

**DETERMINACION DE VARIACIONES METABOLICAS POR  
ACCION DE CLORHIDRATO DE MORFINA SOBRE  
DROSOPHILA MELANOGASTER**

**Mario I. Alarcón A.**

**Oscar Marín S.**

Departamento Biología Celular  
Instituto Central de Biología  
Universidad de Concepción

**Introducción**

La influencia bioquímica y fisiológica de muchos agentes químicos sobre el metabolismo normal de varios géneros de Diptera y otros órdenes de Insecta, es objeto de investigación en la actualidad. Gran parte de estos estudios se realizan en *Drosophila melanogaster* (1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14).

En *Drosophila*, estos aspectos bioquímicos y fisiológicos derivan a un intenso estudio sobre la acción que éstos agentes químicos pueden tener sobre su estructura y constitución genética (15-16-17-18-19-20-63-64-65-66-67-68-69-70-71-72-73-74).

El estudio de estos agentes ha permitido determinar que muchos de ellos intervienen en la formación de tumores en *Drosophila* (21-22-23-24-25-26-27).

En los laboratorios de Biología Celular del Instituto Central de Biología se ha planificado un estudio fisiológico y bioquímico y sus incidencias genéticas en cepas de *Drosophila melanogaster* utilizando clorhidrato de morfina como agente químico.

Este estudio deriva del creciente interés en farmacogenética y de haber determinado, mediante la revisión bibliográfica, que la acción del clorhidrato de morfina sobre Insecta y muy especialmente sobre *Drosophila* es escasa.

De ahí que se estime indispensable realizar una investigación utilizando este alcaloide, ya que es clásicamente conocida su acción sobre los mamíferos superiores (28) y siendo una droga que provoca

adición, nos parece conveniente precisar su acción en *Drosophila melanogaster*, clásico medio de investigación genética.

Este trabajo comprende el reconocimiento de su acción fisiológica y bioquímica, y dará la pauta para conocer las incidencias genéticas que este alcaloide pudiera tener en *Drosophila*.

Para ponderar las reacciones fisiológicas y las respuestas farmacológicas a la acción del clorhidrato de morfina, se utilizaron técnicas manométricas.

Sin embargo la calidad del material analizado, ejemplares adultos de *Drosophila*, llevaron a modificar los dispositivos de los manómetros del instrumento Warburg para hacerlo funcional a este trabajo in vivo. Por otra parte, la incidencia de las modificaciones alcanzaron hasta el cálculo de las constantes de corrección del espacio reaccional de cada manómetro.

Las condiciones experimentales así establecidas nos permiten elegir las cepas más adecuadas para el trabajo; realizando determinaciones metabólicas provocadas por la acción del clorhidrato de morfina.

Los ejemplares de las cepas tratadas con clorhidrato de morfina a dosis que dan respuestas manométricas, son excelentes reactivos biológicos para efectuar las cruces y desarrollos posteriores en medios morfinizados y emprender el estudio desde el punto de vista farmacogenético.

## *Metódica*

### *1.— Instrumental empleado.*

Se utilizó un Instrumento Warburg clásico, con modificaciones adecuadas al proceso que se trata de medir, efectuadas en el laboratorio de Biología Celular y que se detallan en la descripción de la técnica.

Cepas de *Drosophila* fueron obtenidas y cultivadas con los requerimientos de la experiencia en el laboratorio de Genética del Instituto.

### *2.— Técnica.*

El empleo del instrumento Warburg es de clásico uso en valoración de sistemas enzimáticos, especialmente enzimas oxidativas (29-30-31-32-33-34). Sin embargo cuando se trata de medir consumo de oxígeno en ejemplares adultos vivos de *Drosophila melanogaster*, es necesario adaptar el sistema manométrico a este tipo de material.

Desde luego, el tamaño de los ejemplares de *Drosophila* es adecuado para incorporarlo a los vasos reaccionales de los manómetros. Además se obtienen resultados detectables con comodidad cuando se hacen las determinaciones con 30 ejemplares por sistema manómetro-vaso.

Si bien es cierto que el tamaño de los vasos permite efectuar la experiencia en buena forma, es necesario un dispositivo de separación del compartimiento central, que lleva hidróxido de potasio, del resto del vaso. Este dispositivo debe llevar una estructura en tamiz

que impida, por una parte, el que los ejemplares de *Drosophila* pasen a él con su consiguiente muerte al entrar en contacto con el álcali, y por otra, permitir que esta base capte el anhídrido carbónico producido por la respiración de *Drosophila*.

El dispositivo es un tubo de diámetro un poco mayor a la cámara central y lleva en un lado un tamiz, se coloca sobre la cámara al montar la experiencia. (Ver figuras N° 1 y N° 2).

Las experiencias se efectúan controlando los consumos de oxígeno durante 60 minutos. En este tiempo además de la contaminación que pueden tener con hidróxido de potasio, solucionado con el dispositivo anteriormente señalado, también sucede con frecuencia el paso de *Drosophila* hacia el tubo capilar del manómetro en el punto de conexión con el vaso reaccional; esta dificultad fue superada colocando una placa perforada en el embudo de conexión del manómetro (Ver figura N° 3).

Estos accesorios de retención permiten una buena medición del consumo de oxígeno de estas especies biológicas y por lo tanto permiten también apreciar su intensidad metabólica.

Ventajoso resulta además recuperar los ejemplares de *Drosophila* los que pueden utilizarse para seguir las líneas de cultivo establecidas.

Básicamente las técnicas señaladas son las descritas por Umbreit-Burris-Staufffer (31) con las modificaciones ya señaladas.

La normalidad de las funciones respiratorias en una atmósfera reaccional de aire, permite obtener, en nuestras condiciones experimentales, resultados óptimos manifestados en los amplios desniveles de los manómetros; sin embargo, también se hicieron determinaciones en atmósfera reaccional oxigenada, en donde el desnivel es mayor, pero como se conserva la proporcionalidad con respecto a la medición en aire, se prefirió seguir con las experiencias en esta atmósfera para conservar la normalidad física del proceso respiratorio.

En las determinaciones efectuadas se utilizaron series de manómetros realizando en cada experiencia un control termobarométrico y también controles de las experiencias en su normalidad, cuando se ha empleado clorhidrato de morfina en el tratamiento previo de las cepas de *Drosophila*.

Toda experiencia manométrica requiere un cálculo exacto del espacio reaccional, siendo necesario efectuar las calibraciones de rigor para el tipo de material empleado, determinando así el volumen real total de la cámara de reacción que se designa por  $V_g$ .

Este valor ha sido calculado según las indicaciones dadas por el método de Scholander y Niemeier (35), además de las indicaciones fundamentales proporcionadas por Umbreit (31).

El método básico de cálculo considera una serie de valores volumétricos parciales, que junto con variables que influyen, como presión y temperatura, nos permiten obtener la constante K de cada sistema manométrico.

Esta constante o factor correccional K, nos permite, efectuada la determinación, calcular el volumen exacto de oxígeno consumido por los ejemplares de *Drosophila* incluidos en el sistema manométrico.

El proceso de calibración manométrica señalado por los autores anteriormente citados tiene plena expresión cuando se trabaja con homogenizados y cortes de tejidos.

Trabajando con cepas de *Drosophila* como organismos totales y vivos se requirió efectuar un estudio previo sobre la metódica a seguir para la calibración, ya que hay factores como, coeficiente de solubilidad de oxígeno en solución fisiológica que aquí no tiene incidencia. También es de gran dificultad determinar con exactitud el volumen real de los ejemplares de *Drosophila* en estudio, ya que el cálculo del volumen mediante pesadas o desplazamiento de líquidos está sujeto a variables difíciles de controlar que dan resultados muy fluctuantes cuando se experimenta con material vivo.

Para subsanar ésto y de acuerdo con las experiencias de Roger Hoopingarner y colaboradores (36) se procedió a calibrar los sistemas manométricos con los ejemplares de *Drosophila* ya incluidos en los vasos. Además de las moscas antes de la calibración también se monta el sistema con hidróxido de potasio al 10% (0,1 ml.) y los accesorios de retención.

La calibración así efectuada permite prescindir del valor que corresponde al volumen del medio reaccional por una parte (*Drosophila*) y a los accesorios de retención por otra.

El número de ejemplares de *Drosophila* para este trabajo se fijó experimentalmente considerando, tener un número adecuado para que el consumo de aire fuera lo suficiente para detectarlo convenientemente por la técnica. Después de varias experiencias tentativas se convino que la media aceptable en nuestras condiciones de trabajo era de 30 ejemplares de cada cepa en estudio y por sistema manómetro-vaso.

Para desarrollar la experiencia se utilizaron ejemplares adultos de un mismo medio de cultivo preparados y mantenidos en condiciones standard en el cepario de Genética del Instituto de Biología.

### 3.— *Desarrollo de la Técnica.*

#### 1) *En medios de cultivo.*

En los medios de cultivo preparados, según técnica realizada en el Instituto, se procede a efectuar una siembra de *Drosophila* en sistemas seriados.

De estos medios se obtuvieron los ejemplares machos y hembras, para efectuar las determinaciones controles y precisar las cepas que dan mejores resultados en valoraciones metabólicas en experiencias de manometría y en nuestras condiciones experimentales.

Los medios nutrientes preparados con clorhidrato de morfina permitieron determinar variaciones metabólicas por acción de este alcaloide en *Drosophila*.

La dosificación de morfina a la generación parental y siguientes, es difícil, ya que, preparado el medio, los ejemplares adultos deben penetrar la capa de levadura, por una parte, y por otra, a los 7 días, cuando se hacen las primeras determinaciones, se encuentran los primeros estados larvarios que también consumen el nutriente. Además el recuento de las nuevas generaciones y las variaciones en la concentración y contaminación por procesos catabólicos, dificultan en extremo la posibilidad de cuantificar la dosis de clorhidrato de morfina que ingiere cada individuo. Sin embargo, empíricamente se puede conocer aproximadamente la dosis fisiológica y letal para grupos de *Drosophila* en un medio de cultivo en un momento dado.

## 2) En Sistema Manométrico.

Se colocan en los vasos reaccionales 30 ejemplares de *Drosophila* de la cepa en estudio, machos y hembras. De acuerdo con lo señalado anteriormente, cada sistema ya está preparado con sus accesorios de retención y en el compartimiento central del vaso reaccional se ha colocado álcali para retener el anhídrido carbónico de la respiración. Se procede a cerrar y sellar los vasos en los manómetros respectivos y se llevan al baño Warburg a la temperatura de trabajo (30°C).

Antes de cerrar las llaves de los manómetros se deja homogenizar la temperatura en el interior del vaso. En estudios enzimáticos es suficiente 5 a 15 minutos; pero como para incluir los especímenes en los vasos es necesario anestésarlos, se necesita no sólo homogenizar la temperatura interna, sino también que las *Drosophila* se recuperen convenientemente. Para esto se deja homogenizar el ambiente reaccional por 30 minutos. Conseguido esto, se cierra el sistema y se inicia la medición respirométrica propiamente tal. Se controló cada experiencia durante 60 minutos, ya que el desnivel (h) obtenido en este tiempo es aceptable.

Cada montaje va acompañado de un manómetro termobarómetro y cuando fue necesario un manómetro control, como se estima clásicamente.

Cuando se realizan las mediciones en *Drosophila* sometidas a la acción de clorhidrato de morfina, es necesario tener presente el manómetro control, en el cual se han colocado en las mismas condiciones experimentales de manometría, el mismo número de moscas provenientes de un cultivo normal.

Los datos fueron tomados según las indicaciones del protocolo adjunto, modelo que se incluye en los resultados, y los cálculos estadísticos se analizaron según las recomendaciones de F. E. Croxton (37).

## 3) Cepario de *Drosophila*.

Para la obtención de las mutantes de *Drosophila melanogaster* se eligieron 6 cepas realizando con ellas los cultivos controles y experimentales. Las cepas elegidas corresponden a: Santiago (stgo); White (w); Bar (b); Sepia (se); Vestigiales (vg); Ebony (e). De estos cultivos se separaron los ejemplares para desarrollar las experiencias manométricas.

En los medios nutrientes que se requería incorporar dosis de clorhidrato de morfina se agregaron al final de la preparación del medio en solución acuosa, se mezcló y se homogenizó bien. Así preparado se procedió a llenar los frascos de cultivo y colocar la cantidad de levadura necesaria. Para hacer las determinaciones se espera un tiempo adecuado con el objeto de que en su alimentación rompan la capa de levadura y consuman el medio propiamente tal, (aproximadamente 3 días).

Los medios nutrientes experimentales se prepararon según fórmula clásica de cultivo de *Drosophila*, adoptada en el cepario del Instituto de Biología.

## Resultados

- 1.— Determinación y estudio comparativo del nivel respiratorio normal de mutantes de *Drosophila melanogaster*.
- 2.— Acción fisiológica en mutante Sepia de clorhidrato de morfina.
- 3.— Determinación de las alteraciones en los niveles respiratorios en mutantes Sepia tratadas con dosis crecientes de clorhidrato de morfina.
- 4.— Control manométrico de las alteraciones metabólicas producidas en *Drosophila*, mutante Sepia, cultivadas en medios morfinizados hasta F<sub>4</sub>.
- 5.— Determinación de síndrome carencial en *Drosophila*, mutante Sepia.
- 6.— Incidencias reproductivas y genéticas de la acción fisiológica del clorhidrato de morfina.

TABLA N° 1

Determinación del Nivel espiratorio normal de mutantes de *Drosophila melanogaster*, expresado en ml. de aire consumido por hora por 30 individuos.

Mutantes	ml. de aire consumido	% de actividad en relación a mutante Sepia (*)	N° de experiencias
se	11,87 ± 1,89	100,0	44
vg	11,44 ± 2,00	96,3	42
B	10,80 ± 2,58	90,9	47
Stgo.	9,94 ± 1,62	83,7	56
e	9,54 ± 1,54	80,3	41
w	8,14 ± 1,91	68,9	51

(\*) Se eligió mutante Sepia para expresar los valores porcentuales por ser ésta la que expresó un mayor consumo de aire en nuestras condiciones de trabajo.

TABLA N° 2

Comparación del Nivel Respiratorio de mutantes de *Drosophila melanogaster* en relación con su peso y expresado en ml. de aire consumido por hora por 30 individuos.

Mutante	Peso (g.)		ml. de aire		N° Experiencias
	Total (30 Ej.)	Individual	Total (30 Ej.)	Individual	
se	0,026	0,00086	11,87	0,39	44
vg	0,022	0,00073	11,44	0,37	42
B	0,026	0,00086	10,80	0,39	47
Stgo.	0,025	0,00083	9,94	0,33	56
e	0,024	0,00080	9,54	0,31	41
w	0,025	0,00083	8,14	0,27	51

TABLA N° 3

Comparación del Nivel Respiratorio de mutantes de *Drosophila melanogaster* en relación con su peso y expresado en ml. de Oxígeno consumidos per hora por 30 individuos.

Mutante	Peso (g.)		ml. de Oxígeno		N° Experiencias
	Total (30 Ej.)	Individual	Total (30 Ej.)	Individual	
se	0,026	0,00086	17,00	0,56	10
vg	0,022	0,00073	13,83	0,43	10
B	0,026	0,00086	13,42	0,44	10
Stgo.	0,024	0,00083	13,34	0,44	10
e	0,025	0,00080	12,81	0,43	10
w	0,025	0,00083	12,76	0,43	10

TABLA N° 4

Determinación comparativa de Niveles espiratorios de mutantes de *Drosophila melanogaster* entre aire y atmósfera oxigenada, expresados en ml. consumidos por hora por 30 individuos.

NIVEL RESPIRATORIO						
Mutante	ml. aire consum.	% en relac. a Sepia	N° de Exper.	ml. O <sub>2</sub> consum.	% en relac. a Sepia	N° de Exper.
se	11,87	100,0	44	17,00	100,0	10
vg	11,44	96,3	42	12,83	75,4	10
stgo.	10,80	90,9	47	13,42	78,9	10
B	9,94	83,7	56	12,70	74,7	10
e	9,54	80,3	41	13,34	78,4	10
w	8,14	68,9	51	12,81	75,3	10

(\*) Se eligió mutante Sepia para expresar los valores porcentuales por ser ésta la que mostró valores más altos en nuestras condiciones de trabajo.

TABLA N° 5

Ordenación de valores para el Análisis de Variancia del consumo de aire de las cepas de *Drosophila melanogaster* en estudio.

N° de lecturas para cada cepa: 20  
 N° de cepas estudiadas: 6  
 N° total de lecturas: 120

	SEPIA	VG	BAR	STGO	EBONY	WHITE	N <sub>EX</sub>
1)	12,8	12,8	11,9	9,1	13,3	11,3	71,2
2)	11,7	11,7	11,7	10,6	10,8	10,1	66,6
3)	10,4	10,4	12,2	9,3	13,1	12,4	67,8
4)	10,4	12,1	11,3	9,9	12,3	10,7	66,7
5)	12,1	10,8	13,9	8,5	10,7	12,6	68,6
6)	10,8	12,4	12,8	11,2	11,9	11,3	70,4
7)	12,4	10,8	13,2	9,1	9,7	10,8	66,0
8)	10,8	11,4	13,1	9,9	9,2	7,3	61,7
9)	11,4	12,6	12,4	9,5	9,3	10,1	64,3
10)	11,6	10,7	13,7	7,7	10,9	6,5	61,1
11)	9,3	9,4	14,3	10,7	6,5	7,6	57,8
12)	10,1	10,1	12,5	10,8	9,2	7,8	60,5
13)	12,0	9,0	9,9	12,2	7,8	8,6	60,1
14)	10,1	13,6	13,6	13,7	8,1	7,9	67,0
15)	9,6	10,0	15,1	11,5	8,8	9,5	64,5
16)	13,6	13,4	12,5	15,7	8,8	8,6	72,6
17)	16,0	11,7	12,3	15,2	9,2	7,4	71,8
18)	13,4	11,7	11,2	12,6	9,9	5,1	63,9
19)	11,7	12,0	19,1	13,9	10,7	3,2	70,2
20)	11,7	10,1	19,1	11,7	11,0	4,2	67,8
N <sub>EX</sub>	231,9	226,3	265,4	226,8	201,2	173,0	1.326,6

N<sub>e</sub>  
 EX = Sumatoria de todas las lecturas de una columna

N<sub>r</sub>  
 EX = Sumatoria de todos los valores en una fila.



TABLA N° 6

Resumen de resultados del Análisis de Variancia de consumo de aire de cepas de *Drosophila* en estudio.

Fuente de Variación	Grado de Variación	Grados de Libertad	Variación Estimativa
Entre las cepas	389	5	77,8
Entre las lecturas	60	19	3,6
Residual	256	95	2,6
Total	705	119	—

Variación estimativa de los valores.

$$F = \frac{\text{Variación estimativa de los valores.}}{\text{Variación estimativa residual.}}$$

Variación estimativa residual.

$F_c$  = Radio de Variación entre las cepas = 29,9 (Altamente significativo).

$F_r$  = Radio de Variación entre las columnas = 1,3 (No hay significancia).

$F$  = Radio de Variación.

TABLA N° 7

Consumo de aire de mutante *Sepia* a diferentes concentraciones de Clorhidrato de Morfina, en generaciones sucesivas expresado en ml. de aire/hr/30 individuos.

Concent. de Morfina	Parental	$F_4$				
		$F_1$	$F_2$	$F_3$	Medio Morfoniz.	Medio sin Morfina
Control	12,35	12,42	11,61	11,90	12,21	11,97
0,02 g.	9,61	9,43	13,21	6,54	6,34	12,69
0,03 g.	8,33	8,16	15,20	7,04	4,87	11,85
0,04 g.	7,95	7,13	10,88	6,88	5,27	11,32
0,08 g.	9,66	10,40	11,93	7,48	8,32	13,51
0,1 g.	9,03	7,40	12,48	7,12	6,16	15,43
0,5 g.	7,05	5,30	13,06	7,10	3,56	15,65

**PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA DETERMINACION DE RESPIRACION  
EN DROSOPHILA MELANOGASTER**

Protocolo N°: 5  
 Fecha: 24-VI-66  
 Acción de: CLORH. DE MORFINA

Edad: 5 días.  
 Cepa: SEPIA

Presión Atmosférica: 755 mm Hg  
 Temp. de Reacción: 30°C

Manómetros tipo: A  
 Temp. Ambiente: 18,5°C

Osc./min: 100

N° del Manómetro y Contenido	Control de reacción					Constantes y Cálculos				
	0'	15'	30'	45'	60'	h	K	V	V	V <sub>max</sub>
1) Termobarómetro	15.0	15.0	15.0	15.0	14.9	0.1	1.405	0.140		—
5) 0,02 g.	15.0	13.1	11.8	10.4	8.7	6.3	1.520	9.576	9.430	9,430
6) 0,03 g.	15.1	13.4	12.3	11.0	9.7	5.4	1.537	8.299	8,299	8,160
9) 0,04 g.	15.0	14.2	13.0	11.7	10.4	4.6	1.580	7.268	7,130	7,130
11) 0,08 g.	15.1	13.0	11.6	10.0	8.3	6.8	1.552	10.553	10,553	10,413
13) 0,1 g.	15.0	13.5	12.4	11.0	10.0	5.0	1.470	7.350	7,350	7,210
14) 0,5 g.	15.1	13.9	13.3	12.6	11.6	3.5	1.576	5.516	5,516	5,380
15) Control N° 1	15.0	12.3	10.7	9.2	7.1	7.9	1.591	12.268	12,430	12,430
17) Control N° 2	15.0	12.5	11.6	9.9	8.6	6.4	1.563	10.000	9,863	9,863
18) Control N° 3	15.0	13.5	12.2	10.4	8.6	6.4	1.587	10.15	10,15	10,020

## Discusión

La determinación manométrica de la respiración de *Drosophila* ha sido señalada por otros autores (38-39-40) y es buen índice de las actividades metabólicas normales de esta especie biológica. Así por ejemplo, se ha hecho estudios considerando las variaciones ambientales físicas como presión y temperatura (39-40-41-42-43).

Por otra parte también es abundante la información sobre acción de agentes químicos incorporados a *Drosophila* y a otras dípteros (1-2-3-4-5-7-10-12-15-16-18-21-23-24-25-26-27).

Los consumos normales de aire y oxígeno de *Drosophila*, tal como lo señalan las Tablas Nos. 1, 2 y 3, se valoran en condiciones adecuadas en los sistemas manométricos de un instrumento Warburg. El empleo de accesorios de retención, una calibración exacta y las condiciones fijas de experimentación en lo referente a temperatura y presión, permiten conocer el valor de la intensidad respiratoria de los 30 especímenes de *Drosophila* colocados en el sistema. Tal como se indica en las Tablas Nos. 2 y 3, un simple proceso divisional permite conocer el consumo de aire de cada ejemplar de las cepas en estudio.

Las determinaciones se hicieron en 60 minutos, ya que en este período se producen desniveles adecuados en los manómetros.

A todas las lecturas se aplicaron los factores correccionales ya señalados, permitiendo apreciar que existen entre las diferentes cepas en estudio consumos de aire detectables fácilmente y susceptibles de ser alterados por acciones físicas o químicas, (Tablas Nos. 1 y 2).

Se determinaron los pesos de los grupos de *Drosophila*, como así mismo individualmente (Tabla N° 2) y en ellos se aprecia que existe muy poca variación. Esto permite aceptar que las experiencias controles señaladas se realizaron en condiciones homogéneas.

Las experimentaciones anteriores se repitieron en atmósfera oxigenada (Tablas Nos. 3 y 4), y se hicieron las mismas comparaciones.

El consumo de oxígeno es evidente que fue más elevado, sin embargo, se prefirió seguir las determinaciones en aire ya que se consideró que el proceso control debía hacerse en las condiciones más normales posible.

Las determinaciones efectuadas permiten aceptar que en nuestras condiciones experimentales y tal como lo revela la Tabla N° 1, los mejores rendimientos se obtienen con mutante Sepia. Además las condiciones de cultivo la señalan como una cepa de gran estabilidad.

Para determinar si existen diferencias significativas entre los valores obtenidos, se realizó un Análisis de Variancia según el procedimiento indicado por Croxton (37). Así se pudo relacionar muestras experimentales de diferentes cepas de *Drosophila*, y aún más, permite establecer si hay diferencias entre las determinaciones de una misma cepa (Tablas Nos. 5 y 6). Se pudo comprobar así que entre las cepas existen diferencias significativas, lo que indicaría diferentes intensidades del metabolismo entre las cepas en estudio, probablemente debido a su variación génica y sensibilidad de las distintas mutantes a las condiciones de trabajo.

Basado en ésto, se eligió mutante *Sepia* para efectuar el estudio seriado. Se prepararon cultivos con dosis crecientes de clorhidrato de morfina, según se señaló en la descripción de la técnica.

Como no existe información sobre la dosificación, fue necesario preparar medios nutrientes con concentraciones crecientes de clorhidrato de morfina, pudiendo establecer aproximadamente una dosis letal de 0,005 g. de morfina pero para estados larvarios de *Drosophila*; esto, basado en el control empírico de que un grupo de 50 ejemplares adultos utilizan en 7 días sólo un tercio del medio nutriente con dosis de 0,75 g. de clorhidrato de morfina. Medios de cultivo de esta concentración morfínica permiten vivir al grupo de *Drosophila*. Sin embargo, si bien es cierto que hay posturas en el medio, los estados larvarios no se desarrollan y los pocos que lo hacen y llegan a adultos tienen una supervivencia término medio de 24 horas, siendo imposible efectuar estudios seriados en estas condiciones.

Dosis intermedias entre 0,55 g. y 0,75 g. presentan resultados variables, de interpretación difícil, ya que la dosificación mediante la nutrición es dificultosa.

En cambio, en la concentración de 0,5 g. de clorhidrato de morfina se obtienen resultados satisfactorios en la descendencia hasta  $F_4$ , que fue la última generación controlada, aún cuando se restituya un medio nutriente normal.

Se establecen cultivos controles y con dosis crecientes de clorhidrato de morfina desde 0,02 g. a 0,5 g. y se controlan manométricamente la descendencia de estos medios hasta  $F_4$ .

En esta generación se vuelve a un medio de cultivo normal, carente de morfina, y se controla las alteraciones manifestadas por un probable síndrome carencial (Tabla N° 7).

Es interesante constatar que las dosificaciones crecientes empleadas en los medios de cultivo permiten observar en la generación parental una leve baja en su metabolismo, como así mismo éstos valores se mantienen en  $F_1$ . Sin embargo en  $F_2$ , bien podría considerarse un fenómeno de rebote ya que en esta generación prácticamente se alcanza el consumo de aire, de los controles y en algunos casos se eleva ligeramente sobre la tónica normal. Notorio es ésto en el valor alcanzado por la serie de concentración 0,03 g. (Tabla N° 7).

Es interesante señalar que las series con concentraciones mayores de clorhidrato de morfina (0,1 g. y 0,5 g.), cuando vuelven al medio normal no morfinizado en  $F_4$ , no sólo recuperan su consumo, sino que sufren una pequeña elevación.

Esto nos lleva a suponer que dosis fisiológicas de clorhidrato de morfina para *Drosophila*, pueden determinarse a partir de estos valores, considerando el número de ejemplares en estudio, sus posibilidades de alimentación y la dosificación exacta del medio de cultivo.

En el paso al medio normal no se observa alteraciones que induzcan a suponer un síndrome carencial; pero por las determinaciones efectuadas es evidente que hay acción fisiológica y que el clorhidrato de morfina inhibe el metabolismo de *Drosophila* mientras se mantiene el alcaloide en el medio de cultivo.

Otros investigadores han determinado sistemas enzimáticos en *Drosophila* adulta y sus estados larvarios (44-45-46-47-48-49-50-51-52-53-54-55); sin embargo las modificaciones de su actividad fisiológica normal por presencia de agentes químicos no ha sido señalada.

Las alteraciones que se detectan por manometría y por acción del clorhidrato de morfina en este trabajo, tienen que tener una expresión a nivel enzimático. Es necesario un estudio para determinar los cambios en la actividad enzimática por la acción de morfina. Más aún este estudio debe requerir un control similar al efectuado aquí, en los estados larvarios de **Drosophila**.

Medición de la actividad respiratoria y enzimática en general se ha efectuado por otros autores en otras especies de Insecta (56-57-58-59-60).

Por otra parte, en los cultivos seriados se pudo observar que a medida que las concentraciones de clorhidrato de morfina van aumentando en los medios de cultivo, el proceso reproductivo de **Drosophila** se va haciendo menos intenso, hay una disminución manifiesta en la reproducción.

La disminución de los procesos respiratorios, consecuentemente proveerán de menos energía para los procesos divisionales.

También se conoce el antagonismo existente en los procesos divisionales entre ATP y colchicina en **Drosophila** (61). A la vista de los resultados obtenidos podría pensarse en una relación semejante entre ATP y clorhidrato de morfina; es necesario un estudio más profundo en este aspecto.

Por otra parte, como lo señala Jacob (62), la colchicina incorporada en la alimentación produce una fuerte inhibición en el desarrollo ovárico de **Drosophila**; acción semejante ha observado Brink con Heliotrina (10). Una acción similar podría explicar la inhibición en la postura de **Drosophila** tratadas con morfina. Se precisa un estudio al respecto.

De estas consideraciones se deduce que sería de interés un estudio citogenético para precisar, si este fenómeno inhibitorio de la reproducción pudiera ser un proceso de antagonismo con sustancias como la quinetina (6-furfurilaminopurina), que es causa desencadenante de la división celular en células de varios orígenes (61). Este estudio excede los límites de este trabajo.

Se ha señalado también para **Drosophila** la acción de muchas sustancias químicas como mostazas nitrogenadas, dietilsulfato, hidrazida maleica, formaldehído, aramita (2-(p-tert-butilfenoxi) isopropil-2 cloroetil sulfato), preparado por Nautgatuck Chemical Co., Naugatuck, Conn. USA. y otras (63-64-65-66-67-68-69-70-71-72-73-74); que tienen acción de tipo mutagénico. Aunque la metodología experimental señalada aquí, no permite determinar estos efectos sería de interés estudiar la acción de clorhidrato de morfina como agente que pudiera tener acción mutagénica en **Drosophila**.



Fig. 1.— Tamiz de separación de la cámara central del vaso del manómetro, vista lateral.

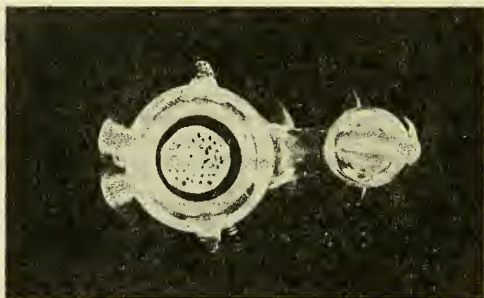


Fig. 2.— Idem fig. 1, vista desde arriba.

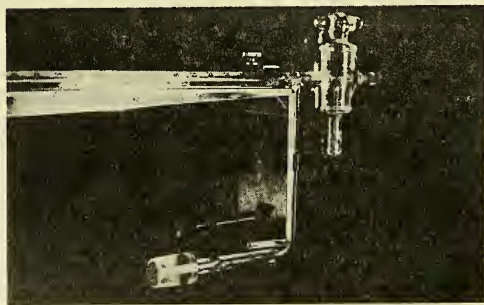


Fig. 3.— Tamiz adherido a la entrada del capilar del manómetro.

## Resumen

Se estudia la actividad metabólica normal mediante la determinación de consumo de aire y de Oxígeno en diversos mutantes de *Drosophila melanogaster* por técnicas manométricas.

Las técnicas manométricas empleadas para valorar sistemas enzimáticos se modifican, adecuándolas a las determinaciones metabólicas en *Drosophila* in vivo.

En las mutantes con que se realizan las experiencias se obtiene un consumo de aire cuyo máximo nivel se encuentra en mutante Sepia.

En mutantes Sepia cultivadas en medios con clorhidrato de morfina en dosis crecientes, se encuentran dosis con acción fisiológica cuando se incorpora al medio de cultivo 0,5 g. de clorhidrato de morfina, 0,005 g. por espécimen aproximadamente.

Al establecer cultivos seriados de mutante Sepia en medios morfínicos hasta  $F_4$  se detecta una disminución del nivel respiratorio en la generación parental y  $F_1$ ; en  $F_2$  se observa una elevación sobre la tónica normal, para disminuir a sus niveles más bajos en  $F_3$  y  $F_4$ .

No existe síndrome carencial cuando la generación  $F_4$  vuelve al medio de cultivo normal.

Se analizan éstos resultados.

## Summary

"Determination of metabolic variations by action of morphine chloride on *Drosophila melanogaster*".

The biochemistry and physiological influence on *Drosophila melanogaster* by morphine chloride is studied and its possible genetics incidence too.

Manometric techniques modified in our laboratory are used. It is possible to value respiration and its modifications in *Drosophila*.

The physiological action of morphine was valued and then is possible to study habituated period and "lack syndrome".

The effects of morphine chloride on the *Drosophila* descend is studied.

## Referencias Bibliográficas

- 1.- PICKETT, A. D.; PATTERSON, N. A.: Arsenates: Effect on fecundity of some Diptera. *Science* 140 (3566): 593, (1963).
- 2.- BEARDMORE, J. A.: Larval resistance to metallic chlorides. *Drosophila Inform. Serv.* 34: 72, (1960).
- 3.- MATUTANI, KOZI: Studies on the resistance of insects to chemicals:  
I.—Adaptation of the larva of *Drosophila melanogaster* to ethyl alcohol. *Physiol. and Ecol.* 8 (1): 24, (1958).  
II.—The effect of ethyl alcohol on the resistance and ovoposition of adult flies of *Drosophila melanogaster*. *Physiol. and Ecol.* 8 (1): 28, (1958).  
III.—Induction of the wing abnormalities by ethyl alcohol and their relation to the alcohol resistance in *Drosophila melanogaster*. *J. Inst. Polytech. Osaka City Univ.* D9: 189, (1958).

- IV.—The effects of rearing pupae of *Drosophila melanogaster* in ethyl alcohol media on the resistance and ovoposition of the adult flies. *Physiol. and Ecol.* 8 (2) : 103, (1959).
- 4.—MONROE, R. E.: Eff. ct of dietary cholesterol on house fly reproduction. *Ann. Ent. Soc. Amer.*, 53 (6) : 821, (1960).
  - 5.—BECAK, W.; DE CAMARGO, M. L. P.: Efeito da penicilina na viabilidade de *Drosophila melanogaster* e *Drosophila willistonii*. *Rev. Brasil. Biol.* 19 (1) : 99, (1959).
  - 6.—MIYOSHI, YASUHIRO: A new strain of *D. melanogaster* resistant to NaCl. *Drosophila Inform. Serv.* 32 : 139, (1958).
  - 7.—MIYOSHI, YASUHIRO: Eff. cts of some alkali metal ions on development of *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Inform. Serv.* 33 : 148, (1959).
  - 8.—MURRAY, C. L.; LEWIS, HERMAN: Studies on the effect of varying concentrations of salt on recombination in *D. melanogaster*. *Drosophila Inform. Serv.* 31 : 145, (1957).
  - 9.—LUERS, HERBERT: Differences in the reactions to HCN and to X-rays between a DDT-susceptible and a resistant stock of *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Inform. Serv.* 34 : 91, (1960).
  - 10.—BRINK, N. G.: The sterilizing action of heliotrine in *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Inform. Serv.* 34 : 72, (1960).
  - 11.—DEARDEN, M.: Experiments of the effect of farnesol on the development of normal and bar-eyed *Drosophila*. *J. Inst. Physiol.* 10 : 195, (1964).
  - 12.—OGITA, ZENICHI: Toxicity of phenylthiourea and phenylurea derivatives to several *D. melanogaster* strains resistant or susceptible to insecticides. *Drosophila Inform. Serv.* 33 : 151, (1959).
  - 13.—LEWIS, H. W.; LEWIS, H. S.: Effect of phenylthiocarbamide on viability of *Drosophila melanogaster* strains with high and low tyrosinase activity. *Nature* 196 (4850) : 192, (1962).
  - 14.—OGITA, ZENICHI: The genetic relation between resistance in general and that to phenylthiourea (PTU) and phenylurea (PU) in *Drosophila melanogaster*. *Botyu-Kagaku* 23 : 188, (1958).
  - 15.—RIZKI, M. T. M.: The effects of glucosamin hydrochloride on the development of *Drosophila melanogaster*. *Biol. Bull., Lancaster, Pa.* 118 (2) : 308, (1960).
  - 16.—AUERBACH, C.: Chemical Mutagenesis. *Biol. Abst.* 24 (8315), (1950).
  - 17.—KROMAN, R. A.; PARSONS, P. A.: Genetic basis of two melanin inhibitors in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 186 (4722) : 411, (1960).
  - 18.—RIZKI, ROSE M.; RIZKI, T. M.: Morphogenetic effects of 6-azauracil and 6-azauridine. *Science* 153 (3693) : 222, (1965).
  - 19.—TUMANYAN, V. G.: The physiological and mutagenic effect of D<sub>2</sub>O on *Drosophila melanogaster*. *Biol. Abst.* 45 (16) : 67133, (1964).
  - 20.—De MARINIS, F.; SHEIBLEY, F.: Action of amides on the development of bar eye *Drosophila*. *Proc. XVI Int. Con. Zool.* 2 : 203, (1963).
  - 21.—KANEHISA, TAKEHARU: Flavine; is O-xanthopterin and metal metabolism in relation to the formation of tumors in *Drosophila*. *Jap. Jour. Genet.* 35 (10) : 313, (1960).
  - 22.—KANEHISA, T.; FUJITA, K.: A relation between the tumor formation and xanthine-dehydrogenase activity in *D. melanogaster*. *Drosophila Inform. Serv.* 34 : 87, (1960).
  - 23.—HERSROWITZ, IRWIN H.; NORTON, ISABEL L.: Increased incidence of melanotic tumors in two strain of *Drosophila melanogaster* following treatment with sodium fluoride. *Genetics, Austin.* 48 (2) : 307, (1963).
  - 24.—KURODA, Y.; TAMURA, S.: Effects of Cu<sup>++</sup> on the melanotic growth of tumors in *D. melanogaster* in tissue culture. *Drosophila Inform. Serv.* 30 : 126, (1956).
  - 25.—KURODA, Y.; TAMURA, S.: Effects of DDC (diethylthiocarbamate) on the melanotic growth of tumors in *D. melanogaster* in tissue culture. *Drosophila Inform. Serv.* 30 : 126, (1956).
  - 26.—KURODA, Y.; TAMURA, S.: Effects of Fe<sup>++</sup> on the melanotic growth of tumors in *D. melanogaster* in tissue culture. *Drosophila Inform. Serv.* 30 : 126, (1956).
  - 27.—KATO, MIKIO: An effect of indolacetic acid on tumors in *D. virilis*. *Drosophila Inform. Serv.* 30 : 127, (1955).
  - 28.—FRUEGER, H.; EDDY, N.; SUMWAIT, M.: The Pharmacology of the Opium Alkaloids. Suppl. N° 165. Public Health Reports. U.S. Government Printing Office, Washington, (1943).
  - 29.—ALARCON A., M.; CID M., S.: Determinación manométrica de aminoxidasa en glándula hepática de *Pyura* sp. *Bol. Soc. Biol. Concepción, Tomo XXXVIII* : 41, (1963).



- 30.- BLISS, DOROTHY E.; SKINNER, DOROTHY M.: Tissue Respiration in Invertebrates. The American Museum of Natural History. New York (1963).
- 31.- UMBREIT, W. W.; BURRIS, R. H.; STAUFFER, J. F.: Manometric Techniques Burgess Publishing Co. Minneapolis, (1959).
- 32.- HOTTA, KYOKO; MAKITA, MITUO; KUROKAWA, MASAHARU; MITSUHASHI, TSUTOMU: Manometric determination of carbonic anhydrase of blood. The Gunma Jour. Med. Sc. 7 (4) : 253, (1958).
- 33.- SCHNEIDER, JERRY A.; TANNENBAUM, MYRON; YI-YUNG HSIA, DAVID: A manometric assay for glucose-6-phosphate dehydrogenase. Clin. Chim. Acta. 6 : 586, (1961).
- 34.- HABERMAN, ERNST: Manometrische bestimmung von phospholipase A. Biochemische Zeitschrift, 328 : 474, (1957).
- 35.- SCHOLANDER, P. F.; NIEMEYER, H.; LLOYD, CLAFF C.: Simple calibrator for Warburg respirometer. Science. 112:437, (1950).
- 36.- HOOPINGARNER, ROGER; BECK, STANLEY D.: Manometric calibration for insect respiration. Ann. Ent. Soc. Amer. 53(5):697, (1960).
- 37.- CROXTON, FREDERICK E.: Elementary statistics with applications in medicine and the biological sciences. Dover Publications Inc. New York, (1959).
- 38.- BOCHNIG, VERONIKA: A determination of the oxygen consumption and the respiratory quotient of DDT-resistant and susceptible *Drosophila melanogaster*. Drosophila Inform. Serv. 28 : 108, (1954).
- 39.- HUNTER, ALICE: Effects of temperature on *Drosophila*: Respiration of *D. melanogaster* grown at different temperatures. Comparative Biochem. Physiol 11 : 411, (1964).
- 40.- SETO, FRANK: Respiration curves of some pupal lethals. Drosophila Inform Serv. 33 : 159, (1959).
- 41.- TAKAOKA, MINORU: Studies of the metamorphosis of insects. III. Relation between pupation and oxygen tension in *Drosophila melanogaster*. Biol. Abst 34 (3) : 7991, (1959).
- 42.- WOLFF, S.; LINDSLEY, D. L.: Effect of oxygen tension on the induction of apparent XO males in *Drosophila*. Genetics, Austin 45 : 939, (1960).
- 43.- PARSONS, P. A.: Genotypic-environmental interactions for various temperatures in *Drosophila melanogaster*. Genetics, Austin 44 : 1325, (1959).
- 44.- RIZKI, T. M.; RIZKI, ROSE M.: An inducible enzyme system in larval cells of *Drosophila melanogaster* Jour. Cell Biol. 17 (1) : 87, (1963).
- 45.- HUNTER, ALICE S.; DE CEDIEL, N.: Krebs cycle enzymes of *Drosophila melanogaster*. Drosophila Inform. Serv. 37 : 91, (1963).
- 46.- RITOSSA, F.: Beta-galactosidase in various organs of *Drosophila busckii* and *melanogaster*. Drosophila Inform. Serv. 37 : 122, (1963).
- 47.- MUNZ, PETER: Untersuchungen über die aktivität der xanthindehydrogenase in organen und während der ontogenese von *Drosophila melanogaster*. Z. Vererbungsl. 95 : 195, (1964).
- 48.- KELLER, E. C., Jr.; GLASSMAN, EDWARD: Selection for xanthine dehydrogenase activity in *Drosophila melanogaster*. Jour. Elisha Mitchell Scient Soc. 80 (2) : 130, (1964).
- 49.- GLASSMAN, EDWARD: Xanthine dehydrogenase of *Drosophila melanogaster*. Jour. Elisha Mitchell Scient. Soc. 81 Suppl. 1 : 42, (1965).
- 50.- POULSON, F.; BOELL, E. J.: A comparative study of cholinesterase activity in normal and genetically deficient strains of *Drosophila melanogaster*. Biol. Bull. 91 (2) : 228, (1946).
- 51.- POULSON, D. F.; BOELL, E. J.: The development of cholinesterase activity in embryos of normal and genetically deficient strains of *Drosophila melanogaster*. Anatomical Record 96 : 12, (1956).
- 52.- OHNISHI, E.: Tyrosinase activity during puparium in *Drosophila melanogaster*. Drosophila Inform. Serv. 25 : 123, (1951).
- 53.- WOLSKY, ALEXANDER; KALICKI, HENRIETTA: Oxidative metabolism and puparium formation in the ebony mutant of *Drosophila melanogaster*. Nature, London. 183 (4668) : 1129, (1959).
- 54.- WARD, CALVIN L.; BIRD, MARGARET A.: Cytochrome oxidase activity in chromosome interchange stocks of the Oslo and Iso-Archer strains of *Drosophila melanogaster*. Genetics, Austin 48 (11) : 1435, (1963).
- 55.- FARNSWORTH, M. W.: Growth and cytochrome c oxidase activity in larval stages of the minute(2)12 mutant of *Drosophila* J. Exp. Zool. 157 (3) : 135, (1964).
- 56.- AUGENFELD, JOHN M.; NEESS, JOHN C.: Observations on the respiratory enzymes of various life-stages of *Chironomus plumosus*; *Chironomus staegeri* and *Aedes aegypti*, Biol. Bull. 120 (2) : 129, (1961).

- 57.- WYATT, G. R.: Metabolic regulation in the development of insects. *Control Mechanism in Respiration and Fermentation* 9 : 179, (1963).
- 58.- SCHULZ-ENDERS, ANNI: The action of the thyroxine on the oxidative phosphorylation of insect mitochondria. *Biol. Abst.* 43 (5) : 21232, (1963).
- 59.- OGITA, ZENICHI; KASAI, TSUTOMU: Genetic control of multiple esterases in *Musca domestica*. *Jap. J. Gen.* 40 (1) : 1, (1965).
- 60.- NOVOTNY, I.; KUBISTA, M.; FOUSTKA, M.: The effect of 2, 4-dinitrophenol on the level of acid-soluble phosphorus compounds in insects muscles in aerobic and anaerobic conditions. *Physiologia Bohemoslovenica*. 12 : 191, (1963).
- 61.- DE ROBERTIS, ED. P.; NOWINSKI, W. W.; SAEZ, F. A.: *Biología Celular Editorial El Ateneo. B. Aires* 361, (1965).
- 62.- JACOB, JOSEPH: A study of colchicine induced sterility in the female fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Growth* 22 : 17, (1958).
- 63.- PELECANOS, M.; ALDERSON, T.: The mutagenic response to adult feeding of diethyl sulphate in *Drosophila*. *Drosophila Inform. Serv.* 37 : 116, (1963).
- 64.- NASRAT, G. E.: Maleic hydrazide as a chemical mutagen. *Drosophila Inform. Serv.* 37 : 111, (1963).
- 65.- NAKAO, Y.; MORIOKA, Y.: A test of mutagenicity of 4-Nitroquinoline-N-oxide in *D. melanogaster* (feeding experiment). *Drosophila Inform. Serv.* 37 : 110, (1963).
- 66.- DE MAZAR BARNETT, B. K.: Induction of mutations by nitrovin and thiotepa in *Drosophila melanogaster* oocytes. *Drosophila Inform. Serv.* 37 : 72, (1963).
- 67.- KHISH'UN, AZIZ F.: Induction of mutations in *D. melanogaster* by "immersion" in solutions. *Drosophila Inform. Serv.* 35 : 89, (1961).
- 68.- BROWING, LUOLIN; ALTENBURG, EDGARD: Slight or doubtful mutagenic effects of some biologically highly reactive compounds when applied to the polar cap cells of *Drosophila*. *Drosophila Inform. Serv.* 38 : 41, (1963).
- 69.- ROHRBORN, G.: The mutagenicity of phenyl-N-lost-derivatives. *Drosophila Inform. Serv.* 41 : 146, (1966).
- 70.- ALDERSON, T.; PELECANOS, M.: The mutagenic activity of ethylating agents by the larval feeding method in the presence and absence of ribonucleic acid. *Drosophila Inform. Serv.* 36 : 53, (1962).
- 71.- KAPLAN, W. D.: The mutagenic action of Aramite, an acaricide. *Drosophila Inform. Serv.* 41 : 101, (1966).
- 72.- KHAN, A. H.: The mutagenic effect of N-nitroso-3-methyl-aminosulpholane. *Drosophila Inform. Serv.* 41 : 88, (1966).
- 73.- BROWNING, L. S.; ALTENBURG, E.: The mutagenicity of DON (6-diazo-5-oxo-norleucine). *Drosophila Inform. Serv.* 39 : 103, (1964).
- 74.- FAHMY, O. G.; FAHMY, MYRTLE J.: Differential gene response to mutagens in *Drosophila melanogaster*. *Genetics, Austin.* 44 (6) : 1149, (1959).