

## SEGUNDO TALLER SOBRE SMART: UN MÉTODO PARA DETECTAR LAS ACTIVIDADES MUTAGÉNICA Y RECOMBINOGÉNICA EN CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila* EN LA UNIVERSIDAD FEDERAL DE UBERLANDIA (MG), BRASIL

### SECOND WORKSHOP AT THE FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLANDIA-UBERLANDIA (MG) - (Brazil): SMART: A METHOD FOR THE DETECTION OF MUTAGENIC AND RECOMBINAGENIC ACTIVITY IN SOMATIC CELLS OF *Drosophila*

Mario A. Spanó<sup>1</sup> y Ulrich Graf<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Genética y Bioquímica, Universidad Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, 38400-902 Uberlândia, MG, Brasil

<sup>2</sup> Instituto de Toxicología, Swiss Federal Institute of Technology (ETH) Zurich, CH-8603 Schwerzenbach, Switzerland

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, ofrece una serie de ventajas como sistema de prueba eucariótico de genotoxicidad *in vivo*. Es fácil de cultivar, su ciclo de generación es corto y los ensayos somáticos son baratos porque sólo se requiere de equipo de laboratorio básico y de bajo costo. Además de los sistemas de prueba bien establecidos y validados que utilizan células germinales, especialmente el de letales recesivos ligados al sexo, se han desarrollado otros como el de las células del ojo y del ala de los discos imagales. Estas pruebas de mutación y recombinación somáticas (SMART) son ensayos de una sola generación y utilizan marcadores recesivos que se expresan en la superficie de los ojos o de las alas de las moscas adultas. La inducción de la pérdida de heterocigosis de marcadores en las células de los discos imagales de las larvas mediante tratamiento con compuestos genotóxicos, conduce a la formación de un clon de células mutantes que después de la metamorfosis se expresan como manchas en los ojos o en las alas. La principal ventaja de estos sistemas de prueba somáticos reside en el hecho de que no sólo detectan varios tipos de eventos de mutación, sino que básicamente inducen la recombinación mitótica. La prueba de la mancha del ala ofrece la ventaja de que en cada experimento es posible cuantificar la actividad recombinogénica contra la mutagénica (Frei *et al.* 1992). Además de la cruce estándar en la prueba SMART del ala, es posible realizar una cruce de bioactivación elevada (BE). Las larvas de ésta última se caracterizan por un elevado nivel constitutivo de citocromos P450, lo que facilita la detección de promutágenos y procancerígenos (Graf y Van Schaik 1992). Guzmán-Rincón y Graf (1995) y Graf *et al.* (1996) proporcionan más detalles acerca del uso de la prueba del ala. Los ensayos somáticos de genotoxicidad se encuentran validados con un gran número de agentes químicos y mezclas complejas (más de 400) (Graf *et al.* 1998a, Vogel *et al.* 1998) y además están bien adaptados para estudios de antigenotoxicidad (Graf *et al.* 1998a). La prueba SMART del ala de *Drosophila* se utiliza en un número cada vez mayor de laboratorios, especialmente en América Latina.

Con el fin de introducir a Brasil los ensayos somáticos de *Drosophila* y para enseñar las técnicas básicas, en 1991 se realizó un curso de entrenamiento en la Facultad de Filosofía, Ciencias y Letras de la Universidad de Sao Paulo, en Ribeirão

The fruit fly *Drosophila melanogaster* offers a series of advantages for its use as an eukaryotic *in vivo* genotoxicity assay system. It is easy to culture, has a short generation time, and the somatic assays are inexpensive because they only need basic laboratory equipment and low-cost material. In addition to the well established and validated test systems that use germ cells, primarily the test for sex-linked recessive lethals, new assays were developed that use somatic tissues, *i.e.* cells of the eye or wing imaginal disks. These Somatic Mutation And Recombination Tests (SMART) are one-generation assays which make use of appropriate recessive markers that are expressed on the surface of the eyes or the wings of the adult fly. Induction of loss of heterozygosity of these markers in imaginal disk cells of the larva by treatment with a genotoxic compound leads to the formation of a clone of mutant cells which will then express after metamorphosis as a mutant spot on the eye or the wing. The main advantage of these somatic test systems lies in the fact that they detect not only various types of mutational events but primarily induced mitotic recombination. The wing spot test offers the advantage that the quantification of recombinagenic activity versus mutagenic activity is possible within each experiment (Frei *et al.* 1992). Furthermore, in the wing SMART a High Bioactivation (HB) cross is available in addition to the standard cross. The larvae of this HB cross are characterised by a high constitutive level of cytochromes P450 which facilitates the detection of promutagens and procarcinogens (Graf and van Schaik 1992). More details on the use of the wing spot test are given in Guzmán-Rincón and Graf (1995) and Graf *et al.* (1996). The somatic genotoxicity assays in *Drosophila* are now well validated with a large number of chemical compounds or complex mixtures tested (more than 400) (Graf *et al.* 1998a; Vogel *et al.* 1998). Furthermore, the assays are well suited for studies on antigenotoxicity (Graf *et al.* 1998a). The wing SMART of *Drosophila* is being used in an increasing number of laboratories, especially in Latin America.

In order to introduce the somatic assays of *Drosophila* and to teach its basic techniques in Brazil, a first training course was held in 1991 at the Faculty of Philosophy, Sciences and Letters, University of São Paulo, in Ribeirão Preto (SP), which was organised by C.S. Takahashi and presented by U. Graf. Similar

Preto (SP). Dicho curso fue organizado por C.S. Takahashi e impartido por U. Graf. En México también se realizaron eventos similares (Graf *et al.* 1994). En 1994, M.A. Spanó preparó un taller de tres días en el Departamento de Biociencias de la Universidad Federal de Uberlândia, en Uberlândia (MG) que igualmente fue dado por U. Graf. Durante el Quinto Congreso Latinoamericano de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambientales y el Curso Alexander Hollaender, realizados en Curitiba (PR), Brasil, del 15 al 20 de noviembre de 1998, se llevó a cabo un simposio titulado “*Drosophila* como organismo centinela para mutagénesis” con la participación de H.H. de Andrade (Porto Alegre, RS, Brasil), M.A. Spanó (Uberlândia M.G., Brasil), J. Guzmán-Rincón (México, D.F., México) (Guzmán-Rincón *et al.* 1998) y U. Graf (Zurich, Suiza) (Graf *et al.* 1998b). Al término del Congreso se realizó, del 25 al 26 de noviembre de 1998 en el Departamento de Genética y Bioquímica de la Universidad Federal de Uberlândia, el segundo taller sobre “SMART: un método para la detección de actividades mutagénica y recombinogénica en células somáticas de *Drosophila*”. Esta reunión fue organizada por M.A. Spanó con el apoyo de la Coordinación del Curso de Genética y Bioquímica para Posgraduados del Centro de Ciencias Biomédicas de la Universidad Federal de Uberlândia, así como de la Sociedad Brasileña de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambientales. Se contó con la presencia de 30 estudiantes, graduados y posgraduados y científicos de las universidades de Uberlândia (MG) y Goiânia (GO).

La mañana del primer día el Taller se inauguró con una alegre ceremonia con acompañamiento musical a la que asistieron los profesores W.E. Kerr y M.A. Brandeburgo del Departamento de Genética y Bioquímica. Después de la ceremonia, U. Graf presentó la conferencia de apertura sobre “El uso de *Drosophila* para la detección de actividades genotóxicas”. La segunda conferencia fue de M.A. Spanó sobre “La prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART): una nueva metodología para la detección de las actividades mutagénica y recombinogénica en *Drosophila melanogaster*”.

En la tarde, en el Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis de la Universidad Federal de Uberlândia, tuvo lugar una sesión de entrenamiento práctico preparada por M.A. Spanó y sus colaboradores y dirigida por M.A. Spanó y U. Graf. Durante esta sesión los participantes se familiarizaron con: (1) el manejo y el cultivo de las cepas utilizadas en la prueba de la mancha del ala, (2) los fenotipos de las cepas con los marcadores *mwh* (*pelos múltiples del ala*) y *flr<sup>3</sup>* (*flama*), (3) la cosecha de las larvas del medio especial de levadura, (4) las medidas de precaución para el manejo de sustancias mutagénicas y carcinogénicas, (5) la aplicación de los compuestos a probar por medio de la alimentación de las larvas con medio instantáneo para *Drosophila* o con puré de papas, (6) la colecta de las moscas adultas de los viales de tratamiento para almacenarlas en etanol al 70%, (7) el montaje de las alas en los portaobjetos, (8) el registro de la aparición de manchas sencillas (de los fenotipos *mwh* ó *flr*) y de manchas dobles (clon *mwh* adyacente al clon *flr*) en las alas y (9) el procesamiento de datos y su evaluación. Esta sesión intensa de entrenamiento práctico junto con fructíferos periodos de discusión

training courses were also held in México (Graf *et al.* 1994). In the year 1994, a three-day workshop was organised by M.A. Spanó at the Department of Biosciences, Federal University of Uberlândia, Uberlândia (MG), which was also given by U. Graf. The Fifth Latin-American Congress of Environmental Mutagenicity, Carcinogenicity and Teratogenicity and Alexander Hollaender Course took place in Curitiba (PR), Brazil, from 15 to 20 November 1998. During this event, a symposium was held on “*Drosophila* as a sentinel organism in mutagenesis” with the participation of H.H. de Andrade (Porto Alegre, RS, Brazil), M.A. Spanó (Uberlândia, MG, Brazil), J. Guzmán-Rincón (México, D.F., México) (Guzmán-Rincón *et al.* 1998), and U. Graf (Zurich, Switzerland) (Graf *et al.* 1998b). After this Congress, a Second Workshop on “SMART: A method for the detection of mutagenic and recombinogenic activity in somatic cells of *Drosophila*” took place on 25 and 26 November 1998 at the Department of Genetics and Biochemistry of the Federal University of Uberlândia, Uberlândia (MG). This Workshop was organised by M.A. Spanó and received support by the Coordination of the Post-Graduate Course in Genetics and Biochemistry, Biomedical Sciences Centre, Federal University of Uberlândia. Further support was provided by the Brazilian Society for Environmental Mutagenesis, Carcinogenesis and Teratogenesis. This Workshop was attended by 30 graduate and post-graduate students and scientists from the Universities of Uberlândia (MG) and Goiânia (GO).

In the morning of the first day of the Workshop, a festive opening ceremony with musical accompaniment took place in the presence of Profs. W.E. Kerr and M.A. M. Brandeburgo, Department of Genetics and Biochemistry. This was followed by an opening lecture given by U. Graf on “The use of *Drosophila* for the detection of genotoxic activity”. The second lecture was presented by M.A. Spanó on “Somatic Mutation And Recombination Test (SMART): A novel methodology for the detection of mutagenic and recombinogenic activity in *Drosophila melanogaster*”.

In the afternoon, a practical training session took place in the Laboratory of Cytogenetics and Mutagenesis, Federal University of Uberlândia, which was organised by M.A. Spanó and his collaborators and presented by M.A. Spanó and U. Graf. During this session, all the participants were made familiar with (1) handling and culturing of the strains used in the wing spot test, (2) phenotypes of the marker strains *mwh* (*multiple wing hairs*) and *flr<sup>3</sup>* (*flare*), (3) collection of larvae on special yeast medium, (4) safety precautions for the handling of mutagenic and carcinogenic substances, (5) application of test compounds by feeding of larvae with *Drosophila* Instant Medium or with mashed potatoes, (6) collection of adult flies from treatment vials for storing in 70% ethanol, (7) mounting of wings on microscopic slides, (8) scoring of wings for the occurrence of single spots (either *mwh* or *flr* phenotype) and twin spots (*mwh* clone adjacent to *flr* clone), (9) data processing and evaluation. This intensive practical training session together with fruitful discussion periods proved to be very stimulating and successful for all the persons involved.

In the morning of the second day of the Workshop, seven

fueron muy estimulantes y provechosos para todos los participantes.

En la mañana del segundo día del Taller se realizaron siete presentaciones orales sobre los avances de proyectos de las universidades de Uberlândia (UFU) y Goiânia (UFG). N. Coelho de Sousa presentó el trabajo "Evaluación de la actividad mutagénica y recombinogénica del barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* Mart)" (Sousa y Carvalho 1997). La segunda presentación, a cargo de E. Araujo Rocha (UFG), fue "Evaluación del potencial genotóxico de extractos de *Hyptis suaveolens*" y la tercera, de S. de Carvalho (UFG), "Efectos genotóxicos del tordon". Después del receso para el café, B. Lassmar Bueno Valadares (UFU) presentó el excelente trabajo "Posibles efectos antígenotóxicos del propóleo extraído de panales de *Apis mellifera*" (Valadares y Spanó 1998). Las presentaciones subsecuentes fueron sobre la actividad reguladora de dos compuestos químicos. E.J. Fragiorge habló de "Efectos moduladores de la vitamina C en combinación con la adriamicina" (Fragiorge *et al.* 1998) y E. Peres Rodrigues (UFU) de "Efectos moduladores de la melatonina sobre la actividad genotóxica de los rayos gamma" (Rodrigues *et al.* 1998). La última presentación de esta sesión estuvo a cargo de J.C. Nepomuceno y fue sobre los avances del proyecto "Efectos protectores de *Moringa oleifera* sobre la actividad genotóxica de la mitomicina C y del uretano" (Nepomuceno *et al.* 1998).

En la sesión vespertina se hicieron dos presentaciones finales: M. A. Spanó trató sobre "La cuantificación de los efectos recombinogénicos de los agentes químicos" y U. Graf acerca de "La prueba de la antigenotoxicidad en células somáticas de *Drosophila*" (Graf *et al.* 1998a).

El Taller se caracterizó por una atmósfera muy estimulante y agradable, tanto en las sesiones científicas como durante el trabajo práctico en el laboratorio. No hay duda de que este tercer evento de entrenamiento en Brasil fue una experiencia enriquecedora tanto para los participantes como para la Universidad. Se agradece ampliamente el excelente trabajo de organización de R.M. Gonçalves Silva, L. Pereira Silva y de todos los otros miembros del Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis (UFU). También se le está muy reconocido a N.M. Castro (UFU) por el enorme apoyo práctico en este evento.

## REFERENCIAS/REFERENCES

Fragiorge E.J., Spanó M.A. and Graf U. (1998). Efeitos genotóxicos da adriblastina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Genetics and Molecular Biology 21/September, Suppl., 136.

Frei H., Clements J., Howe D. and Würigler F.E. (1992). The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. Mutat. Res. 279, 21-33.

Graf U. and van Schaik N. (1992). Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Mutat. Res. 271, 59-67.

oral presentations were given on projects in progress at the Universities of Uberlândia (UFU) and Goiânia (UFG). N. Coelho de Sousa (UFG) gave a paper on "Evaluation of the mutagenic and recombinogenic activity of Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* Mart)" (Sousa and Carvalho 1997). The second presentation "Evaluation of the genotoxic potential of extracts of *Hyptis suaveolens*" was given by E. Araujo Rocha (UFG). The third paper was by S. de Carvalho (UFG) on "Genotoxic effects of Tordon". After the coffee break, B. Lassmar Bueno Valadares (UFU) presented an excellent paper on "Possible antigenotoxic effects of propolis extracted from honeycombs of *Apis mellifera*" (Valadares and Spanó 1998). The subsequent papers presented very interesting studies on the modulating activity of two chemical compounds. E.J. Fragiorge (UFU) talked on "Modulating effects of vitamin C in combination with adriamycin" (Fragiorge *et al.* 1998) and E. Peres Rodrigues (UFU) on "Modulating effects of melatonin on the genotoxic activity of gamma rays" (Rodrigues *et al.* 1998). The last presentation in this session was given by J.C. Nepomuceno on the advanced project "Protective effects of *Moringa oleifera* against the genotoxic activity of mitomycin C and urethane" (Nepomuceno *et al.* 1998).

In the afternoon session, two final lectures were given: M.A. Spanó talked on "Quantification of the recombinogenic effects of chemical agents", and U. Graf gave a paper entitled "Antigenotoxicity testing in somatic cells of *Drosophila*" (Graf *et al.* 1998a).

The whole Workshop profited from a very stimulating and pleasant atmosphere both during the scientific sessions as well as during the practical work in the laboratory. There is no doubt that this third training event in Brazil was indeed a profitable experience both for all the participants and the University. The excellent organisational work provided by R.M. Gonçalves Silva and L. Pereira Silva as well as by all the other members of the Laboratory of Cytogenetics and Mutagenesis (UFU) is gratefully acknowledged. Special thanks are also due to N.M. Castro (UFU) for all her practical support in connection with this event.

Graf U., Delgado-Rodríguez A., Villalobos-Pietrini R. and Gómez-Arroyo S. (1994). Latin American Workshop on Genetic Toxicology. I. *Drosophila melanogaster* (meeting report). Rev. Int. Contam. Ambient. 10, Suppl. 1, 1-4.

Graf U., Spanó M.A., Guzmán-Rincón J., Abraham S.K. and de Andrade H.H. (1996). The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. Afr. Newslett. on Occup. Health and Safety 6, Suppl. 1, 9-13.

Graf U., Abraham S.K., Guzmán-Rincón J. and Würigler F.E. (1998a). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. Mutat. Res. 402, 203-209.

Graf U., Abraham S.K., Guzmán-Rincón J. and Würigler F.E. (1998b). The use of *Drosophila* as somatic assay in antigeno-

- toxicity studies (abstract). *Genetics and Molecular Biology* 21 November, Suppl., 26-27.
- Guzmán-Rincón J. and Graf U. (1995). *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: *Biomonitors and biomarkers as indicators of environmental change* (F.M. Butterworth, C.D. Corkum and J. Guzmán-Rincón, Eds.), Plenum, New York, pp. 169-181.
- Guzmán-Rincón J. (1998). *Drosophila* as sentinel organism in mutagenesis (abstract). *Genetics and Molecular Biology* 21 November, Suppl., 50.
- Nepomuceno J.C., Spanó M.A., Würigler F.E. and Graf U. (1998). Efeito protetor da *Moringa oleifera* contra a ação genotóxica da mitomicina C em *D. melanogaster* (abstract). *Genetics and Molecular Biology* 21 November, Suppl., 127.
- Rodrigues E. P., Spanó M.A. and Graf U. (1998). Efeitos moduladores da melatonina em células somáticas de *Drosophila melanogaster* tratadas com raios- $\gamma$  (abstract). *Genetics and Molecular Biology* 21 November, Suppl., 128.
- Sousa N. C. and Carvalho S. (1996). Avaliação dos possíveis efeitos mutagênicos e recombinogênicos do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* Mart) em células somáticas de *D. melanogaster*. II. Resultados parciais (abstract). *Brazilian Journal of Genetics* 19 September, Suppl., 179.
- Valadares B. L. B. and Spanó M.A. (1998). Avaliação da própolis pelo teste de detecção de mutações e recombinações somáticas (SMART) em células de asa de *Drosophila melanogaster* (abstract). *Genetics and Molecular Biology* 21 November, Suppl., 129.
- Vogel E.W., Graf U., Frei H. and Nivard M.M.J. (1998). The results of *Drosophila* assays as indicators of carcinogen exposure. In: *Short- and medium-term carcinogenicity tests, mutation analysis, and multistage models in risk identification*. IARC, Lyon, France. In press.