibilidad a la acción de los mutágenos. Nuestros primeros resultados pusieron de manifiesto que este sistema es sensible a la acción genotóxica de compuestos cancerígenos. En la continuación de dichos estudios, se ha ampliado el número de compuestos analizados a cinco compuestos mutágenos clasificados como no cancerígenos (EPA y NTP). Estos compuestos son: ANP (ácido 3-nitropropiónico), CMP (2-cloro metilpiridina HCl), PDA (p-fenilenediamina 2HCl), NN (1-nitronaftaleno), NOP (4-nitro-o-fenildiamina), de los cuales tan sólo el PDA ha mostrado una respuesta positiva.

A partir de tratamientos crónicos en diferentes estadios larvarios con tres agentes alquilantes EMS, MMS, ENU de individuos pertenecientes a dos cepas, una con una única copia del alelo y la otra con la mutación tetraplicada, se ha analizado la frecuencia inducida de mutación somática y de mutación germinal. Los individuos revertientes obtenidos a partir de la descendencia de dichos tratamientos, se están analizando a nivel molecular con el fin de determinar el tipo de lesión que ha ocasionado tal reversión, presentándose los resultados preliminares obtenidos hasta el momento.

**HIBRIDACION IN SITU FLUORESCENTE (CHROMOSOME PAINTING)  
COMO METODO UTIL PARA DETECTAR ABERRACIONES  
CROMOSOMICAS ESTABLES EN MUTAGENESIS.**

García Sagredo JM, Vallcorba I, Vázquez Mazariego Y, López-Yarto A, Ferro MT.

Servicio de Genética Médica . Hospital Ramón y Cajal, Madrid.

Se han usado librerías cromosómicas marcadas con fluorocromos para *pintar* los cromosomas 1, 2, 3, 4 y 5 y así detectar aberraciones estructurales.

Con el fin de validar esta técnica se ha irradiado sangre in vitro con rayos gamma procedentes de una fuente de  $Co^{60}$  a dosis de 0.3 y 1 Gy. Los linfocitos se han cultivado según las técnicas habituales durante 48 h. Posteriormente los cromosomas se han hibridado con librerías de sondas de cromosomas completos que se detectaban con avidina marcada con fluoresceína. De esta forma, con el microscopio de fluorescencia es posible detectar fácilmente las aberraciones cromosómicas del tipo de deleciones, translocaciones, inserciones, anillos y duplicaciones.

Con el fin de evaluar la a) sensibilidad, b) tiempo, c) eficacia y d) reproducibilidad, los resultados obtenidos se han comparado con el análisis de cromosomas dicéntricos (establecido como dosímetro biológico). Al mismo tiempo, y con el fin de evaluar el número y qué librerías pueden ser más útiles, se ha tenido en cuenta la fracción equivalente de genoma hibridado.

Con los resultados preliminares, podemos concluir que aunque el *pintado* de cromosomas está restringido a pocos cromosomas, la técnica es capaz de detectar fácilmente anomalías cromosómicas del tipo estable, lo que podría ser un indicador de exposiciones crónicas a mutágenos ambientales.

**Agradecimiento:** Este trabajo ha sido realizado gracias a una ayuda del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FISS 93/662).



## SEGUIMIENTO CITOGENETICO EN INDIVIDUOS EXPUESTOS A BAJAS DOSIS DE RAYOS X

Leone P<sup>1, 2</sup>, Córdova A<sup>1</sup>, Gutiérrez S<sup>1</sup>, Peñaherrera MS<sup>1</sup>, Sánchez ME<sup>1</sup> y Paz-y-Miño C<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Genética Humana. Departamento de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica del Ecuador

<sup>2</sup> Dirección actual: Instituto de Investigaciones Biomédicas. calle Arturo Duperier, 4 28029 Madrid

La exposición a agentes físicos como los rayos X (Rx) puede causar una variedad de efectos en la salud, algunos de expresión inmediata y otros tardía. Actualmente, ha despertado mucho interés el estudio de individuos expuestos a dosis bajas de radiación, por la escasez de datos que existen y las dificultades para predecir los riesgos que tendría esta población.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la acción de los Rx a bajas dosis en el personal que trabaja en contacto con este agente mutagénico, a una exposición media de 1,84 mSv/año en la primera muestra y de 1,67 mSv/año, a través de la observación y comparación de la frecuencia y tipos de aberraciones cromosómicas presentes en linfocitos T de sangre periférica de estos individuos en relación a un grupo control en 278.228 cromosomas de 6.000 metafases.

Se estudiaron citogenéticamente 20 individuos mediante técnica estándar. Para el grupo de individuos expuestos a Rx se realizaron dos preparaciones cromosómicas con una diferencia de 12 meses entre la primera y segunda muestra. Se estudiaron 100 metafases por individuo con un número promedio de 46 cromosomas en cada una.

Los resultados de las aberraciones cromosómicas indican que los individuos expuestos a Rx con respecto al grupo control, presentan un aumento en la fragilidad cromosómica y otras alteraciones y variantes cromosómicas con una diferencia estadística altamente significativa ( $p < 0,001$ ). Al comparar los hallazgos citogenéticos entre las dos muestras del grupo de expuestos a Rx con los del grupo control no se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p > 0,05$ ).

Los resultados citogenéticos encontrados sugieren esta metodología como idónea para detectar poblaciones de riesgo por exposición a agentes genotóxicos.



**ANÁLISIS DE 14 PLAGUICIDAS MEDIANTE EL ENSAYO S.M.A.R.T.: COMPARACIÓN ENTRE CRUZAMIENTO ESTÁNDAR Y CRUZAMIENTO DE ALTA BIOACTIVACIÓN**

Osaba L.<sup>(1,2)</sup>, Graf U.<sup>(2)</sup>, Aguirre A.<sup>(1)</sup> y Alonso A.<sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup>Departamento de Biología Animal y Genética. Universidad del País Vasco. <sup>(2)</sup>Institute of Toxicology, Swiss Federal Institute of technology and University of Zurich. Schwerzenbach. Suiza. <sup>(3)</sup>Departamento de Genética. Universidad de Córdoba.

El ensayo de mutación y recombinación somáticas (S.M.A.R.T.) en alas de *D. melanogaster* ha demostrado ser un método eficaz para la detección de compuestos mutagénicos y recombinogénicos, tanto directos como indirectos.

Con el fin de mejorar la capacidad de detección de promutágenos, recientemente se han construido nuevas cepas de *D. melanogaster*, caracterizadas por una alta expresión de enzimas implicadas en el metabolismo de xenobióticos.

En este trabajo presentamos los resultados para 14 plaguicidas, obtenidos en el ensayo S.M.A.R.T. en alas, utilizando dos cruzamientos de *D. melanogaster*: cruzamiento estándar, con cepas originalmente desarrolladas por Graf y col. (1984, 1989) y cruzamiento NORR con cepas de alta capacidad de bioactivación, desarrolladas por Rosana Pacella (Johannesburg, datos no publicados).

El resultado global de los compuestos negativos en el cruzamiento estándar no cambia cuando se utiliza el nuevo cruzamiento. Estos compuestos son: aletrín, dieltrín, endrín, dimetoato, malatión, piperonil-butóxido, profám, trifluoralina, captan y zineb.

El maneb y la etilenetiourea (ETU) presentan resultados positivos en el cruzamiento estándar, mientras que en el nuevo cruzamiento el resultado es negativo para el maneb y positivo para el ETU, sin que se vea aumentada la actividad genotóxica respecto a la detectada en el cruzamiento estándar. Esto sugiere que el modo de activación genotóxica de ambos compuestos es independiente de las enzimas metabólicas.

En cuanto al amitrol y el sulfalato, compuestos positivos cuando se utiliza el cruzamiento estándar, la frecuencia de mutación aumenta considerablemente en el cruzamiento NORR (sobre todo en el caso del amitrol). Esto indica que el nuevo cruzamiento NORR aumenta la eficacia del ensayo S.M.A.R.T. en la detección de promutágenos.

*(L. Osaba ha recibido una beca del Departamento de Educación, Universidades e Investigación del Gobierno Vasco (Programa para la Formación del Personal Investigador)*



**APLICACIÓN DE HIBRIDACIÓN *IN SITU*, ANTICUERPOS ANTICINETOCORO E INHIBIDORES DE LA REPARACIÓN AL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS. ESTUDIO DEL POTENCIAL GENOTÓXICO DE 10 PLAGUICIDAS**

Surrallés J, Xamena N, Creus A y Marcos R.

Unitat de Genètica, Dpt. Genètica i Microbiologia, Univ. Autònoma de Barcelona.

Los micronúcleos (MN) son fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros que se pierden durante la división celular, apareciendo como pequeños núcleos visibles en el citoplasma de la célula dividida.

El origen de los MN puede dilucidarse aplicando técnicas de hibridación *in situ* fluorescente con sondas de DNA centromérico y técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos anticinetocoro, con el fin de discernir entre procesos clastogénicos y aneugénicos. Se asume que la presencia de cinetocoros o centrómeros en un MN indica que éste deriva de un cromosoma entero.

Paralelamente, las lesiones en el DNA reparables por escisión, como alquilaciones y dímeros de timina, pueden convertirse en MN impidiendo el proceso de resíntesis de la reparación por escisión con inhibidores (ARA-C, hidroxiaurea). Las regiones escindidas y no rellenadas darán lugar a roturas de cadena doble tras la replicación y a MN una vez completada la división celular.

Aplicando estas técnicas en cultivos de linfocitos humanos hemos analizado el potencial aneugénico, clastogénico y/o inductor de lesiones genéticas reparables por escisión de 10 plaguicidas previamente estudiados con el ensayo convencional de MN: alacloro, atrazina, cipermetrín, deltametrín, fenpropatrín, fenvalerato, hidrazida maleica, paraquat, permetrín y trifluralina, y otros conocidos agentes genotóxicos : EMS, MMC, MNU, colchicina y vinblastina.

Los resultados obtenidos indican que el alacloro es un clastógeno puro y que el alacloro, el permetrín y la trifluralina parecen inducir lesiones reparables por escisión.

**ESTUDIO DE LA POSIBLE INTERACCIÓN ENTRE EL ÁCIDO HÚMICO Y DISTINTOS HERBICIDAS EN LA INDUCCIÓN DE EFECTOS GENOTÓXICOS EN LINFOCITOS HUMANOS Y EN DROSOPHILA.**

C. Torres, G. Ribas, G. Umbert, N. Xamena, A. Creus y R. Marcos.  
Unitat de Genètica, Dpt. de Genètica i de Microbiologia, UAB, Bellaterra.

Un aspecto importante a considerar en la evaluación genotóxica de los plaguicidas, es el efecto de las interacciones que éstos pueden tener con los diversos componentes del suelo y/o sistemas enzimáticos endógenos. Así pues, que un determinado plaguicida o algunos de sus metabolitos puedan afectar al material hereditario, quedará supeditado al balance de las interacciones que tengan lugar.

El ácido húmico (AH) es uno de los constituyentes principales de la materia orgánica del suelo con el que los herbicidas podrían interactuar. Diversos autores han propuesto una cierta actividad desmutagénica del AH al ser capaz de retener las moléculas potencialmente genotóxicas, alterando así su actuación y consecuentemente su efecto.

Con el fin de tener más información sobre estos aspectos, hemos evaluado el efecto del ácido húmico sobre la potencialidad genotóxica de diversos herbicidas en dos sistemas biológicos distintos: linfocitos humanos y *Drosophila melanogaster*.

En linfocitos humanos hemos estudiado la acción del ácido húmico conjuntamente con cuatro herbicidas (alacloro, atrazina, hidrazida maleica y trifluralina) a distintas concentraciones y tiempos de pre-incubación, utilizando el ensayo de intercambio entre cromátidas hermanas (SCE).

En *D. melanogaster* hemos utilizado el ensayo de mutación y recombinación somática (SMART), y se han evaluado hasta el momento dos compuestos (hidracida maleica y metanosulfonato de etilo), también a distintas concentraciones y tiempos de pre-incubación de ácido húmico.

Los resultados obtenidos en ambos sistemas de ensayo, indican un incremento de la genotoxicidad como resultado de la acción conjunta del ácido húmico y los diversos compuestos estudiados. Así pues, nuestros resultados no corroboran la supuesta acción desmutagénica del ácido húmico, apuntada por otros autores.



### **ESTUDIO CITOGÉNÉTICO LONGITUDINAL DE UNA POBLACIÓN DE TRABAJADORES AGRÍCOLAS**

Carbonell E., Umbert G., Xamena N., Creus A., Marcos R.  
Unitat de Genètica, Dpt. Genètica i Microbiologia, UAB, Bellaterra

Uno de los mayores problemas en los estudios de biomonitorización de poblaciones humanas expuestas a compuestos químicos, es la dificultad de obtener valores fiables del nivel de exposición. En el caso de trabajadores agrícolas expuestos a plaguicidas, se observan variaciones temporales en el nivel de exposición, expresado como el número de horas dedicadas a la aplicación de compuestos fitosanitarios.

Para averiguar la relación entre el nivel de exposición a plaguicidas y la aparición de alteraciones citogenéticas se analizaron, a lo largo de un año, las aberraciones cromosómicas (AC) y los intercambios entre cromátidas hermanas (SCE) en linfocitos de sangre periférica. Las muestras se obtuvieron de un grupo de 38 agricultores en dos periodos distintos.

El análisis de los datos apareados de cada individuo obtenidos en un periodo de máxima exposición (mayo-julio) y en un periodo de menor exposición, tras el descanso estival (septiembre-diciembre), indica que, si bien no existen diferencias en la frecuencia de SCE, los plaguicidas inducen aberraciones, principalmente roturas de tipo cromatídico, durante la época de mayor exposición ( $4.90 \pm 0.45$  roturas cromatídicas/100 células analizadas), mientras que posteriormente descienden a niveles inferiores ( $2.25 \pm 0.29$ ), equivalentes a los encontrados en poblaciones no expuestas.

Estos resultados indican la elevada reversibilidad de las AC y, por tanto, la importancia que tiene el periodo de muestreo en la evaluación del riesgo genotóxico de las poblaciones estudiadas.

MUTAGENICIDAD/CARCINOGENICIDAD DE LOS PLAGUICIDAS EN EL SISTEMA COMUNITARIO

Herrera A., Caballo C., Valcarce E., Serrano E. Tacoronte E., y Fresno A.

Subdirección General de Sanidad Ambiental. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid.

En el ámbito legislativo de la CEE la Directiva 67/548/CEE recoge los procedimientos para la evaluación toxicológica de las sustancias, así como una lista con la clasificación y etiquetado de las sustancias peligrosas. Dicha lista se va modificando a la luz de los conocimientos científicos y técnicos actuales. En la 19ª adaptación al Progreso Técnico de la citada Directiva y, en lo que respecta a las sustancias plaguicidas, figuran la clasificación y etiquetado de alrededor de 350 de los plaguicidas más conocidos.

En la presente comunicación se hace una revisión de la clasificación toxicológica de los plaguicidas en el sistema comunitario; encontrándose que 35 de ellos están clasificados como Carcinogénicos y/o Mutagénicos de los cuales solamente 10 están clasificados como Mutagénicos.

El objetivo de esta comunicación es, por una parte, dar a conocer los criterios que se utilizan actualmente para asignar las distintas categorías de Mutagénesis y Carcinogénesis así como la estrategia que se está siguiendo en la Comunidad a la hora de evaluar la mutagenicidad de un determinado producto químico y por otra parte, dar a conocer como se encuentran clasificados en cuanto a Mutagenicidad/Carcinogenicidad los plaguicidas en el sistema comunitario.



PAPEL DE LAS MFO EN LA ACTIVACION DEL 2-AF MEDIADA POR S9 DE RATA Y FRACCIONES DE *Persea americana*.

C. Chiapella, J. Riera E. Rivera y M. Llagostera

Unitat de Microbiologia. Dept. de Genètica y Microbiologia. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra.

Se ha descrito que los vegetales, al igual que los mamíferos, pueden activar promutágenos (1,2). Con el fin de profundizar en el papel de los vegetales en la activación de promutágenos ambientales, se han desarrollado diferentes sistemas que utilizan plantas intactas o diferentes fracciones de vegetales. También es conocido que los metabolitos finales con actividad mutagénica pueden ser distintos si la activación es debida a animales o a vegetales (1,2). En este último caso se han descrito dos vías enzimáticas principales responsables de la activación: la de las oxidasas de función mixta (MFO) que implica al citocromo P-450 (cit P450) (3) y la de las peroxidasas.

Así, en nuestro laboratorio se ha demostrado que la activación del 2-aminofluoreno (2-AF) mediante la fracción S2 de *Zea mays* debe ser atribuida a una actividad peroxidasa (4).

Pocos datos hay acerca del papel de las MFO de vegetales en la activación metabólica. Con el fin de conocer el papel de este sistema enzimático hemos desarrollado un sistema de activación *in vitro* basado en fracciones de *Persea americana* (aguacate) con un contenido significativo en cit P450 capaz de activar el 2-AF (5). En este trabajo se presentan los resultados obtenidos al comparar la activación del 2-AF mediada por la fracción S9 de rata o por la fracción S115 de aguacate. Así mismo también se ha estudiado la posible participación de la actividad peroxidasa presente en los extractos en la activación del 2-AF.

- (1) Sandermann Jr, H. (1988) Mutagenic activation of xenobiotics by plant enzymes. *Mutation Res.*, 197, 183-194.
- (2) Higashi, K. (1988) Metabolic activation of environmental chemicals by microsomal enzymes of higher plants. *Mutation Res.*, 197, 272-288.
- (3) Riviere, J.L. and F. Cabanne (1987) Animal and plant cytochrome P-450 systems. *Biochimic.* 69, 743-752.
- (4) Ysem, P. et al (1994) Activation of 4-nitro-*o*-phenylenediamine by the S2 fraction of *Zea mays* to mutagenic product(s). *Mutation Res.*, 312, 25-31.
- (5) Chiapella, C. et al (1993) Comunicación del 23º miting de la EMMS, Barcelona.

**ACTIVACION DE AMINAS AROMATICAS EN MOLUSCOS PROCEDENTES DE ZONAS CON DIFERENTES NIVELES DE POLUCION.**

FM Díaz-Méndez\*, A Rodríguez-Ariza#, C Pueyo\*, J López-Barea#. Dpto. de Genética\* y Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular# de la Universidad de Córdoba. 14071-Córdoba.

La fracción S9, obtenida normalmente a partir de hígado de rata, contiene los sistemas enzimáticos responsables de las reacciones de biotransformación implicadas en la activación de promutágenos. Algunos de estos sistemas enzimáticos se encuentran también en moluscos. Este trabajo investiga la activación de 2-aminoantraceno (2-AA) y 2-acetilaminofluoreno (AAF) por fracciones S9 obtenidas de chirlas (*Chamelea gallina*) o mejillones (*Mytilus edulis*) procedentes de áreas con diferentes niveles de polución. La estirpe bacteriana indicadora de mutagenicidad sobreproduce O-acetiltransferasa, por lo que manifiesta una especial sensibilidad a la activación de aminas aromáticas. La capacidad de activación de las muestra fue diferente para cada mutágeno. En general, las mayores diferencias según el lugar de origen de la muestra se observó respecto a la activación de 2-AA. Los sistemas enzimáticos implicados en la activación de 2-AA y AAF se investigaron mediante estudios con inhibidores específicos de monooxigenasas microsomales. Los resultados de los estudios de activación se compararon en el caso de chirlas con la actividad mutagénica de extractos de los animales.

Financiación: CICYT AMB-628/93, Plan Andaluz de Investigación (Grupos 3106 y 3167) y Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía.



**ACTIVACION DE AMINAS AROMATICAS EN HIGADO DE PECES:  
EFECTO DEL TRATAMIENTO CON XENOBIOTICOS.**

A Rodríguez-Ariza<sup>#</sup>, FM Díaz-Méndez\*, J López-Barea<sup>#</sup>, C Pueyo\*.  
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular<sup>#</sup> y Dpto. de Genética\* de la  
Universidad de Córdoba. 14071-Córdoba.

Por lo general, en la activación de promutágenos participan múltiples enzimas. Una de las primeras etapas en la activación metabólica de aminas aromáticas, tales como 2-aminoantraceno (2-AA) ó 2-acetilaminofluoreno (AAF), requiere, al menos en mamíferos, la actuación de monooxigenasas microsomales. En uno de los últimos pasos actúa la enzima citosólica O-acetiltransferasa que se encuentra también en bacterias. En este trabajo se estudió la activación metabólica de 2-AA y AAF por fracciones de S9 procedentes de hígado de doradas (*Sparus aurata*) tratadas con Aroclor-1254, malatión, dieldrina o cobre. Como indicadora de mutagenicidad se usó una estirpe de *Salmonella typhimurium* sobreproductora de O-acetil transferasa. El tratamiento de las doradas con Aroclor, malatión o dieldrina incrementó la activación de ambos promutágenos. Estudios con inhibidores de monooxigenasas microsomales indicaron que la ruta de activación es diferente para cada uno de los promutágenos y, al menos en el caso de 2-AA, depende del tipo de xenobiótico usado en el tratamiento.

Financiación: CICYT AMB-628/93, Plan Andaluz de Investigación (Grupos 3106 y 3167), y Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía.

HIPERMUTABILIDAD PRODUCIDA POR LA MUTACIÓN *mus308* DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*.

Aguirrezabalaga I, Sierra L M y Comendador M A.

Área de Genética. Departamento de Biología Funcional. Universidad de Oviedo. 33071 Oviedo.

La mutación *mus308* de *Drosophila melanogaster* ha sido propuesta como modelo para el estudio de la enfermedad conocida como anemia de Fanconi ya que presentan fenotipos muy similares. En ambas se observa una elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas, hipersensibilidad específica a agentes productores de enlaces cruzados y una nucleasa mitocondrial se encuentra modificada. Existen abundantes indicios de que estas mutaciones llevan asociada una deficiencia en la reparación de enlaces cruzados en el DNA. No obstante, dado que hasta el momento esta hipersensibilidad de los mutantes *mus308* solamente ha sido demostrada como mortalidad larvaria, nos ha parecido conveniente comprobar si también ocurre en términos de mutagenicidad (hipermutabilidad). Si se conoce el modo de acción de un determinado compuesto, el estudio de la hipermutabilidad que produce permite hacer una aproximación a la función controlada por el gen en cuestión. Para determinar si el índice de hipermutabilidad ( $h = f_T^- - f_C^- / f_T^+ - f_C^+$ ) es significativamente distinto de 1 se ha diseñado una técnica estadística mediante una aproximación de la distribución binomial a la normal. Los compuestos escogidos para probar la respuesta del mutante *mus308* han sido dos inductores de enlaces cruzados, HMPA y HMM, y dos alquilantes monofuncionales de distinto modo de acción, MMS y ENU.

Los resultados refuerzan la teoría de que el locus *mus308* participa en la reparación de enlaces cruzados en el DNA ya que la línea mutante presentaba hipermutabilidad frente a ambos agentes multifuncionales. Además, no se observó hipermutabilidad con MMS, que induce lesiones que se sabe que son reparadas fundamentalmente por el sistema de reparación por escisión. Por otra parte, la hipermutabilidad encontrada con ENU parece indicar que la reparación de alguna de las lesiones inducidas por este compuesto tiene algún paso común con la reparación de lesiones producidas por agentes multifuncionales.



## MUTAGÉNESIS EN SITIOS DE RESTRICCIÓN (RSM) APLICADA A DNA BACTERIANO

**Leal JFM, Kostic T, Abril N\*, López-Barea J, Pueyo C\*, Dorado G**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Veterinaria, (\*: Departamento de Genética,  
Facultad de Ciencias), 14071 Córdoba (Spain)  
Tel: +57 218689; Fax: +57 218666; Email: bb1dopeg@lucano.uco.es

La poderosa técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede aplicarse a la detección de mutaciones en sitios de restricción mediante la denominada "Mutagénesis en Sitios de Restricción" o RSM (Restriction Site Mutagenesis). Su fundamento se basa en que las moléculas de DNA mutadas en un determinado sitio de restricción serán insensibles a dicha restrictasa y podrán ser posteriormente amplificadas de forma exponencial mediante PCR. Para determinar la aplicabilidad de la RSM a la detección de mutaciones bacterianas se han seleccionado secuencias de los genes *araA* de *Salmonella typhimurium* y *lacI* de *Escherichia coli*.

Los resultados obtenidos indican que un paso esencial en la técnica RSM es la digestión completa de las secuencias mutantes antes de amplificar la mezcla mediante PCR. Basta que unas pocas moléculas silvestres escapen la restricción previa a la PCR para que se generen falsos positivos. Experimentos realizados con el gen *araA* de *S. typhimurium* han mostrado que diferentes enzimas de restricción presentan diferentes eficiencias reales de corte del DNA, debiéndose optimizar en cada caso las condiciones para alcanzar un 100% de eficiencia. Ello es así incluso para restrictasas comerciales cuya supuesta eficiencia de corte es del 100%. Los datos de que se dispone indican además diferente comportamiento en RSM de DNAs procedentes de cromosomas o episomas bacterianos.

Dada la gran sensibilidad del sistema (detección de 1-3 copias de DNA mutante en presencia de  $10^7$  copias de DNA silvestre) se han diseñado experimentos más complejos de mutagénesis, empleando diferentes agentes mutagénicos y estirpes bacterianas con diversas capacidades de reparación. Los espectros mutagénicos generados nos permitirán obtener interesantes conclusiones acerca de la acción diferencial de los distintos mecanismos de reparación sobre la acción de diversas genotoxinas.

Financiado por EEC EV5V-CT91-0004, CICYT SAF92-0995-CE y CICYT PB91-0846



**APLICACIÓN DE LA MUTAGÉNESIS EN SITIOS DE RESTRICCIÓN (RSM) A  
DNA HUMANO**

**Dorado G, Leal JFM, López-Barea J**

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Veterinaria, 14071 Córdoba (Spain)  
Tel: +57 218689; Fax: +57 218666; Email: bb1dopeg@lucano.uco.es*

La mutagénesis en Sitios de Restricción (RSM) es un sistema genotípico de detección de mutaciones que se vale de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar exponencialmente secuencias mutantes en sitios de restricción. Para lograr este objetivo el DNA a analizar es primero digerido con la enzima de restricción elegida, a fin de cortar todas y cada una de las moléculas silvestres. Posteriormente la mezcla de reacción se somete a amplificación por PCR.

Dada la alta sensibilidad que hemos obtenido al aplicar la metodología RSM a DNA bacteriano (detección de 1-3 copias de DNA mutante en presencia de  $10^7$  copias de DNA silvestre) se ha procedido a adaptar dicha metodología a la detección de mutaciones en DNA cromosómico humano. Para ello se ha elegido el gen P53 como blanco de mutagénesis, empleado diversas líneas celulares que en experimentos futuros se someterán a diferentes tratamientos mutagénicos.

La adaptación de RSM a DNA humano requiere tener en cuenta una característica diferencial esencial respecto a los modelos bacterianos: la complejidad del material de partida. Por ejemplo, si suponemos una frecuencia de mutación de  $10^{-6}$ , ello significa que para encontrar 1 molécula mutante necesitaríamos sólo 10 ng de DNA bacteriano, mientras que requeriríamos 10  $\mu$ g de DNA humano. En definitiva, la mayor cantidad de DNA de partida requiere también un control más exhaustivo de la metodología experimental.

Los resultados obtenidos hasta la fecha indican que es necesario optimizar las condiciones de reacción en dos flancos principales: a) por un lado el DNA obtenido debe ser de gran pureza para garantizar su total restricción; y b) por otra parte, las condiciones de restricción deben ser aún más exhaustivas que en los experimentos de RSM con DNA bacteriano.

Financiado por EEC EV5V-CT91-0004, CICYT SAF92-0995-CE y CICYT PB91-0846



LA TÉCNICA RE/PCR APLICADA A LA DETERMINACIÓN *IN VIVO* DE ESPECTROS DE MUTACIÓN SOMÁTICOS EN *DROSOPHILA MELANOGASTER*.

Santamaría I, Aguirrezabalaga I, Comendador MA y Sierra LM.

Area de Genética. Dpto de Biología Funcional. Universidad de Oviedo. 33071. Oviedo.

El estudio de los espectros de mutación inducidos por agentes mutagénicos es probablemente la herramienta más útil en el análisis de los mecanismos de acción de estos compuestos, y también aporta información cuantitativa muy importante en la estimación de riesgo genético.

Desde ambos puntos de vista, sería muy conveniente la obtención de espectros de mutación inducidos en la línea germinal de mamíferos. Debido a los obvios inconvenientes que esta aproximación presenta, se están obteniendo espectros de mutación, generalmente inducidos *in vitro*, aunque también *in vivo*, en células somáticas de mamífero, en un intento de, junto con datos de dosimetría molecular, cerrar el paralelogramo de Sobels. Sin embargo, dada la diferencia entre células somáticas y germinales, esta información debería tomarse con cautela.

Por otro lado, *D. melanogaster* es un organismo que, en estudios moleculares, se está revelando como una clara alternativa, no sólo por las facilidades que presenta, sino también por los resultados obtenidos, fácilmente extrapolables a los de mamíferos. Los resultados obtenidos hasta el momento, con el locus *vermilion* como blanco, tanto en células germinales postmeióticas como premeióticas, avalan esta afirmación. Sin embargo, todavía no se ha desarrollado ningún método de obtención de espectros de mutación *in vivo* en células somáticas, a pesar de la importancia que podría tener desde los dos puntos de vista mencionados anteriormente.

En esta comunicación se presentan los resultados obtenidos hasta el momento en la aplicación de la técnica RE (enzimas de restricción)/PCR a la obtención de espectros somáticos *in vivo*, utilizando *vermilion* como blanco.

**ESPECIFICIDAD MUTAGENICA DE LA AFB<sub>1</sub> EN LOS GENES *lacI*  
Y *supF* DE *Escherichia coli***

Abril N., Prieto-Alamo M.J., Luque-Romero F.L. y Pueyo C.

*Departamento de Genética. Instituto de Biología Básica y Aplicada. Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba. 14071-Córdoba. España.*

La AFB<sub>1</sub> es un potente hepatocarcinógeno producido por ciertos hongos que se presenta como contaminante alimentario. En este trabajo se ha determinado el espectro mutacional de la AFB<sub>1</sub> a nivel de secuenciación de ADN, utilizando dos sistemas que tienen como blancos genéticos los genes de *E. coli lacI* (en un factor F') y *supF* (en un vector lanzadera). Se utilizaron estirpes *uvrB*<sup>-</sup> pKM101<sup>+</sup> y S9 de hígado de rata. Se analizaron 105 mutantes *lacI*<sup>d</sup> y 31 mutantes *supF*<sup>-</sup>, obtenidos a dosis de AFB<sub>1</sub> (2,5 μM y 5 μM) que determinaron una supervivencia en torno al 5% y un incremento en la frecuencia de mutación de 43 veces (*lacI*<sup>C</sup>) y 6 veces (*suF*<sup>-</sup>). El 99% (*lacI*) y el 84% (*supF*) de las mutaciones analizadas fueron sustituciones. Con el sistema *supF* se obtuvo un 13% de desfases y un 6.5% de deleciones (1% y 0% respectivamente en *lacI*). Dentro de las sustituciones, con ambos sistemas se encontró un predominio de transversiones (80%) y de mutaciones en pares G:C (80-90%). Con el sistema *lacI* se detectaron todos los tipos posibles de sustituciones, predominando G>T (47%), G>A (16%) y G>C (15%); estas últimas no se habían detectado antes en bacterias. Con el sistema *supF* no se detectaron cambios A>G ni A>C, posiblemente a causa del bajo número de mutantes aún secuenciados; el resto de las sustituciones ocurrieron con frecuencias muy similares a las del sistema *lacI*. Los porcentajes de sustituciones en pares G:C concuerdan con los señalados por Kunkel para la incorporación de bases frente a sitios AP generados por pérdida de G, corroborando la hipótesis de que los sitios AP son intermediarios premutagénicos del aducto N<sup>7</sup>-guanilo generado por AFB<sub>1</sub> y descrito como el principal responsable de su actividad mutagénica. En el sistema *lacI*, las transversiones G>T mostraron una alta preferencia de secuencia 5'-CG<sup>G</sup>/<sub>C</sub>-3' y de la cadena que no se transcribe. Cuando se despreciaron los puntos calientes, se mantuvo la preferencia de secuencia 5'-PyG.

[Subvencionado por: CEE (EV5V-CT92-0227) y CICYT (AMB93-1439-CG)]



**ESPECTRO DE MUTACIÓN INDUCIDO POR EMS EN EL GEN *supF*:  
MUTAGÉNESIS *in vitro* vs MUTAGÉNESIS *in vivo* EN *Escherichia coli***

Ferrezuelo F., Jurado J., Luque-Romero F.L., Hera C. y Pueyo C.

Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba, 14071-Córdoba,  
Tel. (957) 21 86 01, Fax (957) 21 86 06

El gen *supF* es un gen bacteriano que se utiliza como blanco genético en la determinación de espectros de mutación en células de mamífero. En estos experimentos, un plásmido portador de *supF* se trata *in vitro* con una determinada dosis de mutágeno en un medio tamponado. Seguidamente el ADN con las lesiones se utiliza para transformar las células, en las que dichas lesiones se repararán o darán lugar a mutaciones. El objetivo de este trabajo es comparar, en bacterias, el espectro de mutación del EMS *in vitro* con el espectro obtenido *in vivo*, en el que bacterias previamente transformadas con el plásmido portador de *supF* se someten al tratamiento mutagénico. Las bacterias utilizadas fueron completamente deficientes en los sistemas de reparación conocidos (*uvr*, *ada*, *ogt*) de las lesiones inducidas por agentes etilantes, para evitar la influencia de los mismos en el espectro final.

*In vivo*, las transiciones G > A se acumularon en la cadena sin sentido (la que no se transcribe). Dado que las bacterias no reparan, este sesgo no se puede explicar por una preferencia de la reparación de los daños inducidos por el EMS en la cadena con sentido. El espectro *in vitro* presentó dos diferencias fundamentales con el espectro *in vivo*: (i) la frecuencia de las transiciones G > A en las posiciones 123 y 168 (los dos puntos calientes más importantes), y (ii) la ausencia de sesgo hacia la cadena sin sentido. Se han llevado a cabo una serie de experimentos de reconstrucción con el fin de averiguar la influencia que sobre los espectros *in vitro* pudiese tener la mayor o menor tasa de crecimiento de bacterias portadoras de diferentes mutaciones en el gen *supF*.

*In vitro* se han comparado, en un fondo *ogt*, los espectros inducidos por EMS en bacterias *ada*<sup>+</sup> y *ada*<sup>-</sup>, no observándose diferencias significativas. Esto está de acuerdo con el escaso papel de Ada en la reparación de la O<sup>6</sup>-etilguanina y de la O<sup>6</sup>-etilimidina.

(Financiación: EV5V-CT91-0012, PB91-0846 y SAL91-0842-CE)



ESPECIFICIDAD MUTAGENICA DE AGENTES ALQUILANTES EN *Escherichia coli*.  
INFLUENCIA DE LA ALQUILTRANSFERASA CONSTITUTIVA (PROTEINA OGT).

Vidal A., Abril N. y Pueyo C.

Dpto. Genética, Instituto de Biología Básica y Aplicada. Facultad de Ciencias.  
Universidad de Córdoba. 14071-Córdoba, España.

El análisis de las alteraciones genéticas a nivel de la secuencia de ADN es una importante herramienta en la investigación de los mecanismos de mutagénesis. Los espectros de mutación aportan una valiosa información acerca del papel de las lesiones premutagénicas y de los sistemas de reparación que intervienen en el proceso mutagénico. El sistema *lacI* es uno de los métodos desarrollados para la obtención de espectros de mutación. Los mutantes se seleccionan en un medio que contiene un azúcar no inductor (Pgal) como única fuente de carbono. A continuación mediante un sencillo test de complementación se seleccionan las mutaciones que afectan a los primeros 180 pb(*lacI<sup>d</sup>*). En este trabajo se ha investigado la especificidad reparadora de la alquiltransferasa constitutiva codificada por el gen *ogt* de *E. coli*, mediante la obtención del espectro de mutación inducido por EMS en una estirpe deficiente (*ogt<sup>-</sup>*) en comparación con su parental (*ogt<sup>+</sup>*). Para evitar interferencias con el mecanismo fiel de reparación por escisión, los espectros se obtuvieron en un fondo genético *uvrB<sup>-</sup>*. Dado que Ogt es una proteína "suicida" y se encuentra en las células en cantidades limitadas, en la estirpe *ogt<sup>+</sup>* se comparó el espectro de mutación a 2 dosis de EMS, 100µM (dosis no saturante) y 200µM (dosis saturante). El espectro en la estirpe *ogt<sup>-</sup>* se obtuvo a 50µM, dosis que induce una frecuencia de mutación similar a la inducida por 200µM de EMS en la estirpe *ogt<sup>+</sup>*. De acuerdo con estudios previos, se observó una marcada preferencia por la inducción de transiciones G>A (100% en todos los casos) como consecuencia del papel predominante de la lesión O<sup>6</sup>-etilguanina en la mutagénesis por EMS. El número de sitios mutados y la distribución de las mutaciones varió con la estirpe y la dosis de EMS. El análisis de los espectros reveló una preferencia de la proteína Ogt por la reparación de aquellos aductos O<sup>6</sup>-etilguanina precedidos en 5' por un par C/G. Este sesgo sugiere para la proteína Ogt un mecanismo de acción complementario al del sistema de reparación por escisión, el cual repara preferentemente lesiones flanqueadas por pares A/T. De esta forma, ambos sistemas de reparación actuarían abarcando el conjunto del espectro de mutaciones. Los resultados obtenidos con EMS (etilante de tipo Sn-2) se han contrastado con los espectros de mutación inducido MNU (metilante de tipo Sn-1) en estirpes *ada<sup>-</sup> ogt<sup>+</sup>* vs *ada<sup>-</sup> ogt<sup>-</sup>*.

[Subvencionado por: CEE (EV5V-CT91-0012) y CICYT (SAL91-0842-CE y PB91-0846)]



EL ESPECTRO DE MUTACION INDUCIDO POR DES EN CONDICIONES DEFICIENTES DE REPARACION POR ESCISION EN *DROSOPHILA MELANOGASTER* DEPENDE DE LA DOSIS.

Sierra LM, Comendador MA y Aguirrezabalaga I.

Area de Genética. Dpto de Biología Funcional. Universidad de Oviedo. 33071. Oviedo.

Con objeto de analizar la influencia que la reparación por escisión de nucleótidos tiene en la reparación de las lesiones inducidas por DES en estadios postmeióticos de *D. melanogaster*, se ha realizado un espectro molecular de mutación en condiciones de reparación materna deficiente, locus *mus201*, y utilizando como blanco el gen *vermilion*, para el que se conoce el espectro en condiciones normales.

Los resultados de frecuencia de mutación tanto de *vermilion* como del ensayo *SLRL*, realizado paralelamente, ponen de manifiesto que parte de las lesiones inducidas por este compuesto se reparan por escisión.

El análisis del espectro de mutación, constituido hasta el momento por 16 mutaciones, revela una gran influencia de la dosis. Para dosis bajas (6,3% de *SLRL*), el espectro está compuesto exclusivamente por transiciones, tanto GC-AT como AT-GC, con una frecuencia de mutación en *vermilion* de  $1,9 \times 10^{-4}$  y  $0,3 \times 10^{-4}$ , respectivamente. Sin embargo con dosis altas (23,7% de *SLRL*) las frecuencias de los diferentes tipos de mutación cambian drásticamente: transiciones  $5,4 \times 10^{-4}$ , transversiones  $3,2 \times 10^{-4}$  y deleciones  $3,2 \times 10^{-4}$ .

La comparación con el espectro inducido en condiciones normales, considerando también mutaciones inducidas con dosis altas y bajas, demuestra que el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos participa en la reparación de las lesiones inducidas por DES tanto en átomos de oxígeno como de nitrógeno. Además, los resultados ponen de manifiesto que la dosis es fundamental en la capacidad de detectar la reparación de la lesión *O<sup>6</sup>-etilG*.

LA MAYORÍA DE LAS MUTACIONES INDUCIDAS POR ENU EN ESPERMATOGONIAS DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*. OCURREN EN SITIOS AT

Tosal, L.; Comendador, M. A. y Sierra, L. M.

Area de Genética. Dpto de Biología Funcional. Universidad de Oviedo. 33071. Oviedo.

El espectro molecular de ENU ha sido analizado en muchos organismos y sistemas *in vitro*, obteniéndose, en la mayoría de las situaciones, que está constituido fundamentalmente por transiciones GC → AT. Sin embargo, todos estos resultados podrian no ser válidos bajo el punto de vista de estimación de riesgo, ya que en estadios premeióticos de mamífero este compuesto induce mayoritariamente mutaciones en sitios A:T.

En un intento de analizar la posible utilidad y validez de *D. melanogaster* en estudios de riesgo genético, en el presente trabajo se analiza el espectro molecular inducido por ENU en estadios premeióticos, usando el locus *vermilion* como blanco. Se han recuperado un total de 37 mutantes, pertenecientes a 18 clusters independientes, 10 en F<sub>1</sub> y 8 en F<sub>2</sub>.

Se han analizado molecularmente 19 mutantes, pertenecientes a 14 clusters, con el siguiente resultado: 2 transiciones GC → AT (16.6 %), 6 transiciones AT → GC (50 %), 3 transversiones AT → TA (25 %), 1 transversión GC → TA (8.3 %), y 3 mutantes sin mutación en la región estructural del gen *vermilion*. Al igual que ocurre en mamíferos, el principal blanco de mutación en espermatogonias de *D. melanogaster*, tras el tratamiento con ENU, son los sitios A:T (75 %), probablemente resultado de la etilación de los átomos de oxígeno de la timina. Nuestros resultados muestran que, mientras que no existe preferencia hacia ninguna de las cadenas del DNA, si que existe en la secuencia que precede a la base dañada.

Aunque el número de mutaciones secuenciadas debe aún incrementarse, estos datos apuntan una significativa utilidad de los espectros moleculares de mutación en estadios premeióticos de *D. melanogaster* en estudios de evaluación de riesgo genético.



**ANÁLISIS MOLECULAR DE MUTANTES DE *Drosophila melanogaster* OBTENIDOS A PARTIR DE CEPAS PORTADORAS DEL RETROTRANSPOSÓN *B104* INSERTO EN EL LOCUS *WHITE*.**

S. Soriano, S. Suárez, A. Velázquez, A. Creus, R. Marcos, O. Cabré y N. Xamena. *Unitat de Genètica, Dpt. de Genètica i Microbiologia, Univ. Autònoma de Barcelona.*

La respuesta de un sistema genético frente a la acción de determinados agentes físicos y/o químicos puede verse influenciada por la presencia de elementos móviles.

Nuestro primer objetivo fue el estudio de la reversión inducida en diversos mutantes del locus *white* de *Drosophila melanogaster*, debidos a la inserción de diferentes elementos del tipo *copia*, tras el tratamiento con distintos agentes alquilantes.

Posteriormente, se ha ampliado este estudio analizándose los efectos de estos agentes sobre la línea germinal de los mismos mutantes, dado que existen diversos ejemplos que demuestran que los transposones pueden actuar de forma distinta en la línea germinal y en la somática.

A partir de los estudios en la línea germinal hemos obtenido individuos revertientes así como otros mutantes, que están siendo analizados a nivel molecular para determinar el tipo de lesión que los ha ocasionado.

En esta comunicación se presentan los resultados de los estudios de mutación realizados en la línea germinal y los del análisis a nivel molecular de los mutantes fenotípicos de la cepa *white spotted-1* ( $w^{sp1}$ ), portadora del elemento *B104* en la zona reguladora del locus *white*.

## LISTA DE PARTICIPANTES

· Abril Díaz, M. N.	2,19,22,24
· Aguirre Escobal, A.	10
· Aguirrezabalaga Gonzalez, I.	18,21,25
· Alejandro Durán, E.	-
· Alonso Moraga, A.	10
· Baldrich Rubio, E.	-
· Batiste-Alentorn Guillen, M.	7
· Caballo Dieguez, C.	14
· Carbonell Teruel, E.	13
· Cabré Fabrè, O.	7,27
· Chiapella Mico, C.	15
· Clerch Juan, B.	-
· Comendador García, M. A.	C2,4,5,6,18,21,25,26
· Consuegra del Ocro, S.	5,6
· Cortés, F.	C1,3
· Córdova, A.	9
· Cosano León, F. J.	-
· Cousinou Rodriguez, M.	-
· Creus Capdevilla, A.	1,7,11,12,13,27
· Díaz Méndez, F. M.	16,17
· Domínguez, I.	3
· Dorado Pérez, G.	19,20
· Ferreiro Ríos, J. A.	5,6
· Ferrezuelo Muñoz, F.	23
· Ferro, M.T.	8
· Flores Sanabria, M. J.	3
· Fresno, A.	14
· Gaivao, I.	4
· García Sagredo, J. M.	8
· Graf, U.	C4,10
· Guevara Mayorga, I.	-
· Gutierrez Enriquez, S. I.	9
· Hera Díaz de Liaño, M. .	23
· Herrera, A.	14



Jurado Carpio, J.	23
Kostic, T.	19
Leal, J.F.M.	19,20
Leone Campo, P.	9
López Baena, M.	-
López Barea, J.	C3,16,17,19,20
López-Yarto, A.	8
Luque-Romero, F.L.	22,23
Llagostera, M.	15
Marcos Dauder, R.	1,7,11,12,13,27
Mateos, J.C.	3
Mesa Gutierrez, M. D.	-
Ortíz, T	C1
Osaba Ortíz de Mendibil, L.	10
Palitti, F.	C1
Pardo Abril, G. A.	-
Paz y Miño, C.	9
De la Peña Torres, E.	-
Peñaherrera, M.S.	9
Piñero Bustamante, J.	C1,3
Pitarque Martí, M.	-
Prieto Alamo, M. J.	2,22
Pueyo de la Cuesta, C.	2,16,17,19,22,23,24
Riera, J.	15
Ribas Despuig, G.	1,12
Rivera, E.	15
Rodríguez Ariza, A.	16,17
Ruíz Laguna, J.	2
Sánchez, M.E.	9
Sarasin, A	C5
Santamaría Ruíz de Azua, I.	21
Saraza Linares, M. R.	-
Serrano, E.	14
Sierra Zapico, M.	5,6,18,21,25,26
Soriano Valverde, S.	7,27
Suarez Figueras, S.	7,27
Surrallés Calogne, J.	11
Tacoronte, E.	14
Torres Turón, C.	1,12

ˆ Tosal Pelaez, L.	26
ˆ Umbert Maestre, G.	1,12,13
ˆ Valcarce, E.	14
ˆ Vallcorba, I.	8
ˆ Vázquez Mazariego, Y.	8
ˆ Velazquez Henar, M. A.	7,27
ˆ Vidal Romero, A. E.	24
ˆ Xamena López, N.	1,7,11,12,13,27

### **CONFERENCIANTES**

Cortés, F.	C1
Comendador, M.A.	C2
López-Barea, J.	C3
Graf, U.	C4
Sarasin, A.	C5