



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Ginandromorfos como indicadores de daño
reprotóxico por pérdida de función

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O

P R E S E N T A:
CLAUDIA CECILIA VEGA GARCÍA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. PATRICIA RAMOS MORALES

MÉXICO, D. F. 2008



1. Datos del alumno

Vega

García

Claudia Cecilia

55 93 86 65

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

40305464-0

2. Datos del tutor

Doctora

Patricia

Ramos

Morales

3. Datos de sinodal 1

Doctora

Martha Patricia

Ostrosky

Shejet de Wegman

4. Datos del sinodal 2

Doctora

María Eugenia

Gonsebatt

Bonaparte

5. Datos de sinodal 3

Doctora

Maricela

Villagrán

Santa Cruz

6. Datos de sinodal 4

Bióloga

Blanca Rosa

Hernández

Bernal

7. Datos del trabajo escrito

Ginandromorfos como indicadores de daño reprotóxico por pérdida de función.

89 pp

2008

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ ESTA INVESTIGACIÓN

Laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental de la
Facultad de Ciencias, UNAM.

El material biológico utilizado en este trabajo fue proporcionado por el
Banco de Moscas de la Facultad de Ciencias, UNAM.



APOYOS

El presente trabajo fue financiado parcialmente por el Programa de Apoyo a
Proyectos Institucionales para el Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME),
proyecto *PAPIME EN206803*. DGAPA, UNAM.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A mis padres:

Gracias por ser mis motores que me impulsan y mi ejemplo en esta vida.

Mamá gracias por que con tu amor, me has enseñado a ser guerrera y a luchar contra todo y nunca darme por vencida, por todo el apoyo durante mis logros y mis tropiezos. Éste mamá es un triunfo y un regalo para tí.

Papá no tengo palabras para agradecer todas aquellas veces que me has levantado de mis caídas, de los mejores momentos de mi vida y de todas las palabras que me dices, sé que son para ser mejor en la vida, y sobre todo por el ejemplo que me das para vivir. Este también es un triunfo para tí.

A mis hermanos:

Omar, Armando, mis niños, por que son uno pilar muy fuerte en mi vida, los amo. Sin ustedes no habría podido seguir adelante.

A mi hijo

Eduardo, mi motivo, contigo recibí un hermoso regalo, que me ha enseñado que el vivir es una odisea que jamás terminará, gracias hijo por ser tu quien iluminó mi vida y me ha dado la felicidad más grande. Te amo.

MUCHAS GRACIAS...

A la Dra. Patricia Ramos, no tengo palabras para agradecer todas las enseñanzas, las bases y los conocimientos que me has dado en todo este tiempo, por aquellas palabras que alientan para continuar cuando uno se siente derrotado y aquellas que motivan para seguir adelante.

A mis sinodales

Dra. Patricia Ostrosky, Dra. Eugenia Gonsebatt, Dra. Maricela Villagrán, Biol. Blanca Hernández, por el tiempo tan valioso y los comentarios dados a este trabajo.

Ramsés

Al amor a veces, hay que darle una segunda oportunidad, y porque no, dejar que el tiempo decida. Gracias Corazón porque en este tiempo has sido mi gran apoyo, quien me ha dedicado su tiempo y por la paciencia.

Por la entrega total de tu amor, no tengo palabras para decir lo feliz que me siento a tu lado. Espero que juntos podamos cumplir cada uno de nuestros sueños y que triunfemos en esta vida que quisiera recorriéramos juntos. No olvides que Te Amo Muxototototote. Y recuerda que todo por un Nature.

Biol Hugo Rivas, Master, muchas gracias por el apoyo en el laboratorio, así como te agradezco la amistad que me has brindado y por aquellas pláticas y consejos que me diste durante mi estancia en el laboratorio.

Biol Blanca, Gracias por el interés que le has prestado a este trabajo por los comentarios, el apoyo, el tiempo y la dedicación que me dedicaste para sacar este trabajo.

A mi Familia:

Mamá Lucy, por ser el primer ejemplo en esta familia, que nos has demostrado que no hay barrera que no se pueda derribar, y que no hay imposibles en esta vida.

A mis tíos: Tía Aurora, Tío Saúl, Tía Adriana, Tío Elías y a mis primos Adriana, Aarón, Cecilia, Gisela, Cristina, por que siempre me han dado cariño y ánimo para continuar y por estar conmigo siempre.

Familia. Salazar Vega

Manina, Bety, Oscar, Ramón, Tía Isidra, gracias por su cariño y por aquellos momentos, pláticas y consejos, por el apoyo y cariño que siempre me han dado.

A mis amigas

Rebeca, por que me has dado tu amistad en todos estos años, por todos los momentos de nuestras vidas, llegamos a la meta hermana,

Sol por que a pesar de la distancia se que siempre puedo contar contigo y sabes que siempre tendrás mi apoyo y mi amistad.

Linda, amiga, gracias por tu amistad, por los consejos y por aquellos momentos felices que pasamos y en aquellos donde me escuchabas y por el apoyo que siempre me das. Gracias Manis

A todas las Manis Mon, Alicia, Laura, Isis, Aurora y Omar. Y a todos aquellos que estuvieron conmigo a lo largo de este camino.

Al Banco de moscas, por la disposición del material para poder realizar la parte experimental de este trabajo.

ÍNDICE

Resumen	2
1. Antecedentes	4
1.1 Toxicología	
1.2 La Toxicología Genética	
1.3 Metabolismo	
1.4 Modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	
1.4.1 <i>Drosophila melanogaster</i>	
1.4.2 <i>Drosophila mulleri</i>	
1.5 Determinación de Sexo en <i>Drosophila</i>	
1.5.1 Ginandromorfos	
1.6 <i>N</i> -Nitrosodimetilamina	
2. Justificación	33
3. Hipótesis	34
4. Objetivos	35
4.1 Objetivos particulares	
5. Materiales y Método	36
6. Resultados	45
7. Discusión	66
8. Conclusiones	73
9. Referencias	74

RESUMEN

Los seres vivos se encuentran expuestos a una gran cantidad de agentes externos, ya sean físicos, químicos o biológicos, los cuales pueden actuar como agentes genotóxicos cuando están dentro del organismo, teniendo efectos mutagénicos, carcinogénicos o teratogénicos.

En este trabajo se evaluó el daño causado por un agente químico, *N*-nitrosodimetilamina (NDMA), considerado como genotóxico, del cual se han encontrado evidencias de que en *D. melanogaster* tiene efectos a diferentes niveles. Uno de estos es que altera la proporción de sexos de los organismos que se recuperan después de la exposición a este compuesto; causando efectos no solo para estos organismos expuestos, sino también otros a largo plazo puesto que la fertilidad de estos organismos se ve comprometida, al ser la mayoría de estos estériles.

En este trabajo, *Drosophila melanogaster* y *Drosophila mulleri*, se usaron como modelos. Los organismos se expusieron a diferentes concentraciones del compuesto *N*-nitrosodimetilamina (NDMA), a los dos tercios del desarrollo larvario. En general, *D. mulleri* mostró mayor sensibilidad que *D. melanogaster*, en cuanto a la toxicidad del compuesto, esto reflejado en una disminución en el índice de sobrevivencia (IS).

En cuanto a la proporción de sexos, se observaron fluctuaciones con respecto de su testigo reflejando efectos de esterilidad en ambas cepas y una reducción en el número de hijos que se obtuvieron por cada macho tratado con respecto a su testigo.

Esta variación en la proporción de sexos causada por el compuesto, podría explicarse por la pérdida de la función de cromosomas X afectando en

consecuencia la formación de hembras de *Drosophila*, lo que provoca la aparición de más organismos machos producto de los tratamientos.

El macho de *D. mulleri* al presentar gónadas coloreadas, facilitó la ubicación visual de organismos mosaicos (Ginandromorfos) los cuales explican la variación sexual causada por el compuesto, además también se comprobó que la fertilidad de los organismos con menos gónadas es escasa o nula.

1 ANTECEDENTES.

1.1 Toxicología

La Toxicología se define como la ciencia que estudia los efectos adversos de las sustancias químicas en los organismos, las vías de exposición a estos, las rutas metabólicas implicadas en la transformación, eliminación y excreción de los tóxicos; así como los mecanismos a nivel celular y molecular por los que se produce algún daño a los organismos expuestos. La Toxicología tiene la finalidad de establecer medidas de seguridad en el manejo de los tóxicos y con ello reducir el impacto negativo en la salud (Brusick, 1987; Timbrell, 2002).

Un tóxico es toda sustancia química que administrada a un organismo provoca efectos nocivos en su salud. Algunos de los tóxicos son xenobióticos es decir sustancias que no han sido producidas por el organismo, como los productos industriales, drogas terapéuticas, aditivos de alimentos y compuestos inorgánicos, entre otros; pero también se han identificado sustancias tóxicas producidas por animales y vegetales (Peña *et al.*, 2001; Kniewald *et al.*, 2004).

La toxicidad de los compuestos químicos se establece con base en la cantidad administrada así como por la forma y duración de la exposición, la cual puede ser: aguda, subcrónica y crónica, lo que a su vez determina el tipo y magnitud de la respuesta biológica (Brusick, 1987). Estos efectos se miden a corto, mediano y largo plazo (Timbrell, 2002).

Para evaluar el efecto de sustancias tóxicas en los organismos, se utilizan diferentes modelos biológicos. Estos modelos van desde organismos simples

como bacterias, hasta organismos complejos como insectos o mamíferos, con los que se busca reproducir aspectos relacionados con la organización biológica de los seres humanos (Kniewald *et al.*, 2004).

La elección de estos organismos modelo depende, entre otros, de factores como la conveniencia de éstos como modelos para experimentar, es decir qué tanto el organismo se acerca a la anatomía y fisiología de los humanos, el tiempo en el que se obtienen resultados y el costo de mantenimiento de estos organismos (Brusick, 1987; Hyne y Maher, 2002; Kniewald *et al.*, 2004).

La actividad profesional de los toxicólogos se divide en tres categorías principales: descriptivo, mecanicista y de regulación (Fig. 1), estas actividades están diseñadas para implementar técnicas así como para describir el posible daño ocasionado por las sustancias químicas. Aunque cada jerarquía tiene características propias, cada una de ellas contribuye a la otra y todas son de vital importancia para la evaluación de los riesgos químicos (Klaassen, 2001).

El estudio de la toxicología se puede dividir en diversos campos de estudio como la farmacocinética (para el estudio del metabolismo de agentes químicos), la genética toxicológica, la teratogénesis (principalmente para evaluación de daño en el desarrollo), inmunotoxicología y toxicología de la conducta, entre otras (Dickerson *et al.*, 1994).

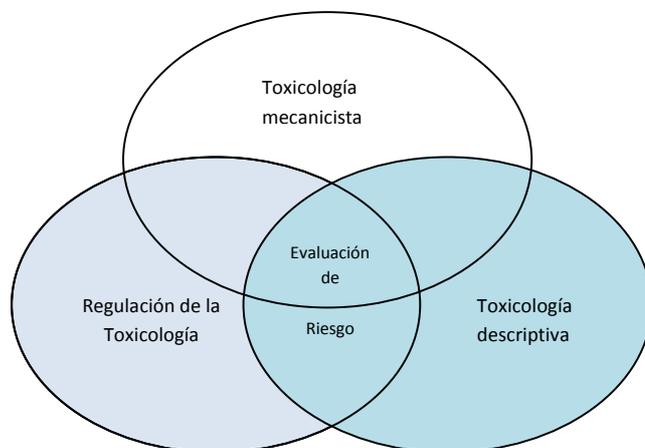


Fig. 1. Representación grafica de las interacciones entre las diferentes áreas de la toxicología (Klaassen, 2001)

1.2 La Toxicología Genética

Es una rama de la toxicología que identifica y analiza la acción de aquellos agentes químicos con toxicidad directa hacia componentes asociados a la herencia de los seres vivos (Brusick, 1987), los cuales producen algún tipo de alteración en el material genético ó en sus componentes asociados.

Los estudios de la toxicología genética enfocan su atención en niveles de exposición que no se consideran tóxicos, porque no causan efectos inmediatos identificables fácilmente, pero que tienen su efecto sobre el DNA. En 1983, la Comisión Internacional para la Protección contra Mutágenos y Carcinógenos Ambientales estableció una definición que limita el uso del término genotóxicos a aquellos agentes que tienen afinidad para interactuar con el DNA (ICPEMC, 1983).

Los genotóxicos (externos químicos, biológicos, etc.), pueden identificarse a través de los cambios que provocan en las enzimas metabolizadoras, receptores, moléculas transportadoras y otros marcadores morfológicos, fisiológicos o de otra naturaleza que se manifiesten en los organismos expuestos, en contraposición con los de organismos no expuestos a éstos.

La caracterización de los cambios ocurridos contribuye a detectar efectos potenciales, además de valorar, explicar y predecir si existe relación entre la exposición de los agentes con la inducción de daño genético en células somáticas ó células germinales de los organismos que puedan aumentar las frecuencias de enfermedades genéticas (Vogel, 1992; Sanz, 2002; Hyne y Maher, 2002).

Esta disciplina tendría por lo tanto dos funciones; por una parte, la implantación de métodos y pruebas para evaluar el riesgo de los agentes tóxicos presentes en el ambiente y su interacción con el material genético (daño a nivel de células somáticas y germinales) (Gonsebatt *et al.*, 1995) y por otra, la aplicación de estas metodologías (herramientas y técnicas), para la detección y el conocimiento de los mecanismos traducidos en varios procesos nocivos como: la mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis entre otros (Vogel, 1992; Craigmill, 2002; Kniewald *et al.*, 2004).

Una parte importante de los compuestos es que exhiben su actividad al interactuar con el DNA generando cambios en su calidad (inducción de mutaciones génicas) o en su integridad (intercambios de cromátidas hermanas, translocaciones y aberraciones cromosómicas), tanto de células somáticas como sexuales (Brusick, 1987; Gonsebatt *et al.*, 1995).

Por ejemplo estudios han descrito a la *N*-nitrosodimetilamina (NDMA) como un compuesto con actividad mutagénica, capaz de modificar químicamente a las bases; tiene actividad clastogénica por lo que induce intercambio de cromátidas hermanas; forma aductos en el DNA y su actividad carcinogénica también se ha

visto a través de la formación de tumores en riñón, hígado y en algunos sitios de aplicación; así como provocar daño en los órganos reproductores (mutaciones en células germinales, degeneración en los conductos seminíferos, feminización de los organismos expuestos, daño en el DNA de espermatozoides), también se ha observado que en los organismos en periodo reproductivo provoca abortos en el desarrollo, así como malformaciones en la prole (Magee y Barnes, 1962; Schmidt y Murphy, 1966; Hard y Butler, 1970a, b; McLean y Magee, 1970; IARC, 1978; Inui *et al.*, 1979; Bolognesi *et al.*, 1988; ATSDR, 1989).

A nivel somático, también se ha observado que algunos genotóxicos alteran la calidad o la integridad del DNA. Lo anterior se ha asociado con la transformación celular a fenotipos malignos que posiblemente lleven a la aparición de algún tipo de cáncer en los organismos, aunque si la exposición ocurre en las células no diferenciadas de organismos en desarrollo también puede provocar malformaciones morfológicas o tener efectos funcionales como infertilidad, muerte prematura de los organismos (aborto); mientras que a nivel germinal se manifestarán como cambios heredables en las generaciones descendiente del organismo (Venitt y Phillips, 1995; Craigmill, 2000; Klaassen, 2001; Creus, 2001; Young, 2002).

El daño a los ácidos nucleicos puede ocurrir como consecuencia de la actividad endógena de las células y sus efectos tienden a acumularse en función del tiempo, por lo que contribuyen de manera importante al envejecimiento celular, al desarrollo de diversas enfermedades degenerativas ó la formación de tumores.

La exposición a compuestos genotóxicos incrementa la acumulación de daño a las células generando una respuesta que se relaciona con su actividad metabólica, así como con su capacidad de reparar el daño causado (Dickerson *et al.*, 1994).

El reconocimiento de la mutagénesis, como paso previo para el desarrollo de alguna enfermedad y los peligros potenciales de los agentes mutagénicos para la

población humana y la biosfera, despertó el interés por desarrollar técnicas dentro de la Genética Toxicológica, pruebas que ayudan a encontrar la posible solución a los efectos de genotóxicos (Brusick, 1987), para el desarrollo de estas metodologías, también debe considerarse el tipo de actividad metabólica del organismo.

1.3.1 Metabolismo

Hay diferentes rutas por las cuales un tóxico entra al organismo; los más importantes son la ingestión, la respiración y el contacto cutáneo (Craigmill, 2002). Para estudiar el transporte, modificaciones y destino de los tóxicos dentro del organismo es necesario determinar la concentración del tóxico a la que produce daño, así como medir la magnitud de exposición a éste.

La exposición es el tiempo de contacto de un organismo con un agente químico. Todos los biomarcadores responden dependiendo del tiempo de exposición del agente químico y la manera en que la sustancia es introducida al organismo. La magnitud de la exposición se determina midiendo la cantidad (concentración) del agente que está presente en la superficie de contacto del órgano blanco durante un período específico (Peña *et al.*, 2001).

En las superficies de contacto del organismo, las sustancias penetran a diferentes velocidades, dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas y de las condiciones que existan en la superficie de contacto, tales como, área y permeabilidad de la membrana de contacto y magnitud del flujo sanguíneo en la zona, así como de la cinética del compuesto para llegar al sitio de acción u órgano blanco (Kivisto *et al.*, 1995; Craigmill, 2002).

El sitio de acción es aquella parte del organismo que recibe el impacto del tóxico y presenta la respuesta biológica correspondiente a la exposición. Éste puede ser una molécula (DNA, proteína, etc.), un órgano (hígado, riñón, cerebro, médula espinal, entre otros) o un sistema (SNC). También se dice que un blanco puede ser un individuo, subpoblación o población que quedan expuestos a los tóxicos en un sitio determinado (Timbrell, 2002; Guengerich, 2005, 2006).

Desde el momento en que el agente tóxico, penetra en el organismo puede empezar a ser transformado por distintas enzimas del organismo, ya que el agente puede ser sustrato de estas enzimas. Una vez en el interior, puede ser transportado por la sangre a los distintos órganos del cuerpo en los que se distribuye y en algunos de ellos puede llegar a producir daño (Guengerich, 2006).

Como consecuencia del proceso de desintoxicación, se incrementa la polaridad de los compuestos químicos lo cual los hace menos difundibles a través de las membranas biológicas y más solubles en el agua, lo que facilita su excreción en forma de solución acuosa (orina). Estos procesos reducen la cantidad de tóxico que penetra al tejido blanco así como, el tiempo de permanencia de éste dentro del organismo y por lo tanto, reducen la magnitud del daño probable a las células del tejido blanco (Kivisto *et al.*, 1995; Anwar, 1997).

En general, el tipo de reacciones implicadas en respuesta a la presencia de sustancias tóxicas son similares y se han conservado evolutivamente, encontrándose reacciones análogas, desde las bacterias hasta los organismos superiores (Hyne y Maher, 2002; Kniewald, 2004).

El metabolismo de un organismo es el conjunto de reacciones enzimáticas, organizadas en rutas bioquímicas, que mantienen la funcionalidad de las células con las características estructurales y funcionales propias.

Cuando las reacciones enzimáticas operan sobre componentes endógenos, se habla de su propio *metabolismo*, pero cuando estas reacciones enzimáticas operan sobre agentes exógenos o xenobióticos, se habla de *reacciones de biotransformación* (Peña *et al.*, 2001; Hyne y Maher, 2002).

La biotransformación (Fig. 2), involucra dos grupos de reacciones, las de oxidoreducción (Fase I) y las de conjugación (Fase II). Este conjunto de reacciones son catalizadas por enzimas que existen normalmente en el organismo y mediante las cuales se transforman compuestos endógenos derivados de su propio metabolismo (Guengerich, 2006). Estas reacciones de biotransformación, convierten a los tóxicos en agentes químicos distintos, que pueden ser menos o más dañinos, si los derivados producidos resultan más dañinos se dice que el proceso fue una bioactivación y si lo convierten en sustancias menos peligrosas se dice que el proceso fue una desintoxicación (Kivisto *et al.*, 1995; Gil y Pla, 2001; Guengerich, 2006).

Así, en el primer conjunto de reacciones (oxidaciones, reducciones e hidrólisis) o de Fase I, la biotransformación implica la conversión de compuestos lipofílicos (no polares) en compuestos más polares, por lo tanto, más solubles en agua; éstas tienen lugar frecuentemente bajo la catálisis de enzimas. Por ejemplo, las oxidaciones incluyen todas las monooxigenasas dependientes del Cyp P450 (Kivisto *et al.*, 1995; Gil y Pla, 2001; Guengerich, 2006; González y Jaime, 2006).

Con frecuencia estas reacciones llevan a la producción de compuestos que pueden ser más, igual o menos tóxicos que sus predecesores (Kivisto *et al.*, 1995; Gil y Pla, 2001; Guengerich, 2006). El efecto colateral indeseable de la biotransformación, ocurre cuando se producen sustancias químicas muy reactivas, normalmente son compuestos electrofílicos con gran afinidad por los nucleófilos como el DNA, las proteínas y los lípidos (Craigmill, 2002).

Las reacciones de Fase II son reacciones de conjugación, en las cuales un metabolito con enlaces de alta energía, cede un grupo funcional polar al compuesto, o su producto de transformación por la Fase I (glucuronidación, sulfonación, formación de ácido mercaptúrico, etc.), donde los compuestos polares en origen, y los xenobióticos que se han convertido en polares por haber soportado reacciones tipo Fase I, son conjugados con sustancias endógenas hidrofílicas (ácido glucurónico, sulfato, glutatión) (Klaassen, 2001; Guengerich, 2006).

Estas reacciones enzimáticas están encaminadas a aumentar aún más la hidrosolubilidad de sus sustratos y hacerlos más fácilmente excretables por el organismo. Además la mayor parte de los derivados conjugados tienen muy baja actividad biológica, por consiguiente, muchas reacciones de la fase II son reacciones de bioinactivación en procesos de desintoxicación (Gil y Pla, 2001; Peña *et al.*, 2001; Klaassen, 2001).

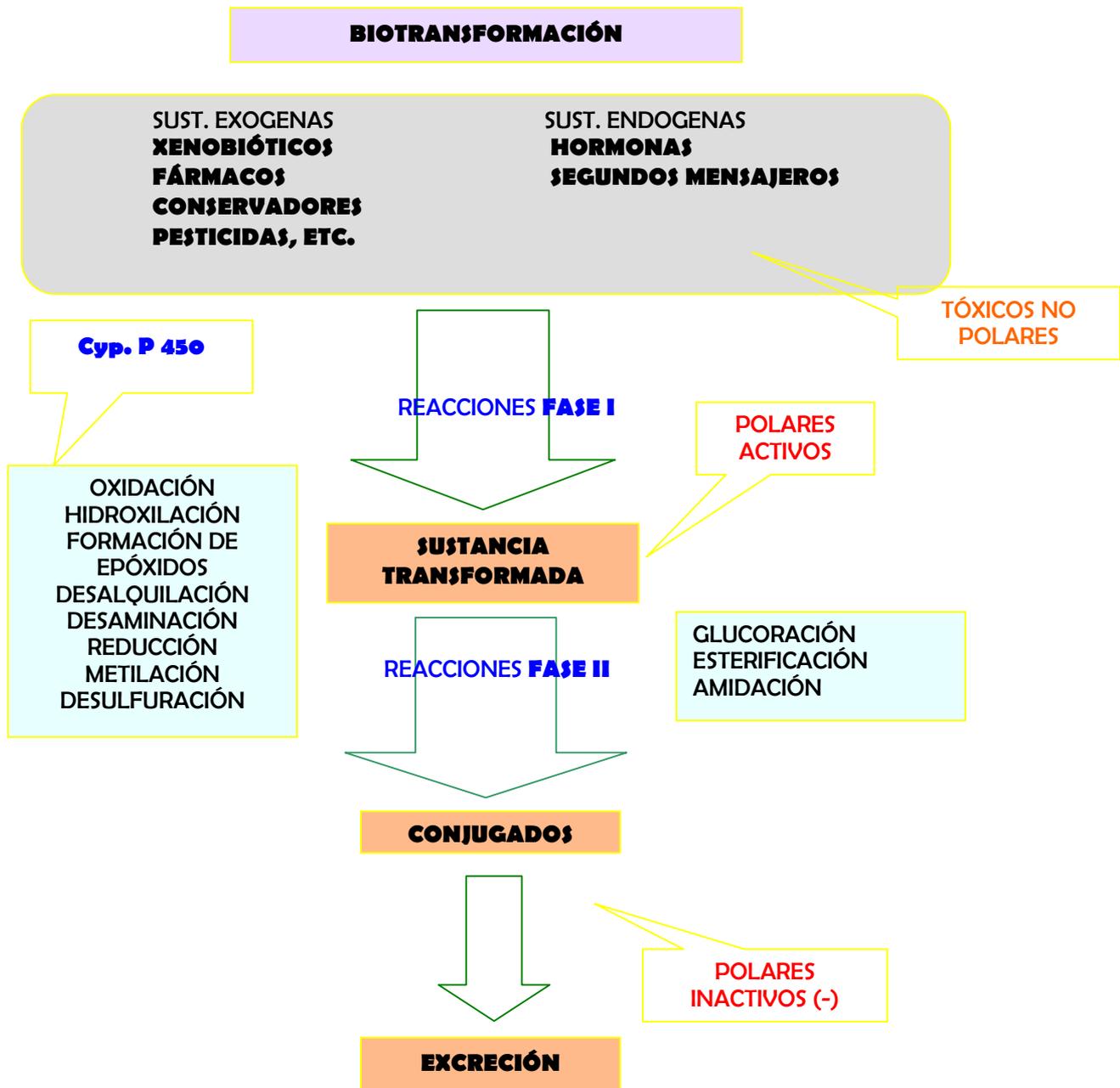


Fig. 2. Mecanismos de biotransformación (Kivisto *et al.*, 1995; Guengerich, 2006).

Una vez que el tóxico ó agente químico, ha sido biotransformado por el metabolismo de los organismos y que éste haya llegado a su órgano, tejido ó célula blanco puede provocar efectos diversos dependiendo del tipo celular que afecte y de las características particulares de los organismos expuestos.

Para identificar la ruta que siguen estos agentes químicos se utilizan marcadores biológicos o biomarcadores, que constituyen cambios medibles en los niveles de sustancias que participan ó son producto de la actividad bioquímica, fisiológica ó funcional de los organismos y cuyos niveles característicos varían en asociación con la exposición a un tóxico (Peña *et al.*, 2001; Hyne y Maher, 2002).

Los biomarcadores se utilizan para detectar la presencia de la exposición a un agente exógeno y las consecuencias biológicas de dicha exposición; también se usan para determinar los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico, así como para identificar a los individuos sensibles de una población. El estudio de estos marcadores posibilita la toma de decisiones encaminada a reducir tanto a nivel individual como ambiental el impacto de la exposición (Hyne y Maher, 2002).

1.4 Modelos *in vitro* e *in vivo*

Se han diseñado diversas metodologías para evaluar el impacto de los genotóxicos, así como, para establecer sus posibles mecanismos de acción. Aquellas en las que se aísla un tejido para analizar efectos particulares inducidos por genotóxicos, o modelos *in vitro*, han sido de gran utilidad, porque producen resultados en poco tiempo, además de que la reproducibilidad de la respuesta puede mejorarse a través del control de las variables que podrían afectar a las actividades experimentales.

Otras estrategias experimentales se basan en el uso simultáneo de algún organismo o parte de éste, el cual es complementado con productos obtenidos de otro organismo, con la finalidad de conferirle al sistema experimental la capacidad de realizar algún tipo de actividad en particular, por ejemplo, la adición de la fracción S9 del hígado de mamíferos, que contiene enzimas relacionadas con las

principales funciones de transformación metabólica a cultivos bacterianos y de células de eucariontes, tanto animales como vegetales, para mejorar la detección de aquellos compuestos que adquieren actividad genotóxica vía el metabolismo de los organismos expuestos (promutágenos, procarcinógenos) (Ramos *et al.*, 1993).

Si bien el tiempo e inversión requeridos en este tipo de estudios favorece la obtención de gran cantidad de información, es conveniente que la respuesta obtenida sea comprobada en sistemas *in vivo*, de manera que se confirme la respuesta obtenida o bien, se identifique la participación de otros elementos no evidenciados en los sistemas *in vitro*. Esto es especialmente relevante en el caso de drogas y sustancias de nueva síntesis, que se pretenda que lleguen a ser utilizadas por el ser humano.

Es importante resaltar que aunque los modelos experimentales de este trabajo son del mismo género, son especies totalmente diferentes, en cuanto a su hábitat, así como, a las diferencias filogenéticas y morfológicas, que las llevan a estar en subgrupos diferentes.

1.4.1 *Drosophila melanogaster*

Dentro del orden Díptera se encuentra el género *Drosophila*, que a su vez está formado por varios grupos artificiales para facilitar su estudio (Grimaldi, 1990). *Drosophila melanogaster* (Hsu, 1949; Okada, 1954; Bock y Wheeler, 1972; Bock, 1980, Anholt *et al.*, 2004; Tucson *Drosophila* Stock center of The University of Arizona, 2004) se encuentra dentro de un grupo artificial llamado *melanogaster* contiene 177 especies descritas dentro de 12 subgrupos (Russo, 1995; Pfeiler y Markow, 2001; Shawaroch, 2002).

El grupo *melanogaster* es un grupo monofilético con tres clados representativos, esto se obtuvo usando tres genes de 43 especies representativas dentro de este grupo (Ashburner *et al.*, 1984; Schawaroch, 2002, Rifkin *et al.*, 2003). Hasta ahora es el más completo en la historia filogenética de este grupo (Goto y Kimura, 2003; Schawaroch, 2002).

REINO: Animalia

FILA: Arthropoda

CLASE: Insecta

ORDEN: Díptera

FAMILIA: Drosophilidae

GENERO: *Drosophila*

GRUPO: *melanogaster*

ESPECIE: *Drosophila melanogaster*

D. melanogaster, o mosca del vinagre, es un insecto cosmopolita, está ampliamente distribuido, por lo que se le encuentra en todo tipo de clima, altitud y latitud. Se localiza especialmente en las frutas suaves, donde la fermentación se ha iniciado y en general en alimentos con alto contenido de ácido acético (Ramos *et al.*, 1993).

Es un insecto que mide alrededor de 3 mm de largo, morfológicamente cuenta con dos pares de alas, en los que el primer par de alas es funcional, y el segundo se ha transformado en órganos de equilibrio (Ramos *et al.*, 1993); el macho, presenta peines sexuales en su primer par de patas, haciendo esta, una diferencia con la hembra; los últimos tres segmentos de su abdomen se encuentran fusionados en la parte dorsal, y por la parte ventral, tiene una coloración amarillenta, sus gónadas presentan una coloración amarilla muy tenue, y cuando el organismo es maduro se va tornando más oscuro, sin embargo su tamaño es pequeño y por lo tanto poco visible (Ramos *et al.*, 1993; Markow y O'Grady, 2006).

El ciclo de desarrollo de *D. melanogaster*, tiene una duración de diez días a partir de la fertilización del huevo (0h), una fase larvaria la cual tiene tres estadios, larva de 1er. estadio (24h), larva de 2do. estadio (48h) y larva de 3er. estadio (72h), la fase de pupa (120h) y por último el imago a los 10 días. Sin embargo es a los dos tercios del desarrollo larvario cuando los organismos son sometidos a tratamientos, debido a que esta etapa es importante porque hay un incremento en su actividad enzimática parecida a la del adulto, también hay un incremento en las células blanco para cada órgano, las cuales en esta etapa alcanzan su diferenciación, por lo tanto es este estadio el más óptimo para observar el efecto de la actividad del compuesto a nivel del desarrollo.

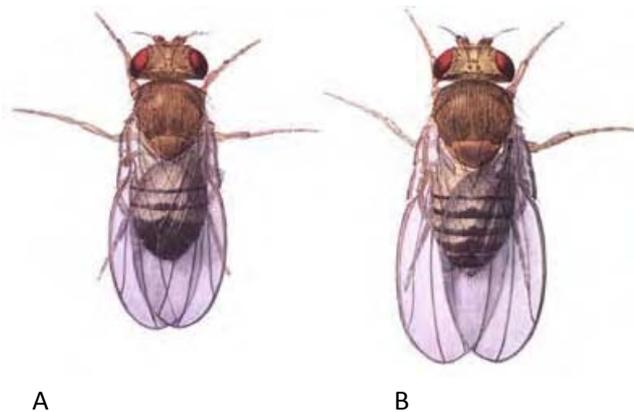


Fig. 3. *Drosophila melanogaster*; A) macho B) Hembra.

Drosophila melanogaster es uno de los organismos más estudiados y ventajosos dentro de la Biología. Se ha utilizado en el ámbito genético desde 1909 con Thomas H. Morgan, quien la utilizó como modelo para el estudio de la teoría cromosómica (Kohler, 1994), ha sido utilizado como modelo genético desde el siglo pasado, en estudios de herencia, mutagénesis, teratogénesis, estudios de enfermedades neurodegenerativas, de factores de sensibilidad genética, entre otros.

Por ejemplo en 1928 Müller, realizó estudios sobre la actividad mutagénica de los rayos X en el material hereditario de las células germinales en este modelo (Cuenca y Ramírez, 2004).

Esto abrió la posibilidad de crear organismos mutantes y estudiar las mutaciones en condiciones experimentales controladas; desde entonces, este organismo ha proporcionado valiosa información, acerca de la actividad tóxica y genotóxica de diversos factores, tanto físicos como químicos (Cuenca y Ramírez, 2004). Y en la actualidad se utiliza como un sistema de prueba para la investigación de procesos del desarrollo, así como en investigaciones de biología celular, y molecular.

Es clara la diferencia en complejidad de *D. melanogaster* con otros sistemas de prueba como ratones y otros modelos incluso con los seres humanos, pero presenta complejos enzimáticos semejantes a los que se presentan en la fracción S9 del hígado de los mamíferos (Negishi *et al.*, 1991; Graf *et al.*, 1992b; Shibahara *et al.*, 1995); esto es importante ya que se pueden comparar los efectos mutagénicos de los mamíferos y los inducidos en *D. melanogaster* (Ramos *et al.*, 1993, 1994; Adams *et al.*, 2000).

D. melanogaster es un modelo biológico que presenta sensibilidad a compuestos químicos con actividad genotóxica. La información obtenida a partir de este modelo contribuye a la comprensión de los efectos que estos pueden tener en el medio ambiente y en los seres vivos.

D. melanogaster es un eucarionte que cuenta con una gran variedad de líneas o cepas mutantes, las cuales producen fenotipos claros y fáciles de diferenciar en el organismo.

Gracias a estos marcadores genéticos *D. melanogaster* facilita el estudio de la herencia en los organismos, así como, otros procesos como son mutaciones génicas, daño cromosómico en células germinales, mutación y recombinación en células somáticas (Schneider, 2000; Gilbert, 2004). Así como alteraciones a nivel de individuo o a nivel de población.

Otras ventajas de experimentar con este modelo son: que presenta un número cromosómico pequeño ($2n = 8$); las larvas presentan cromosomas gigantes en sus glándulas salivales, por lo que es de gran utilidad para estudiar la morfología cromosómica; un ciclo de vida corto (10 – 12 días a 25° C), con lo que obtenemos resultados a corto plazo; presenta distinción clara en los diferentes estadios de su ciclo de vida, así como, un dimorfismo sexual evidente (fig. 3); la gran cantidad de descendencia que pueden producir y para mantenerlas se requiere de poco espacio (Muñoz, 1995; Hernández, 2000).

1.4.2 *Drosophila mulleri*

Dentro del género *Drosophila* existen otros grupos; el *grupo Repleta*; donde están las especies de mayor tamaño (Wasserman 1960, 1968, 1979, 1992; Throckmorton 1982a; Vilela 1983; Simpson, 2002), y que también es un grupo muy representativo para el género, sin embargo en este grupo existe mucha variabilidad genética, lo cual, llevo a la formación de cinco subgrupos dentro del grupo: *mulleri*, *hydei*, *mercatorum*, *repleta* y *fasciola*; que a su vez han sido divididos en diferentes niveles y subgrupos (Richardson *et al.*, 1977a, 1977b, Durando *et al.*, 2000).

El subgrupo *mulleri* se coloca de manera independiente y alejado de los demás subgrupos, a partir de un origen monofilético. El subgrupo *mulleri* se divide en dos niveles importantes *mulleri* y *buzzati*, dos grandes conjuntos, que además cuentan con una gran cantidad de especies. (Wasserman 1976; Bicudo y Richardson, 1977; Schuzle y lee, 1986; Durando *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2006). Dentro de este subgrupo encontramos a la especie *D. mulleri*.

REINO: Animalia
FILA: Arthropoda
CLASE: Insecta
ORDEN: Díptera
FAMILIA: Drosophilidae
GENERO: *Drosophila*
GRUPO: *repleta*
Subgrupo: *mulleri*
Complex (conjunto): *mulleri*
Cluster (rama): *D. mulleri*
ESPECIE: *Drosophila mulleri*¹

La distribución de *Drosophila mulleri* abarca desde el desierto de Sonora, el noreste de México (Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas), así como el sureste de los Estados Unidos (desierto de Texas), aunque también a lo largo de la parte sudeste se han colectado especímenes de *D. mulleri* (Durando *et al.*, 2000).

Por lo tanto su alimentación es básicamente de plantas del desierto, principalmente plantas en descomposición como el saguaro y las biznagas entre otros. Su mayor abundancia en el año es en otoño (Durando *et al.*, 2000).

El macho tiene un tamaño aproximado de 2.6 mm y presenta alas de hasta 2.2 mm de largo. La hembra mide aproximadamente 2.8 mm y sus alas 2.4 mm de largo (Fig 4). Ambos sexos presentan aristas, con siete bifurcaciones, antenas de coloración amarillo-café brillante, ojos rojos, la coloración del cuerpo es amarillo-café oscuro, a los lados presenta ocho hileras de pelos, delgados, alargados y en posición pre-escutelar. Los pelos son color café oscuro. El tórax presenta una coloración café opaco, característico de su grupo filogenético (Patterson, 1943;

¹ Lista Taxonómica obtenida de Durando *et al.*, 2000.

Patterson, y Mainland, 1944; Tucson Drosophila Stock center of The University of Arizona, 2004).

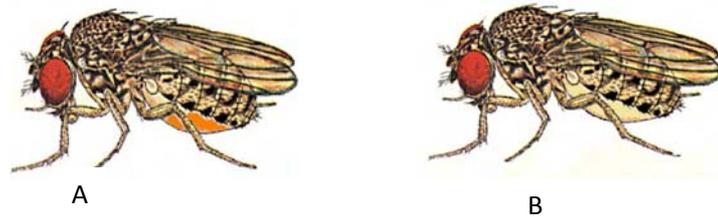


Fig 4 *Drosophila mulleri*; A) Macho, B) Hembra

Las patas con una coloración amarilla-café brillante y una banda estrecha de color negro corre por cada tibia presentando cerdas apicales en la primera y segunda tibia, y pre-apicales en la tercera. En el abdomen tiene terguitos amarillos, y en cada segmento bandas de coloración café. La coloración por lo tanto no es pareja a lo largo del segmento, se presenta como triángulos o manchas alrededor de las bandas de los segmentos (Patterson, 1943; Patterson, y Mainland, 1944).

La diferenciación entre el macho y la hembra no es tan evidente como en *D. melanogaster*, morfológicamente ambos sexos son muy similares, sin embargo en esta especie el dimorfismo sexual lo da únicamente la característica de gran importancia para el desarrollo de este trabajo y es la coloración de sus gónadas y el tamaño de las mismas.

Las gónadas masculinas o testículos tienen una coloración amarillo- rojizo, desde el momento de emerger es evidente la coloración, y conforme el organismo madure sexualmente el color rojizo es mucho más evidente. Tienen una forma espiral (entre 2 y 3 vueltas en espiral). La espermateca es esférica, el receptáculo en posición ventral, con forma de una espiral holgada (aproximadamente 20 ondas) (Fig 5) (Patterson, 1943; Patterson, y Mainland, 1944).

El ciclo de desarrollo de *D. mulleri*, tiene una duración de trece días a partir de la fertilización del huevo (0h), una fase larvaria la cual tiene tres estadios, larva de 1er. estadio (24h), larva de 2do. estadio (60h) y larva de 3er. estadio (96h), la fase de pupa (144h), por ultimo el imago a los 13 días. Sin embargo es a los dos tercios del desarrollo larvario cuando los organismos son sometidos a tratamientos, debido a que esta etapa es importante porque hay un incremento en su actividad enzimática parecida a la del adulto, también hay un incremento en las células blanco para cada órgano, las cuales en esta etapa alcanzan su diferenciación, por lo tanto es este estadio el más óptimo para observar el efecto de la actividad del compuesto a nivel del desarrollo.

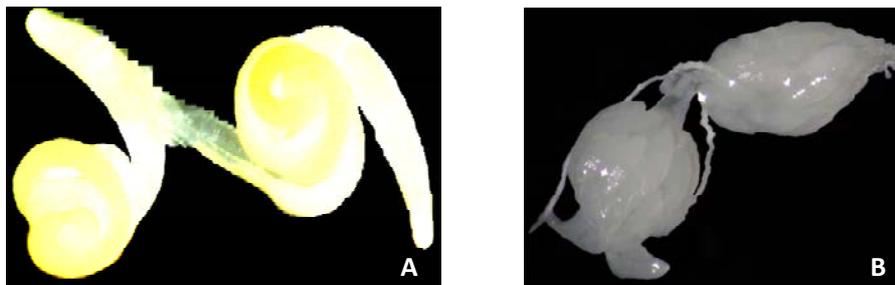


Fig. 5. Gónadas de *Drosophila mulleri*; A) macho; B) Hembra

Esta característica es importante ya que con la coloración de sus gónadas, es fácil identificar entre las poblaciones a los organismos machos de las hembras; así este marcador natural contribuye a comprender las fluctuaciones entre los géneros de una población, la cual esta alrededor de un 50:50, es decir, tiende a estar en equilibrio. Este equilibrio se puede ver alterado cuando los individuos se exponen a un agente que provoca cierta variación en el índice sexual, sin que el número de individuos por población, se modifique; en este caso existe una masculinización de los organismos debido al equilibrio cromosómico que determina el sexo en *Drosophila*.

En este trabajo, *Drosophila melanogaster* se utilizó como referencia, puesto que es un excelente sistema de prueba además de que es considerado un material adecuado debido a su fácil manejo, y ciertas características ya mencionadas, que ésta presenta y que la hacen un modelo importante en el área experimental. Una característica que une a estas dos especies es que la determinación del sexo es básicamente similar; lo que quiere decir que la distribución de los géneros en ambas especies se da por un equilibrio génico X/A.

1.5 Determinación del Sexo en *Drosophila*

Las células de *Drosophila*, tienen la elección independiente tanto de dividirse así como de tener un número cromosómico diferente al de una célula vecina. En experimentos clásicos realizados por Calvin Bridges hace más de 80 años, se concluyó acerca de cómo se determina el sexo en *Drosophila* (Bridge 1916, 1920, 1925). Él mostró que el cromosoma Y no es un factor determinante, lo único que nos va a indicar es la fertilidad del macho, sugirió que el sexo se determina no sólo contando cromosomas X, pero si calculando la relación de cromosomas X con el número de conjuntos de autosomas (conocido Como la X:A) (Sewart y Merriam, 1980; Baker y Belote, 1982, 1983; Baker *et al.*, 1988; Baker, 1989; Salz, 2007).

Drosophila es un organismo que se caracteriza por tener cuatro pares de cromosomas (fig. 4), tres de los cuales son autosómicos y el cuarto, un par sexual que está relacionado con el proceso de determinación del sexo, por lo tanto cuando tenemos cromosomas XX se refiere a una hembra y cuando son XY se refiere a un macho, sin embargo el sexo primario que determina la señal es el número de los cromosomas X con respecto al número de autosomas (Sánchez y Nöthiger, 1983; Moya y Ayala, 1989; Markow, 1997; Janzer *et al.*, 2001; Louis *et al.*, 2003; Fry y Nuzhdin, 2003; Shirangi *et al.*, 2006).

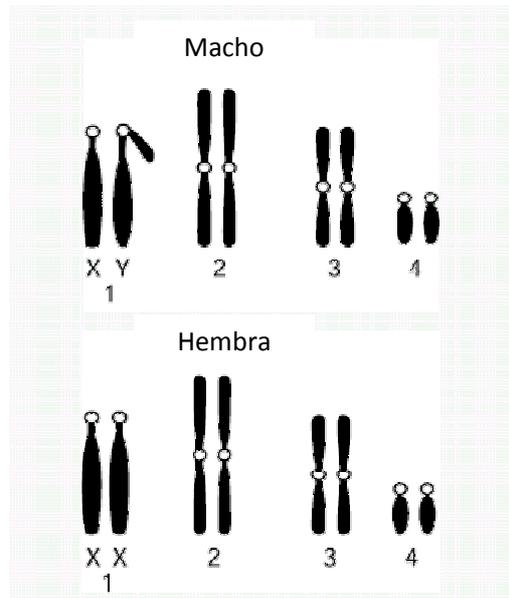


Fig 4. Cromosomas de la mosca de la Fruta, *Drosophila* (Patterson, 1943).

La determinación del sexo así como la reproducción en *Drosophila* requiere del desarrollo coordinado de las células del soma y de las células germinales (McKeown *et al.*, 1986; Cline y Meyer, 1996; García *et al.*, 2007).

Los estudios moleculares han avanzado en la comprensión de la determinación del sexo, describiendo un mapa que muestra las cascadas de los distintos patrones que se siguen para que los genes en conjunto definan el sexo del organismo.

La determinación sexual a nivel somático es relativamente fácil de entender (Andrews y Oliver, 2001). Por ejemplo; a partir de la determinación dada en la fecundación, en una hembra a lo largo de su desarrollo puede existir la pérdida de un cromosoma o pérdida de su función dando lugar a un tejido de macho.

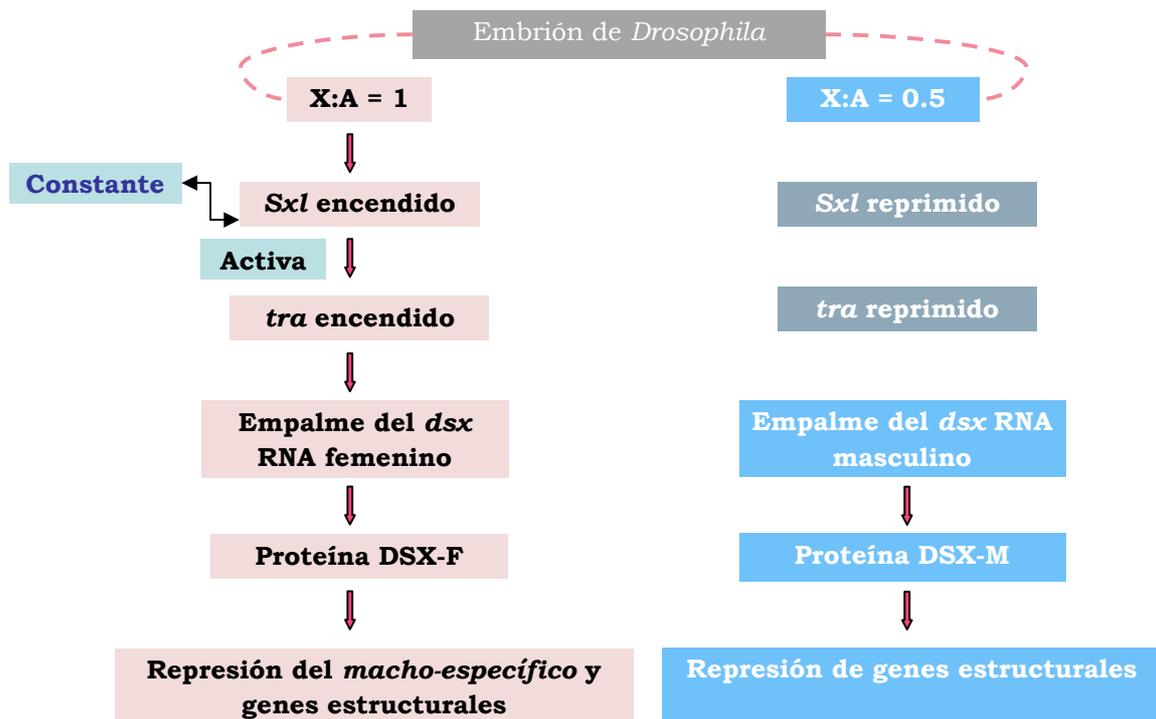


Fig. 6. Cascada de genes para la determinación del sexo en *Drosophila melanogaster* (Deshpande, *et. al.*, 1996; Louis, *et. al.*, 2003).

Por lo tanto los eventos de encendido y apagado de los genes, van a determinar la ruta para el desarrollo de *Drosophila*, sin embargo existen eventos que van a alterar la ruta de estos genes, estas alteraciones se dan de manera natural o por causas de agentes externos, provocando una alteración en la población de estas especies.

Estos eventos pueden ocurrir cuando células germinales femeninas (2X) cariotípicamente, son trasplantadas a una gónada masculina se desarrollan pobremente, pero son capaces de formar esperma en una baja frecuencia, esto indica que en un ambiente masculino se pueden transformar las células germinales femeninas (huevo) a masculinas (espermatozoides) (Andrews y Oliver 2001).

Caso contrario ocurre cuando se pone una célula masculina en una gónada femenina, son más resistentes a la transformación, las células masculinas son incapaces de transformarse a células femeninas por la ausencia de un segundo cromosoma.

Es claro que el desequilibrio es esencial para la señalización de la identidad sexual que no está dada si no hasta después de la fertilización en donde los productos codificados por los genes localizados en el cromosoma X igualados en ambos sexos marcan el desarrollo de los fenotipos. **A esto se le llama compensación de dosis** (Sánchez y Nöthiger, 1983; Louis *et al.*, 2003).

La compensación de dosis es llevada a cabo por la hipertranscripción de señales del cromosoma X, en organismos machos (Baker *et al.*, 1987; Deshpande *et al.*, 1996; Louis *et al.*, 2003).

Muchas son las señales que intervienen en esta determinación así como también son diversos los genes y sus proteínas, que actúan para la diferenciación de los sexos (Sánchez y Nöthiger, 1983). Los genes de células germinales actúan río abajo en señales autónomas de 2X. Existe una gran cantidad de eventos a nivel molecular que regulan el funcionamiento de esta determinación, donde los genes transcriben dependiendo de la señal que otro mande.

Por ejemplo, el locus *ovo* ocupa una posición río arriba, en la jerarquía de la línea germinal de determinación sexual, el cual actúa para regular al gen *ovarium tumor (otu)* y regular la viabilidad de las células germinales 2X. También se sugiere que *ovo* regula a *sex-lethal (sxl)* por medio de la vía de *otu* (Andrews y Oliver 2001).

Otro gen importante que interviene en esta cascada es el *sex-lethal*, que se localiza en células somáticas de *D. melanogaster*; el vínculo de este gen en la cascada es una intervención directa en la determinación de ambos sexos y de la *compensación de dosis* (Deshpande *et al.*, 1996; Louis *et al.*, 2003).

El gen *sex-lethal* (*Sxl*), es el gen regulador principal, responsable tanto de la morfología, así como del comportamiento de los dos sexos. *Sxl* se transcribe en genes de embriones femeninos (Deshpande *et al.*, 1996; Vied y Horabin, 2001; Louis *et al.*, 2003). Por lo tanto si durante el desarrollo, existe una mutación en este gen, se podrían observar alteraciones morfológicas en los individuos así como observar fluctuaciones distintas en la proporción sexual de los organismos.

La instrucción para el establecimiento de la identidad sexual y de la compensación de dosis, es implementada principalmente, por la ausencia y presencia del *Sxl*, (Louis *et al.*, 2003). *Sxl* es producido abundantemente por las hembras e indetectable en los machos; la activación del proceso de *Sxl* por la señalización de la proporción X/A se da por células autónomas, remarcando que Y no tiene función alguna en la activación de *Sxl* (Fig. 6) (Deshpande *et al.*, 1996; Chandler *et al.*, 1997; Louis *et al.*, 2003).

Son muchos los genes que transcriben para definir el desarrollo de una hembra o de un macho, todo va a depender de la manera en la que estos se estén expresando; entre ellos los más destacados son *sxl*, *dsx*, *tra*, *tra2*, los cuales modulan la expresión de otros genes para definir hacia que sexo inclinarse (Chandler *et al.*, 1997; Louis *et al.*, 2003; Tarone *et al.*, 2005).

Se sabe que la alteración por cuestiones externas, altera la condición de equilibrio entre los géneros en las poblaciones de diferentes especies, sin afectar, directamente al número de individuos por población y aunque este tipo de eventos en poblaciones con un gran número de individuos es poco visible, la variación sexual existe, y con la aparición de organismos que presentan características de ambos sexos (ginandromorfos) se puede evaluar el desequilibrio y dicha variación provocada por agentes externos, ambientales que intervienen en esta fluctuación.

1.5.1 Ginandromorfos

Aunque relativamente raro, la pérdida de cromosomas individuales puede ocurrir en células mitóticas, de forma espontánea. Cuando un cromosoma X se pierde durante el desarrollo de una hembra de *Drosophila* una parte del cuerpo puede tener una proporción de células XO, mientras el resto tiene una proporción de células XX por lo tanto el organismo resultante es un mosaico (Gelbart, 1973; Szabad y Nöthiger, 1992).

Los ginandromorfos son mosaicos sexuales, presentes en los organismos, los cuales presentan características femeninas y masculinas. En algunos casos los aparatos genitales, así como las gónadas de ambos sexos pueden estar presentes en el mismo organismo. De manera natural la frecuencia de ginandromorfos en las moscas es mínima (1:2000 aproximadamente) (Tsuchiyama, *et al.*, 1978). Sin embargo muchos de estos ginandromorfos tienen pocas secciones invertidas. El ginandromorfo bilateral es aún más raro (Szabad y Nöthiger, 1992; Olmtead y Le Blanc, 2007).

Los ginandromorfos bilaterales se han explicado como una irregularidad, que implica pérdida de cromosomas o de su función, en la primera división mitótica (Olmtead y Le Blanc 2007). Estos organismos exhiben características de ambos sexos, este tipo de eventos se presenta en diversos grupos de animales principalmente los invertebrados, algunos peces y reptiles.

Los ginandromorfos podrían comprometer a la fecundidad de los mismos, sin embargo su incidencia es baja por lo que no afecta drásticamente a las poblaciones. (Olmtead y Le Blanc, 2007).

Existen también organismos intersexos los cuales se van a diferenciar de un organismo ginandromorfo por el origen y el establecimiento de cromosomas. El ginandromorfo proviene de una irregularidad mitótica, mientras que un organismo intersexo está formado por una combinación de gametos sexuales que da por resultado a un índice de entre 0,5 y 1,0 (Olmtead y Le Blanc, 2007).

El ginandromorfo se presenta en el mismo organismo, por la división de las células con un número variable de cromosomas. En organismos intersexo el número de cromosomas es constante en todas las células; además la aparición de estos organismos es sistémica mientras que un organismo ginandromorfo proviene de una hembra (Olmtead y Le Blanc, 2007; Bryant y Zornetzer, 1973).

1.6 *N*-nitrosodimetilamina

La exposición de agentes altamente tóxicos produce daño en las poblaciones provocando efectos mutagénicos, teratogénicos o carcinogénicos (Sittig, 1985).

La *N*-Nitrosodimetilamina, o NDMA, es uno de las más simples dialquil-nitrosaminas, su fórmula molecular de $C_2H_6N_2O$ (Fig. 11), con un peso molecular de 74.08 g/mol (HEEP, 1980; ATSDR, 1989). La NDMA pertenece a una clase de productos químicos conocidos como compuestos *N*-nitrosados, que se caracterizan por tener un grupo funcional (- N - N = O) de la familia de nitrosaminas, y que además en su amina posee un R_2 , donde R es H o un grupo alquil.

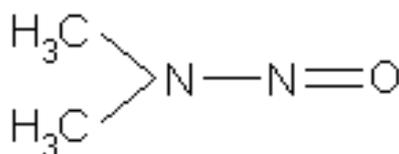


Fig. 11 Estructura química de la NDMA.

La NDMA es un compuesto volátil, amarillo, líquido aceitoso, de baja viscosidad. Es susceptible a la luz solar, se degrada debido a la absorción de la luz UV (Sax y Lewis, 1987). Tiene un punto de fusión de 50° C, un punto de ebullición entre 151 – 154° C. Es soluble en el agua, el alcohol, éter y otros disolventes orgánicos y lípidos. La NDMA es un combustible que al calentarse emite humos tóxicos de óxidos de nitrógeno. Es insoluble con oxidantes fuertes y bases fuertes (HSDB 2000).

La exposición a la NDMA puede presentarse en muchos lugares, entre los que se incluyen industrias como curtidoras, plantas de fabricación de pesticidas, de caucho y de llantas, industrias que producen o usan alquilaminas, industrias para el procesamiento de pescado, fundidoras y plantas de fabricación de tintes.

La NDMA se obtiene de la nitración de la dimetilamina a través de la reacción con nitratos o con el óxido nítrico (Lee *et al.*, 2006). También se forma por la oxidación de la 1,1- dimetilhidrazina (UDMH), que es un combustible líquido de cohetes (Lee *et al.*, 2006), en donde se presupone que la NDMA se presenta hasta en un 0.1% como impureza (IARC, 1978). De manera natural se encuentra en el aire, el agua y el suelo, como consecuencia de reacciones con otras sustancias químicas llamadas alquilaminas².

Otra ruta de formación de la NDMA se presenta durante la desinfección del agua en plantas de tratamiento con cloraminas, este mecanismo involucra la formación de UDMH por la reacción de dimetilamina con las monocloraminas y subsecuentemente hay una oxidación a NDMA. (Lee *et al.*, 2006), también se encuentra en el agua potable, agua de riego, cañerías y colectores de aguas pluviales (Choi y Valentine, 2002; Mitch y Sedlak, 2002).

² Las alquilaminas son compuestos que se generan de manera natural o pueden ser manufacturados y se encuentran distribuidos ampliamente en el medio ambiente.

Otras fuentes de exposición a la NDMA son el humo del tabaco, el tabaco para mascar, alimentos (carne cruda [especialmente la tocinería], cerveza, pescado, quesos), artículos de baño y productos cosméticos (por ejemplo, shampoo y otros limpiadores), algunos productos para el hogar como detergentes y pesticidas de hogar y jardín (Najm, *et al.*, 2000). Igualmente, la NDMA puede formarse en el aparato gastrointestinal durante la digestión de alimentos que contienen alquilaminas³.

Se ha demostrado que las nitrosaminas son potentes carcinógenos, dependiendo de la vía de activación que tiene el metabolismo de cada organismo. La Agencia de Protección Ambiental (EPA), clasificó a la N-Nitrosodimetilamina, como un probable carcinógeno humano (Beranek, 1990; Habib, *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2006). Además la exposición crónica puede causar ictericia y la inflamación del hígado, así como presentar una cuenta de plaquetas baja.

La contaminación con la NDMA en el agua potable es de gran importancia puesto que se ha encontrado que este compuesto tiene un nivel bajo de activación (diez partes por trillón, ppt). Se encontró NDMA en muestras de aguas subterráneas en cantidades de 10 partes de NDMA por billón de partes de agua (Lee *et al.*, 2006).

Los estudios de mutagénesis con la NDMA demuestran que es un alquilante, promutágeno, y un potente carcinógeno (EMS, 1976; Sittig, 1985; Farmer, *et al.*, 2005). Induce tumores en diferentes partes del organismo según sea la ruta de administración, por ejemplo, la administración de 25 y 50 ppm de la NDMA en dietas de conejo durante tres meses, ocasiona carcinomas hepatocelulares; en ratas sometidas a inhalaciones repetidas se inducen tumores en las cavidades nasales y en el riñón; cuando se administra por vía oral en diferentes cepas de ratas provoca sarcomas, carcinomas y adenomas en pulmón (EMS, 1976).

³ Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). 1989. Reseña Toxicológica de la n-Nitrosodimetilamina (en inglés). Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública.

El metabolismo de la NDMA en los animales así como sus efectos toxicológicos han sido ampliamente estudiados (Gates *et al.*, 2004; Bianchini *et al.*, 2003; Osborne y Phillips, 2000). La exposición a la N-Nitrosodimetilamina ha producido un aumento en la tasa de cáncer del hígado y del pulmón en animales, provoca daño a nivel reproductor, abortos así como también pérdida del producto durante el desarrollo del organismo Magee y Barnes, 1962; Schmitz y Murphy, 1966; Hard y Butler, 1970a, b; McLean y Magee, 1970; IARC, 1978; Inui *et al.*, 1979; Bolognesi *et al.*, 1988; ATSDR, 1989).

2 JUSTIFICACIÓN

La exposición de los organismos de una población a un xenobiótico, como la *N*-nitrosodimetilamina, es responsable de una serie de alteraciones en las comunidades de diferentes especies, vertebrados invertebrados, provocando mutaciones, malformaciones, muerte, así como también se han observado cambios en las fluctuaciones en la proporción de sexos de estas poblaciones, es decir parece existir una feminización o masculinización de los individuos por causa de estos compuestos.

Esto nos lleva a plantear que debido a estos compuestos, la alteración en la proporción de sexos puede afectar la viabilidad reproductora de los organismos, así como, el número de progenie de los mismos.

Se plantea la utilización de una especie de *Drosophila mulleri*, que por sus características naturales (gónadas de machos coloreadas) se puede utilizar para analizar otros efectos morfológicos a nivel de diferenciación sexual para explicar si la variación del sexo se asoció con cambios en las estructuras reproductora y si esto repercute en la fertilidad de los organismos.

3 HIPÓTESIS

Si los organismos de *Drosophila* expuestos a diferentes concentraciones de la *N*-nitrosodimetilamina (NDMA) durante el desarrollo presentan pérdida de cromosoma ó de función, provocarán fluctuaciones en la proporción de sexos, así como una disminución en el numero de la progenie; la variación en la proporción de los sexos se reflejará en la aparición de organismos ginandromorfos y/o de machos fenotípicos.

4 OBJETIVO GENERAL

- Determinar si la variación en la proporción de sexos de organismos expuestos a la NDMA está asociada con la alteración en la diferenciación y funcionamiento de las estructuras reproductoras en *Drosophila*.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Comparar la variación en la proporción de los sexos de *D. melanogaster* y de *D. mulleri* expuestas a NDMA durante el desarrollo.
- Analizar la formación de ginandromorfos como una fuente de alteración de la proporción de los sexos de moscas expuestas a la NDMA.

5 MATERIALES Y MÉTODO

En este trabajo se utilizó a *Drosophila* como modelo biológico, se usaron cepas de *Drosophila melanogaster* y *Drosophila mulleri*, para medir el Índice de sobrevivencia (IS), la proporción de sexos, índice de fertilidad (IF), así como, el promedio de hijos por cada macho tratado con *N*-Nitrosodimetilamina (NDMA), *D. melanogaster* se ocupó como modelo de referencia, mientras que el segundo, se utilizó para medir, además de las pruebas ya mencionadas, el daño morfológico en las estructuras reproductoras, debido a sus características morfológicas específicas de la especie.

El trabajo consistió en tratar organismos en desarrollo con un mutágeno de referencia (NDMA), para obtener el IS, la proporción de sexos, IF y el promedio de la progenie de los organismos machos tratados los cuales se cruzan con hembras no tratadas.

Mantenimiento de cultivos.

El mantenimiento de las cepas requiere del control de las condiciones del laboratorio adecuadas (humedad 60%, temperatura 25° C, así como las fases de luz y oscuridad).

Con respecto al medio de cultivo de las cepas, es diferente, debido a que los organismos provienen de puntos geográficos distintos y por lo tanto se alimentan de manera diferente.

Para *Drosophila melanogaster*:

- Medio *Estándar*:

Este medio está compuesto por una mezcla de harina, azúcar, agar, levadura y agua. Éste es el medio que se utiliza en el laboratorio normalmente para las cepas (Fig. 7).

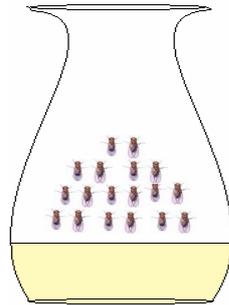


Fig. 7 .Medio Estándar

Para *Drosophila mulleri*:

- Medio *Banana–Opuntia*:

Este es un medio a base de una mezcla agar, levadura y agua, a la cual se le agrega otra mezcla preparada que contiene plátano, malta, miel de maíz y extracto de opuntia (Fig. 8).

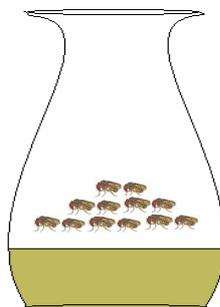


Fig. 8. Medio Banana-Opuntia

A los medios de cultivo se les agregó una cantidad proporcional de ácido propiónico y nipagín, los cuales se usaron para evitar contaminación de bacterias y hongos, respectivamente, en viales y frascos.

En cuanto a la cristalería utilizada para el medio (viales y frascos), fueron lavados y esterilizados previamente a la realización del medio, los frascos que contienen medio estándar se guardaron en el horno y los frascos con el medio Banana-Opuntia, se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Cada frasco fue etiquetado con la fecha y el nombre de la cepa.

Cruza Experimental

Para obtener la cruce primero se aislaron organismos (Fig. 9) en frascos con medio de cultivo estándar para *D. melanogaster* y medio Banana-Opuntia (BO) para *D. mulleri* y se le agregó levadura fresca.

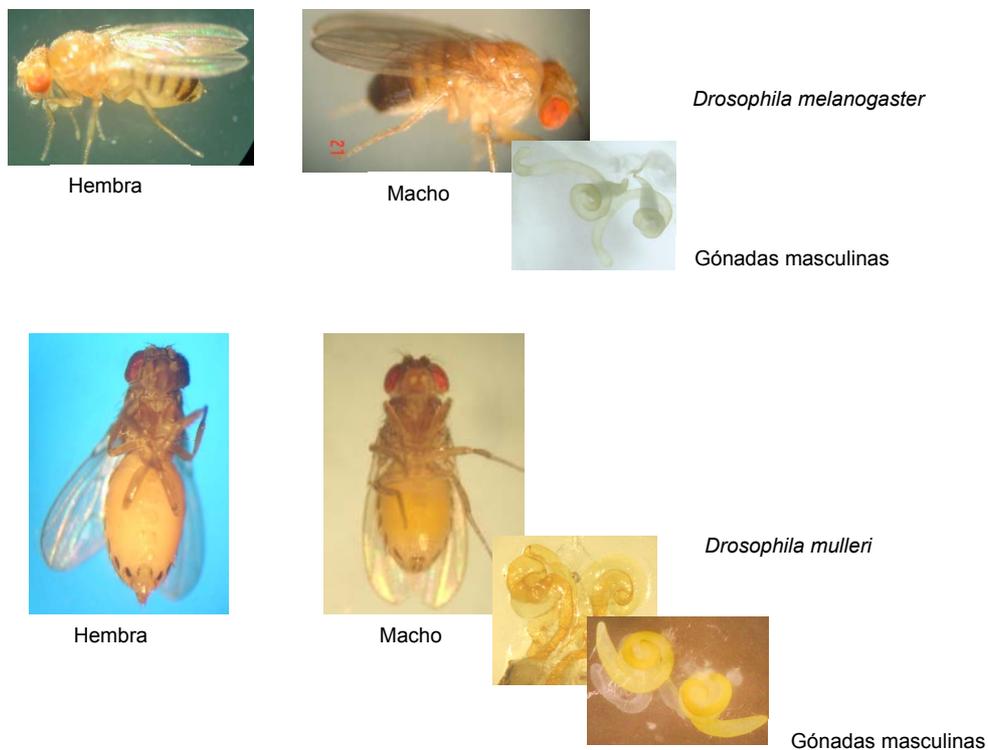
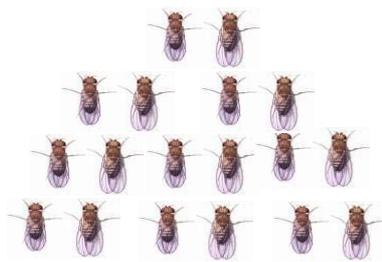


Fig. 9 Modelos biológicos, *D. melanogaster* y *D. mulleri*.

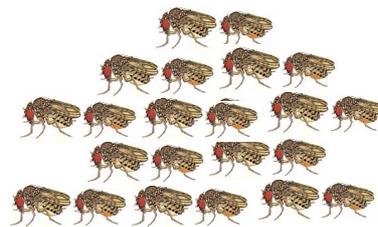
Para la cruce experimental, se seleccionaron machos sexualmente maduros (alcanzan su maduración hasta las 48 horas después de haber emergido), también se requirió de la selección de hembras vírgenes, las cuales se recolectaron durante las primeras ocho horas, que es el tiempo que tardan en madurar sexualmente y así se aseguró que las hembras no habían sido fecundadas.

El proceso inició con el aislamiento de las hembras cuando éstas emergieron de las pupas. Se eliminaron los organismos obtenidos por la noche, y se esperó alrededor de seis horas para la selección de los organismos.

Se aislaron 1200 hembras vírgenes de cada una de las cepas, después se colocaron 100 hembras por frasco (12 frascos por cepa), y posteriormente se agregaron 50 machos en cada frasco.

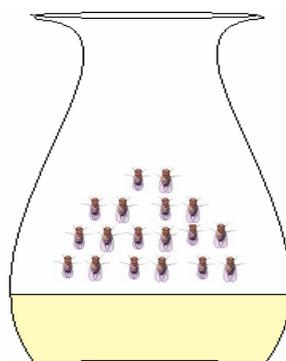


Drosophila melanogaster

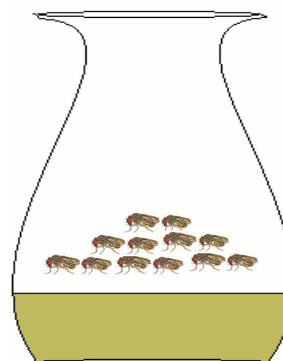


Drosophila mulleri

La cruce se dejó en los frascos con los medios respectivos para ambas cepas, durante 48h, para que la cruce madurara.



D. melanogaster



D. mulleri

Obtención de huevos.

Una vez que maduraron estos organismos progenitores (para la obtención de los organismos que fueron tratados), se transfirieron a frascos con medio fresco para obtener huevos por un periodo de 8 horas para *D. melanogaster* y de 12 horas para *D. mulleri*. Esto se hizo con la finalidad de obtener organismos con una edad similar (Fig. 10).

Después de este tiempo se sacaron los organismos adultos y se espero a que los huevos maduraran por 72 horas para *D. melanogaster* (Clark, 1982) y 96 horas para *D. mulleri* (Clark 1982, modificado); en condiciones de laboratorio; para obtener larvas en un estado equivalente a dos tercios del desarrollo larvario, 72 ± 4 h para *D. melanogaster* y 96 ± 6 h para *D. mulleri*. Una vez que las larvas llegaron a este estadio larvario se sometieron al tratamiento con NDMA.

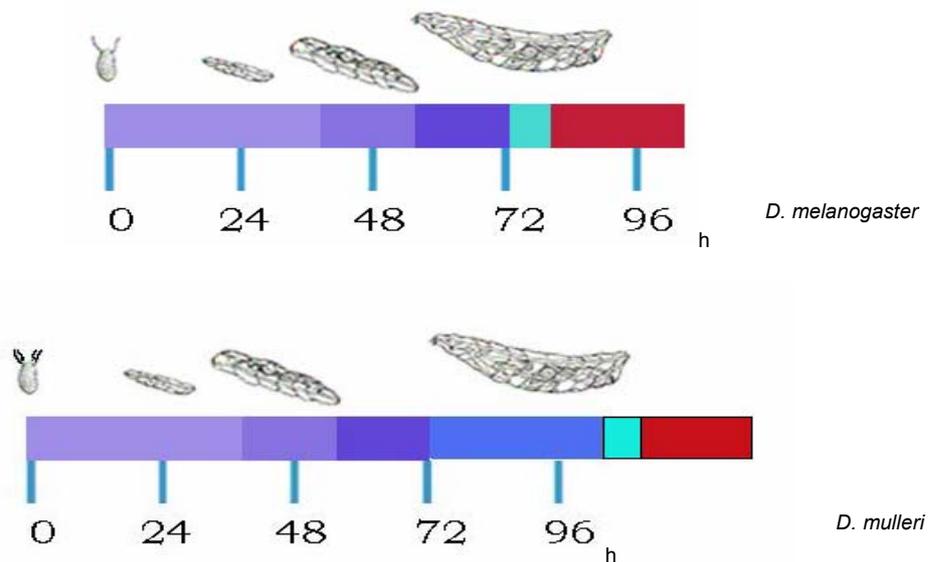
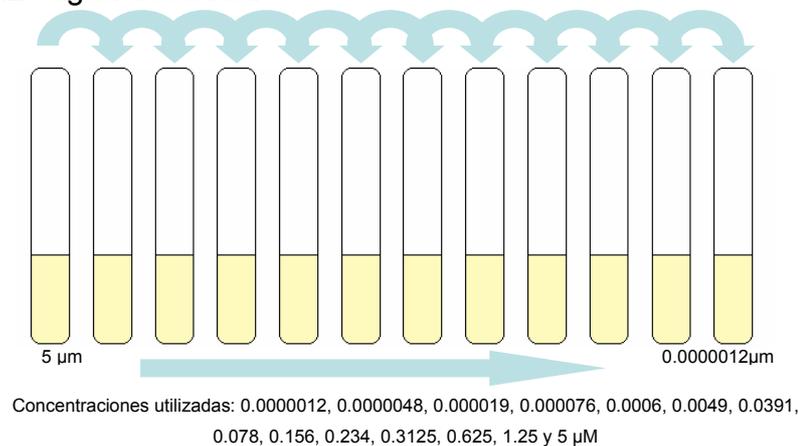


Fig. 10 Estadios larvarios de *D. melanogaster* y *D. mulleri*

Compuesto y concentraciones

Se ha probado que la NDMA provoca daño en células germinales y somáticas (ver anexo I), que desarrolla metabolitos generados por las nitroso amidas a través del metabolismo del organismo (Ramos, 2006).

Se utilizó a la N-Nitrosodimetilamina como inductor de daño reprotóxico. Las diferentes concentraciones se obtuvieron mediante diluciones sucesivas a partir de una solución stock 5 μM , hasta 0.0000012 μM , como diluyente y como testigo negativo se utilizó agua destilada.



Obtención de Larvas.

Para *D. mulleri*: Después de las 96 horas se obtuvo la progenie con una edad similar en cada frasco. Para obtener las larvas se les agregó a cada frasco una solución de sacarosa al 30% (modificado de Nöthinger, 1970), para obtenerlas por flotación, se usa más sacarosa en comparación, con la solución empleada para obtener las larvas de la cepa *D. melanogaster*, ya que el medio es más denso. Una vez obtenidas todas las larvas fueron repartidas en los viales con el compuesto.

Para cada concentración se prepararon tres tubos homeopáticos de vidrio de 2 cm de diámetro, cada uno conteniendo un gramo de medio instantáneo Carolina (Carolina Biological Supplí Compaly, Burlington, NC) y 3.5ml de la solución a probar o de agua destilada.

Con una espátula, se agregaron aproximadamente 100 larvas por tubo y se le colocó un tapón de hule espuma. Los organismos permanecen en los tubos hasta que los adultos emergen (Fig. 12). Se recuperaron los organismos de cada concentración y se revisó por separado cada vial.

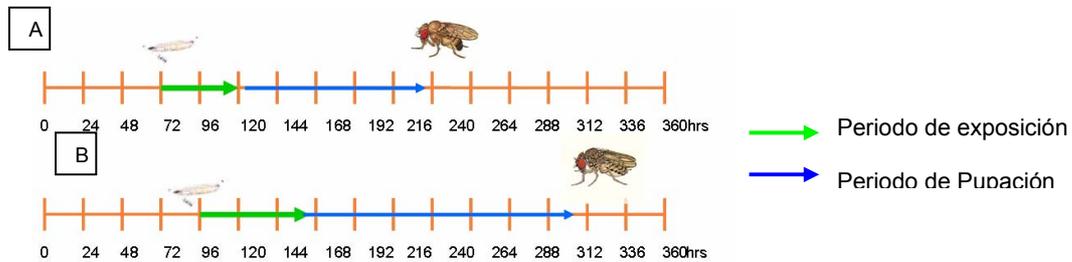


Fig. 12. Tiempo de exposición de la NDMA con respecto al ciclo de vida de las cepas; A) *D. melanogaster*; B) *D. mulleri*.

Los adultos recuperados en cada tubo fueron anestesiados, separados por sexo y fueron cuantificados para obtener el índice de sobrevivencia (IS), así como la proporción de sexos. Estas pruebas se utilizan para medir la toxicidad así como la susceptibilidad del modelo con respecto a la exposición del compuesto.

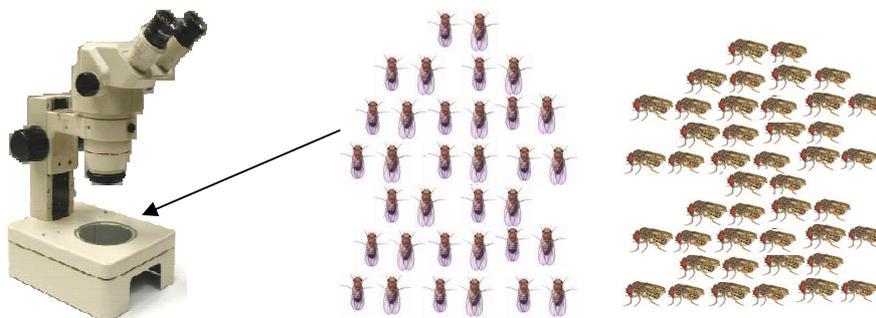


Fig. 13 Cuantificación de los organismos recuperados después de la exposición.

Se revisó la morfología de cada mosca para identificar la presencia de malformaciones en cabeza, tórax, abdomen y placa. Para *D. mulleri* además de alteraciones generales se revisaron las gónadas (las cuales son evidentes a través de la cutícula del organismo y se registra si presentan 0, 1, 2 gónadas).

Para evaluar la fertilidad y el promedio de hijos por macho tratado, se seleccionaron diez machos al azar por experimento, los cuales fueron colocados de manera individual en tubos homeopáticos con el medio de cultivo y dos hembras vírgenes no tratadas de la línea correspondiente; para cada concentración se siembran 10 tubos, El resto de los organismos fueron conservados en tubos de polipropileno utilizando alcohol al 70% como fijador.

Los machos tratados y las hembras no tratadas se dejaron durante tres días para *D. melanogaster* y cinco días para *D. mulleri* (Fig. 14), después de lo cual se retiraron los progenitores y los tubos se conservaron para cuantificar la progenie producida por los machos por concentración. Los machos progenitores fueron analizados para determinar si presentaban 0, 1 ó 2 gónadas.

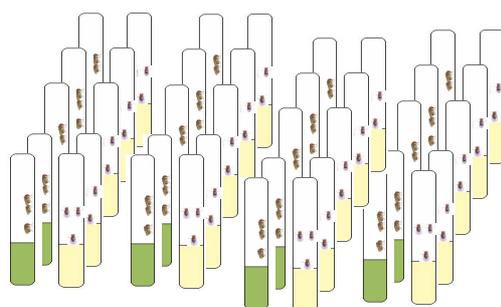


Fig 14. Obtención de la progenie de los machos tratados a diferentes concentraciones de NDMA, con hembras vírgenes, de cada cepa respectivamente.

Una vez obtenida la progenie los organismos se fijaron en alcohol al 70% para su cuantificación. Para cada macho se registra el total de los organismos recobrados por tubo y se clasifican por sexo (Fig. 15).

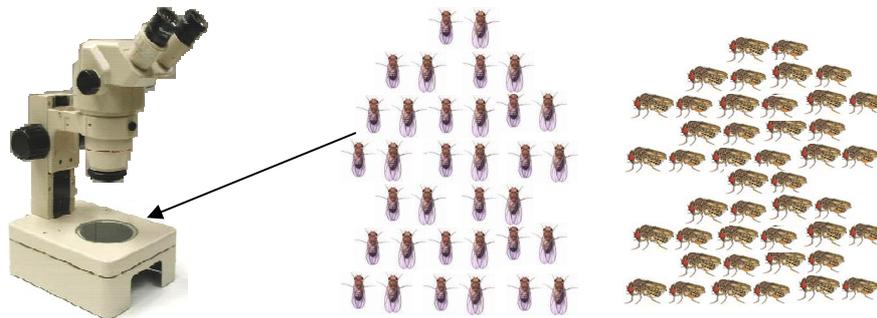


Fig. 15 Cuantificación de la progenie por macho tratado, para cada cepa

Análisis de resultados

Para el análisis de los Índices de Supervivencia (IS), al igual que para la proporción de sexos, se hizo una comparación dentro de cada cepa, entre las concentraciones para cada cepa, así como también se compararon entre las cepas; en estos análisis utilizó la prueba estadística de ANOVA de dos vías con el programa de computadora *Graph pad prism Version 4*. Para el índice de fertilidad se aplicó *Z para proporciones* y para hacer una correlación de la fertilidad entre las cepas se realizó la prueba de *correlación de Spearman*. Para analizar los datos del promedio de hijos por macho se realizó también una ANOVA de dos vías con el programa de computadora *Graph pad prism Version 4*. Para comparar la frecuencia de ginandromorfos en las series experimentales y la testigo se utilizó la prueba de *Kastenbaum- Bowman (1966)*.

6 RESULTADOS

Para un mejor análisis de los resultados este trabajo se dividió en dos fases. En la primera parte se analizó la toxicidad y la susceptibilidad del modelo con respecto a la NDMA; y la segunda fase consistió en el análisis de la función reproductora de los machos tratados con este compuesto. En la segunda parte también se analizó la presencia y ausencia de gónadas en la cepa *D. mulleri*.

Los resultados obtenidos para medir el IS de los organismos recuperados de ambas cepas, después de haberlos expuesto a NDMA, se muestran en la Tabla 1.

El análisis muestra que existen diferencias significativas en el IS ($p < 0.05$), entre *D. melanogaster* y *D. mulleri* (Graf. 1).

El análisis por cepa, indica que para *D. melanogaster* no existe diferencia significativa entre las concentraciones ($p > 0.05$) con respecto a su testigo (Graf. 3); y para *D. mulleri* indicó que sí existe diferencia de las concentraciones con respecto de su testigo ($p < 0.001$), esto a partir de las concentraciones 0.000076, 0.0006, 0.0049, 0.0391, 0.078, 0.156, 0.234, 0.3125, 0.625, 1.25 y 5 μM (Graf. 4).

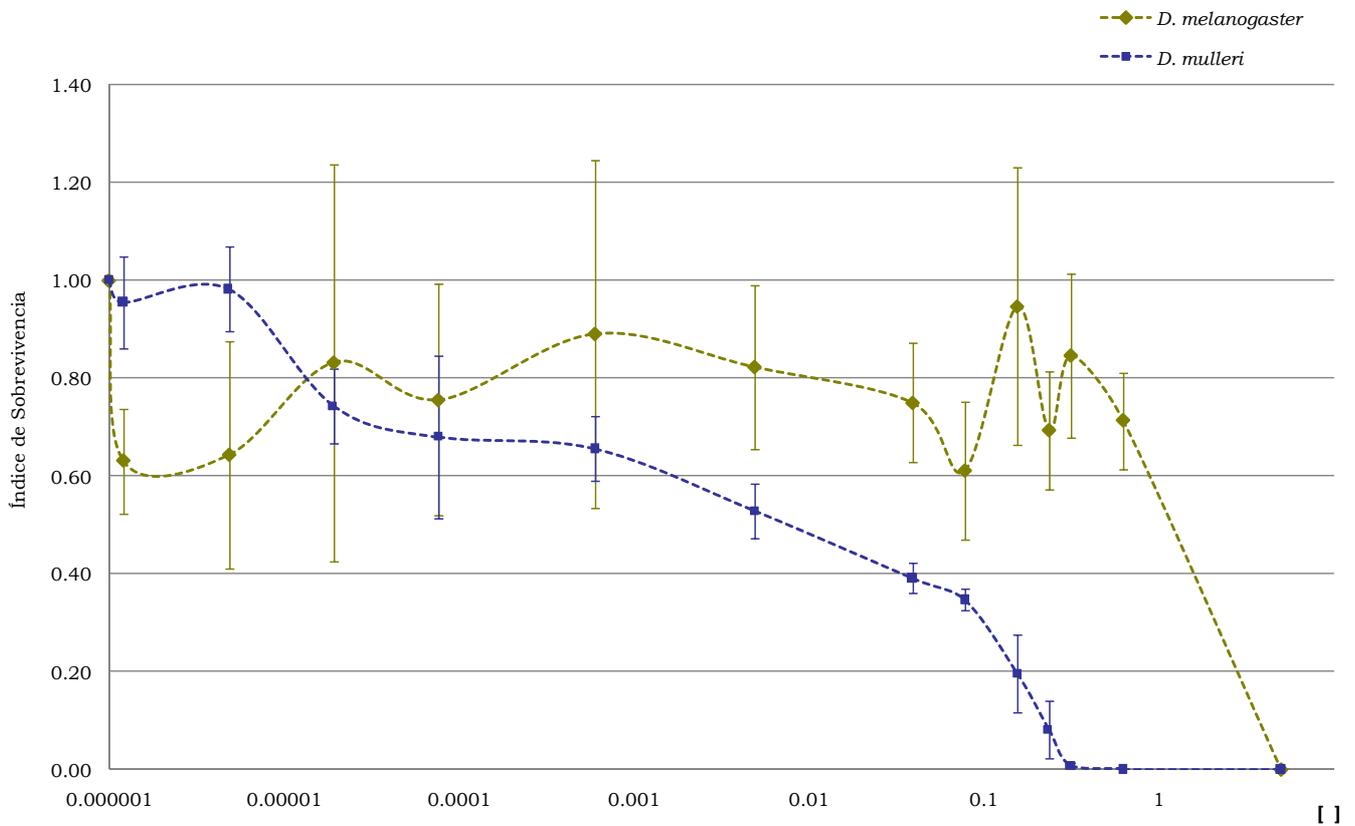
El compuesto tuvo un efecto letal para *D. melanogaster* a partir de la concentración 5 μM , mientras que para *D. mulleri* el efecto letal se presenta a partir de la concentración 0.234 μM , donde la pérdida de organismos fue de más del 90% con respecto del testigo.

Tabla 1. Índice de sobrevivencia de *D. mulleri* y *D. melanogaster*.

Concentración	<i>D. melanogaster</i> IS ± e. e.	<i>D. mulleri</i> IS ± e. e.	Diferencias entre cepas
0	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	
0.0000012	0.63 ± 0.11	0.96 ± 0.09	**
0.0000048	0.64 ± 0.23	0.98 ± 0.09	**
0.000019	0.83 ± 0.41	0.74 ± 0.08 *	**
0.000076	0.76 ± 0.24	0.68 ± 0.17 *	**
0.0006	0.89 ± 0.36	0.66 ± 0.07 *	**
0.0049	0.82 ± 0.17	0.53 ± 0.06 *	**
0.0391	0.75 ± 0.12	0.39 ± 0.03 *	**
0.078	0.61 ± 0.14	0.35 ± 0.02 *	**
0.156	0.95 ± 0.28	0.20 ± 0.08 *	**
0.234	0.69 ± 0.12	0.08 ± 0.06 *	**
0.3125	0.85 ± 0.17	0.01 ± 0.01 *	**
0.625	0.71 ± 0.10	0.00 ± 0.00	**
5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	

** , p< 0.05, hay diferencia significativa entre los valores del IS de las cepas

*, p< 0.05, hay diferencia significativa de la concentración con respecto a su testigo para *D. mulleri*



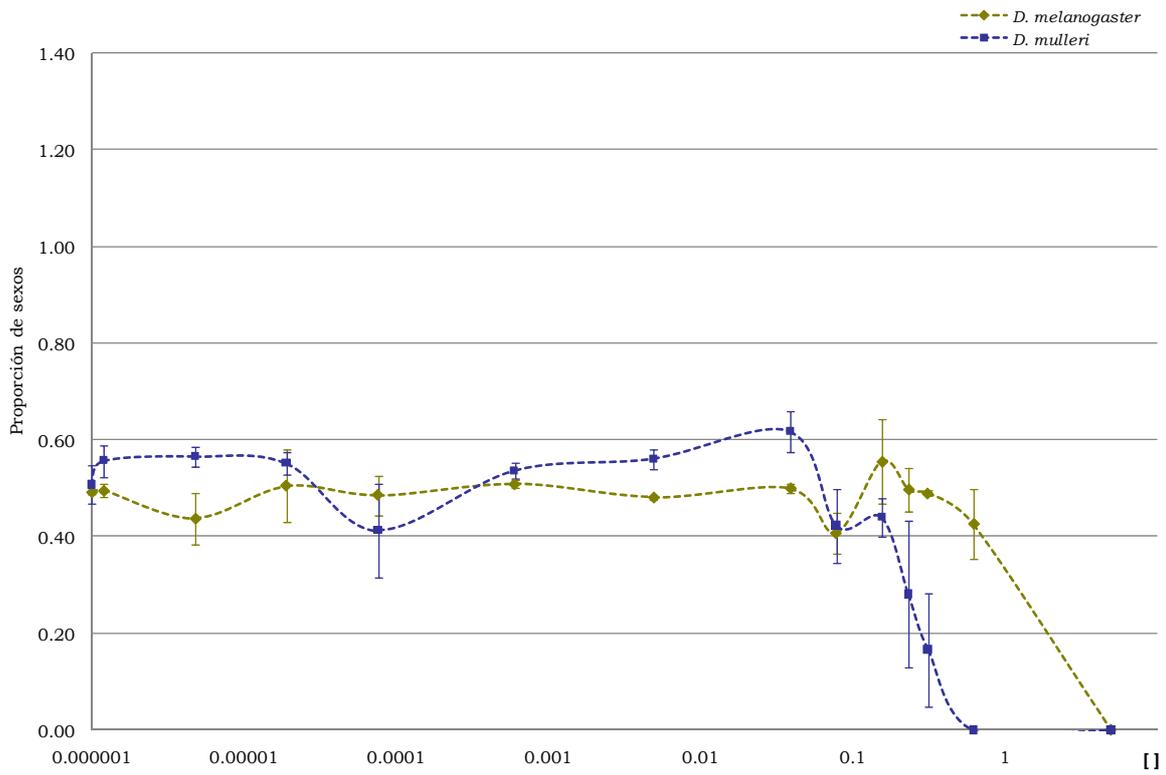
Graf. 1. Índice de Sobrevivencia de *D. mulleri* y *D. melanogaster*, tratados con NDMA

Se determinó la proporción de los sexos en *D. melanogaster* y en *D. mulleri* (Tabla 2), en donde se observó que no hay diferencias significativas entre las cepas ($p>0.05$), pero si se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de las cepas con respecto a su testigo, (Graf 2); los datos por cada cepa muestran que en *D. melanogaster* no existen diferencias en la proporción de los sexos por concentración ($p>0.05$) (Graf. 3); mientras que en *D. mulleri* la diferencia si es significativa entre sus concentraciones con respecto de su testigo ($p< 0.001$). (Graf. 4). Esto para las concentraciones de 0.0049, 0.0391, 0.078, 0.156, 0.234, y 0.3125 μM .

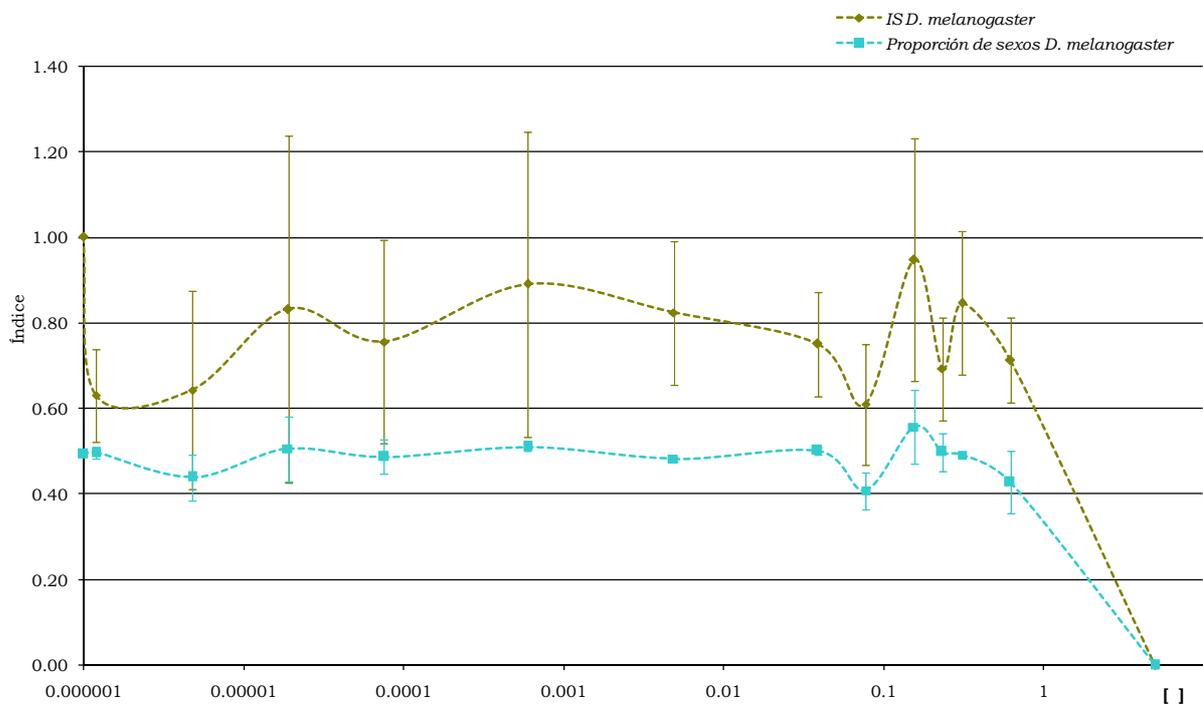
Tabla 2. Proporción sexual *D. mulleri* y *D. melanogaster*.

Concentración	<i>D. melanogaster</i> Prop. de sexos \pm e. e.	<i>D. mulleri</i> Prop. de sexos \pm e. e.	Diferencias entre []
0	0.49 \pm 0.00	0.51 \pm 0.04	
0.0000012	0.50 \pm 0.01	0.56 \pm 0.03	**
0.0000048	0.44 \pm 0.05	0.57 \pm 0.02	**
0.000019	0.51 \pm 0.08	0.55 \pm 0.02	
0.000076	0.49 \pm 0.04	0.41 \pm 0.10	
0.0006	0.51 \pm 0.01	0.54 \pm 0.02	
0.0049	0.48 \pm 0.00	0.56 \pm 0.02	**
0.0391	0.50 \pm 0.01	0.62 \pm 0.04	**
0.078	0.41 \pm 0.04	0.42 \pm 0.08	
0.156	0.56 \pm 0.09	0.44 \pm 0.04	**
0.234	0.50 \pm 0.04	0.28 \pm 0.15	**
0.3125	0.49 \pm 0.01	0.17 \pm 0.12	**
0.625	0.43 \pm 0.07	0.00 \pm 0.00	**
5	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	

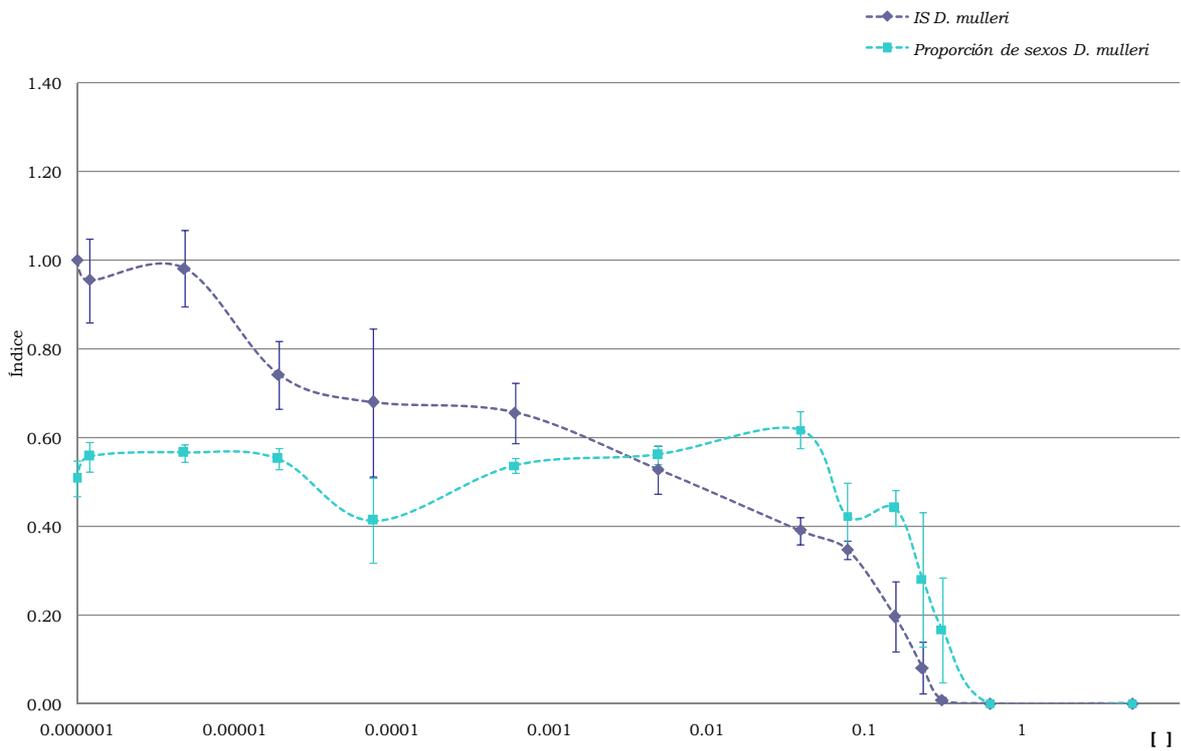
** , $p< 0.001$, hay diferencia significativa entre las concentraciones de la cepa *D. mulleri*.



Graf. 2. Proporción sexual *D. mulleri* y *D. melanogaster*.
 $p > 0.05$, No hay diferencia significativa entre los valores de la proporción de sexos entre las dos cepas.



Graf. 3. Índice de Supervivencia y proporción de sexos de *D. melanogaster*, tratados con NDMA.
 $p > 0.05$



Graf. 4 Índice de sobrevivencia y proporción de sexos de *D. mulleri* expuestas a NDMA $p < 0.001$

Mientras se realizaba el análisis para el índice de sobrevivencia, así como, para la proporción de sexos, se observaron, diferentes alteraciones morfológicas en las dos cepas, tanto machos como hembras, sin embargo estas alteraciones fueron más evidentes en *D. mulleri*, en donde se encontraron alteraciones a nivel de placa genital, en las diferentes concentraciones (Fig. 16).



Fig. 16. Alteraciones a Nivel de Placa Genital para *D. mulleri*

Para la segunda parte del trabajo se realizaron cruzas de los machos que fueron expuestos a la NDMA, con hembras vírgenes, de su misma cepa y se obtuvo la progenie, se analizó el índice de fertilidad por cada macho de cada concentración (Graf.5). Así como también se obtuvieron resultados acerca de cuantos hijos en promedio tuvo cada macho en esta segunda parte.

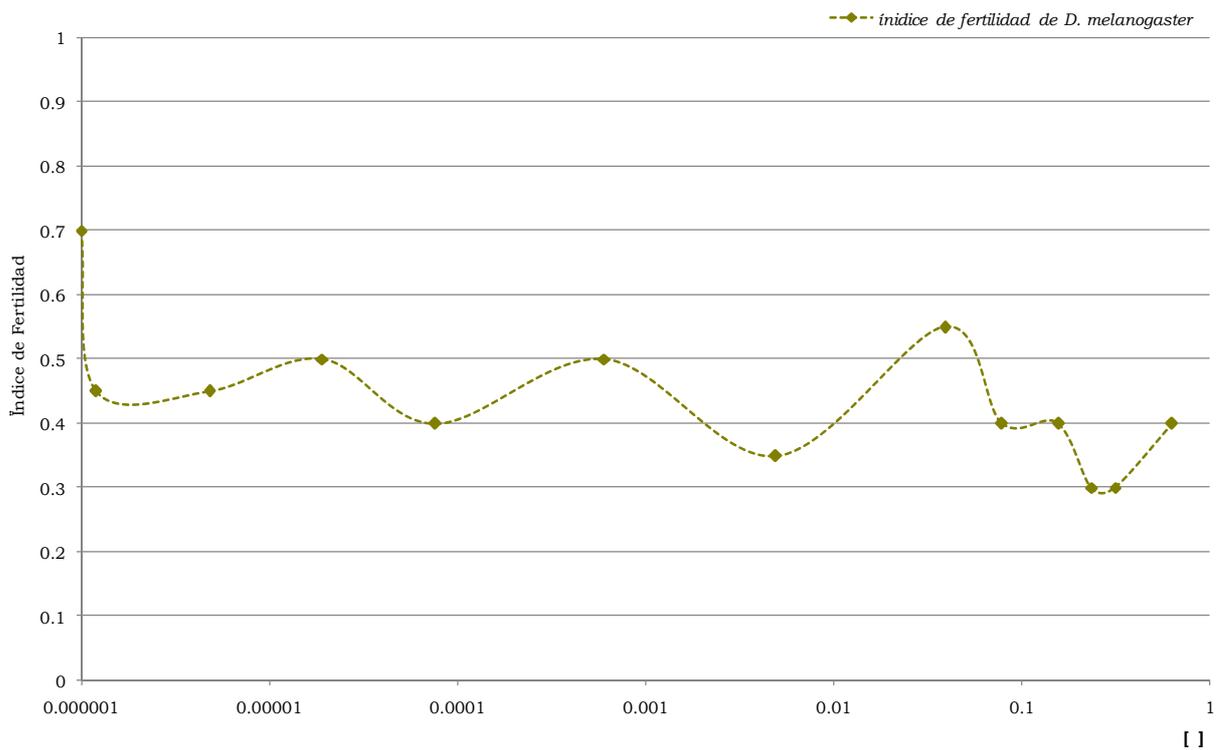
El índice de fertilidad se obtuvo con la relación de cuantos machos si tuvieron progenie entre los machos totales que fueron sembrados por concentración; para cada cepa (Tabla 3 y 4).

Para *D. melanogaster* se sembraron 20 machos por cada concentración (Tabla 3); para el análisis estadístico de este índice se realizó una Z para proporciones, la cual indica que sí hay diferencia significativa para todas las concentraciones con respecto a su testigo (Graf. 5).

Tabla 3. Índice de Fertilidad de machos *D. melanogaster*, tratados con NDMA.

Concentración	I. Fertilidad
0	0.7
0.0000012	* 0.45
0.0000048	* 0.45
0.000019	* 0.5
0.000076	* 0.4
0.0006	* 0.5
0.0049	* 0.35
0.0391	* 0.55
0.078	* 0.4
0.156	* 0.4
0.234	* 0.3
0.3125	* 0.3
0.625	* 0.4

*, $p < 0.05$



Graf. 5. Índice de Fertilidad de los machos *D. melanogaster* tratados con NDMA.
 $p < 0.05$

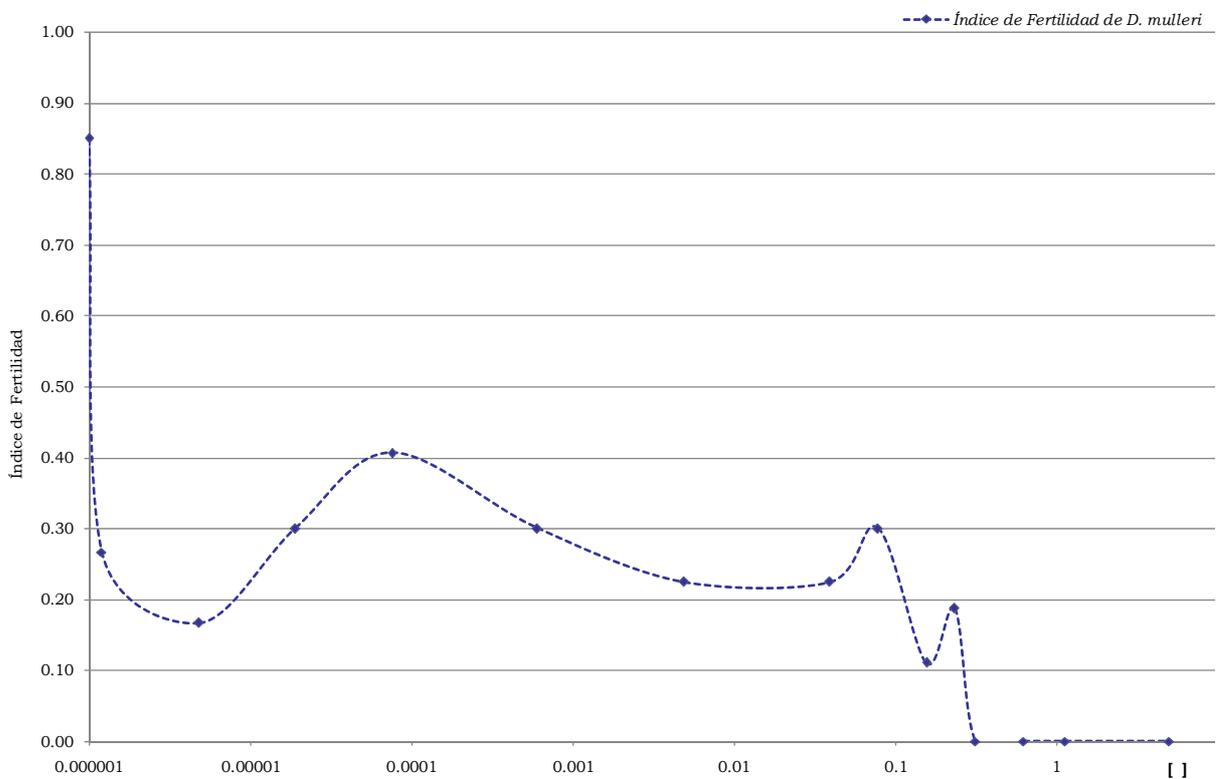
Para *D. mulleri*, se sembraron como máximo 40 machos (en el testigo), es importante establecer que no en todas las concentraciones se pudo sembrar este número de machos debido a la toxicidad del compuesto.

El análisis de estos resultados se realizó con la frecuencia de cuantos machos habían tenido hijos entre el total de machos sembrados en cada concentración, como se observa en la Tabla 4, la frecuencia en el índice de fertilidad se comporta siempre por debajo del testigo el cual, tiene un valor de 0.85, siendo 0.156 μM la concentración más baja con un valor de 0.11; para el análisis estadístico se realizó la prueba de Z para proporciones, dando una respuesta significativa para todas las concentraciones con respecto del testigo, con una $p < 0.001$.

Tabla 4. Índice de Fertilidad de machos *D. mulleri*, tratados con NDMA.

Concentración	I. Fertilidad
0	0.85
0.0000012	* 0.27
0.0000048	* 0.17
0.000019	* 0.30
0.000076	* 0.41
0.0006	* 0.30
0.0049	* 0.23
0.0391	* 0.23
0.078	* 0.30
0.156	* 0.11
0.234	* 0.19
0.3125	* 0.00
0.625	0.00
1.125	0.00
5	0.00

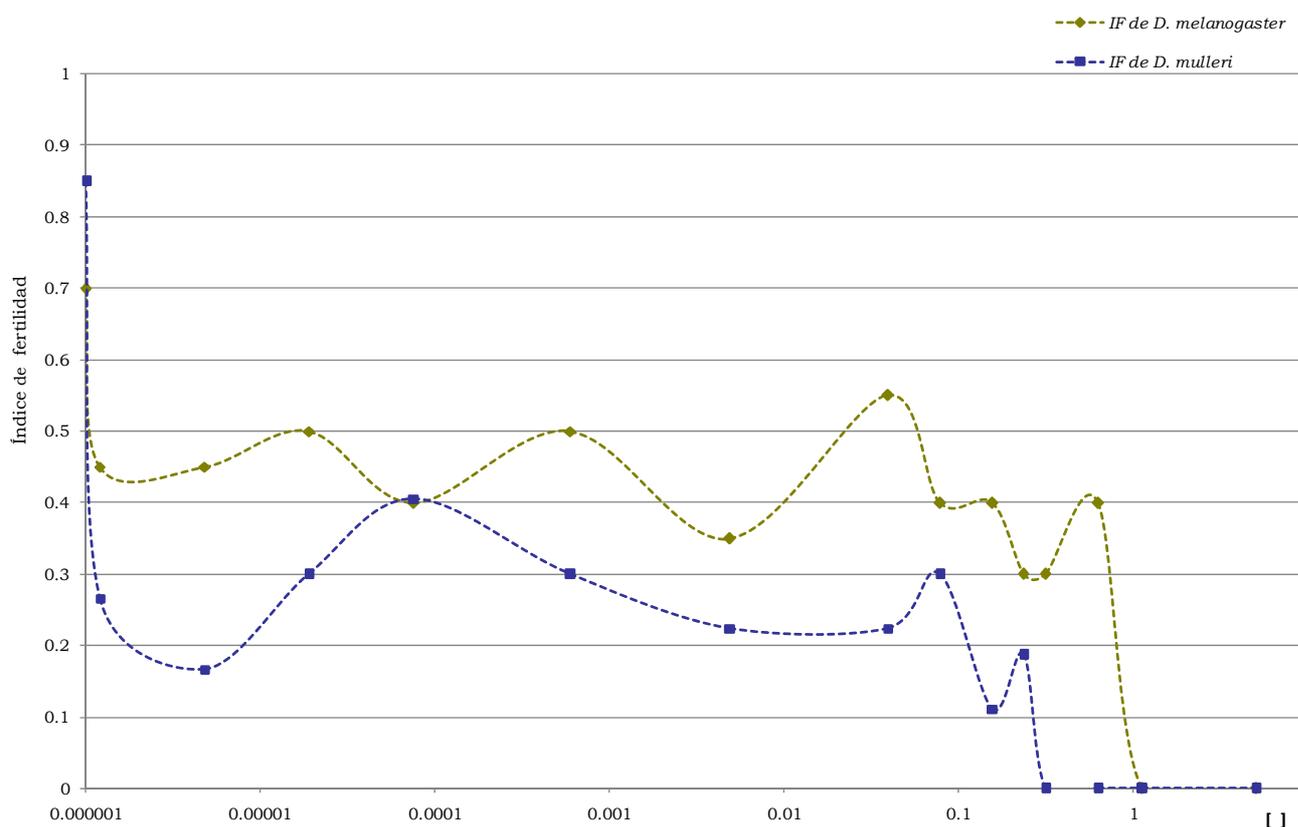
*, $p < 0.001$



Graf. 6. Índice de Fertilidad de los machos *D. mulleri*, tratados con NDMA.

$p < 0.001$

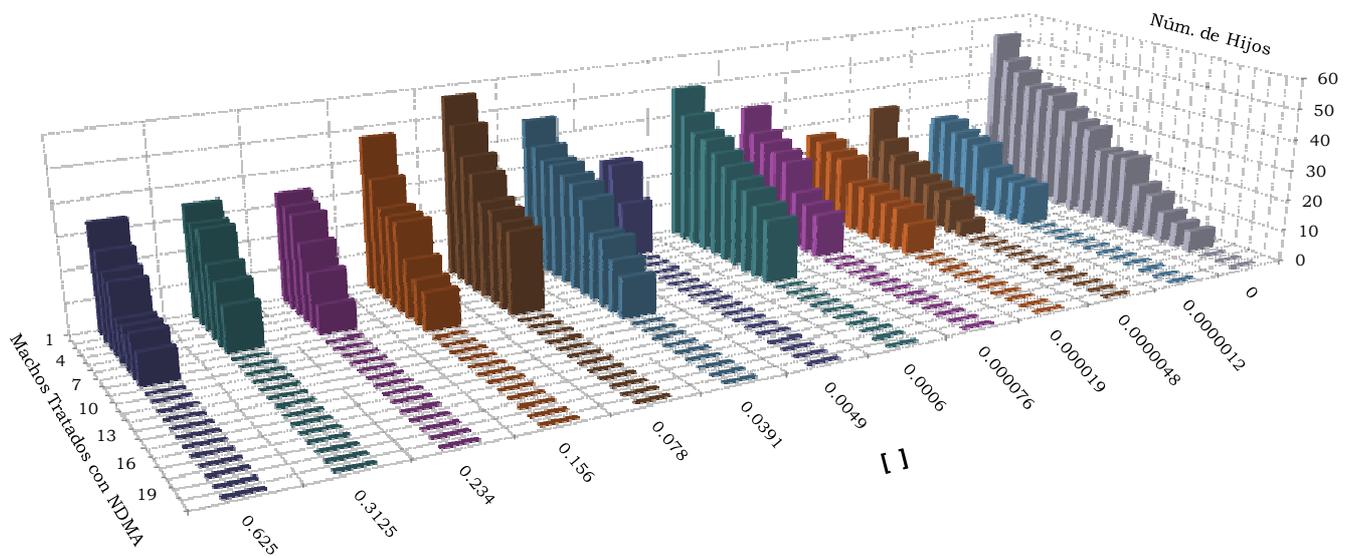
Se realizó la correlación de Spearman para determinar si entre las cepas, existía una correlación entre las cepas; en la comparación del índice de fertilidad de ambas cepas (Graf 7); mostrando que si existe correlación entre los índice de fertilidad ($p < 0.001$).



Graf 7. Índice de fertilidad, para las cepas *D. mulleri* y *D. melanogaster*.
 $p < 0.001$; para *D. mulleri*, $p < 0.05$; para *D. melanogaster*

Se obtuvo el total de los hijos de todos los machos (ambas cepas), sembrados, se presentan en gráficas (Graf. 9 y Graf. 12, respectivamente), donde no se observan diferencias significativas entre el total de progenie entre las cepas.

La progenie obtenida de los machos *D. melanogaster* expuestos a NDMA (Graf. 8), no muestra diferencias significativas ($p > 0.05$) en cuanto al número total de hijos por concentración con respecto del testigo.

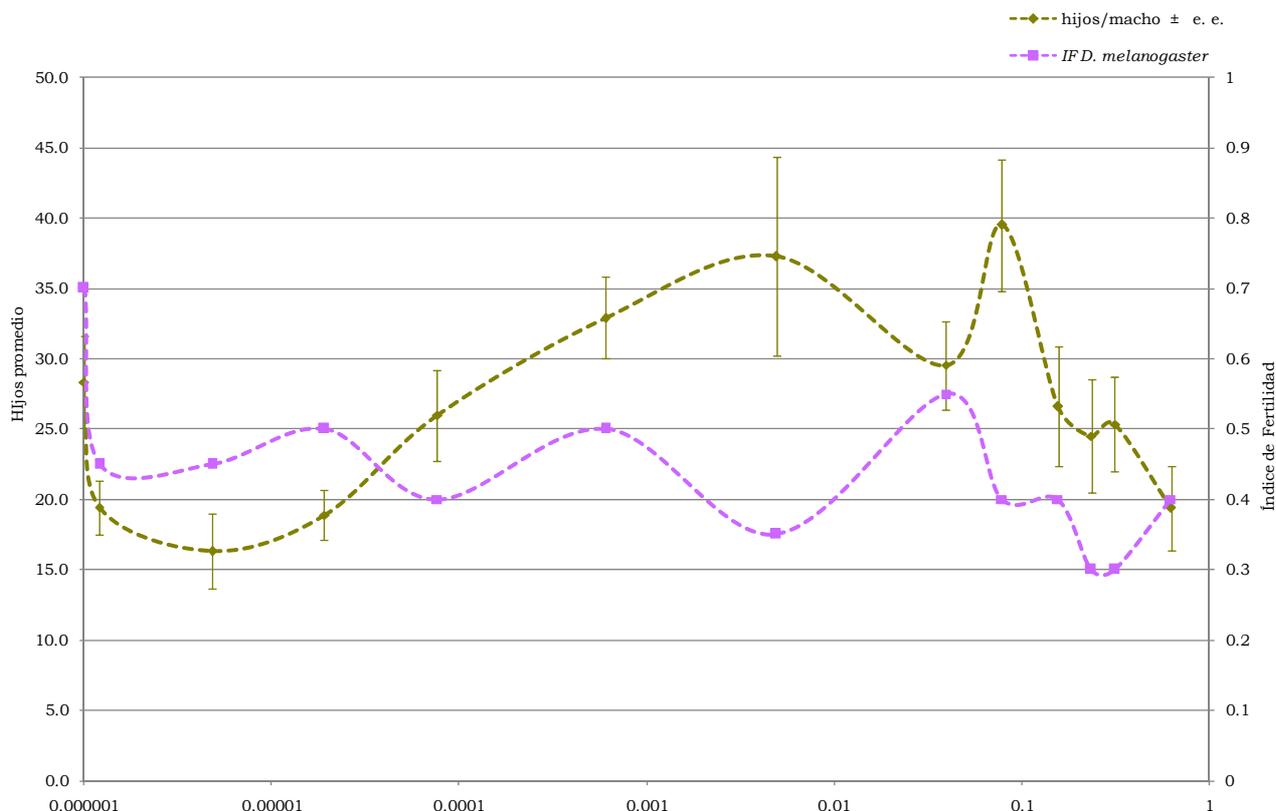


Graf. 9. Número de hijos totales de los machos *D. melanogaster*, tratados con NDMA,

Para cada cepa se obtuvo el número de hijos promedio de los machos fértiles (*D. melanogaster*, Tabla 5), para obtener un rango de hijos por macho en cada concentración y poder relacionarlos con el índice de fertilidad (Graf. 10); se realizó una correlación de Spearman, la cual indicó que si hay correlación entre la fertilidad de los machos con el número de hijos por cada uno de ellos.

Tabla 5. Hijos promedio por macho *D. melanogaster*, tratado con NDMA.

Concentración	hijos/macho \pm e. e.
0	28.35 \pm 3.24
0.0000012	19.44 \pm 1.94
0.0000048	16.33 \pm 2.69
0.000019	18.90 \pm 1.81
0.000076	26.00 \pm 3.24
0.0006	32.90 \pm 2.90
0.0049	37.29 \pm 7.04
0.0391	29.55 \pm 3.13
0.078	39.50 \pm 4.71
0.156	26.63 \pm 4.23
0.234	24.50 \pm 4.02
0.3125	25.33 \pm 3.35
0.625	19.38 \pm 2.99
1.125	0.00 \pm 0.00
5	0.00 \pm 0.00



Graf. 10. Correlación del índice de Fertilidad con el promedio de los hijos por macho *D. melanogaster*, tratado con NDMA

*, $p > 0.05$, si hay una correlación entre la fertilidad de los machos y la progenie

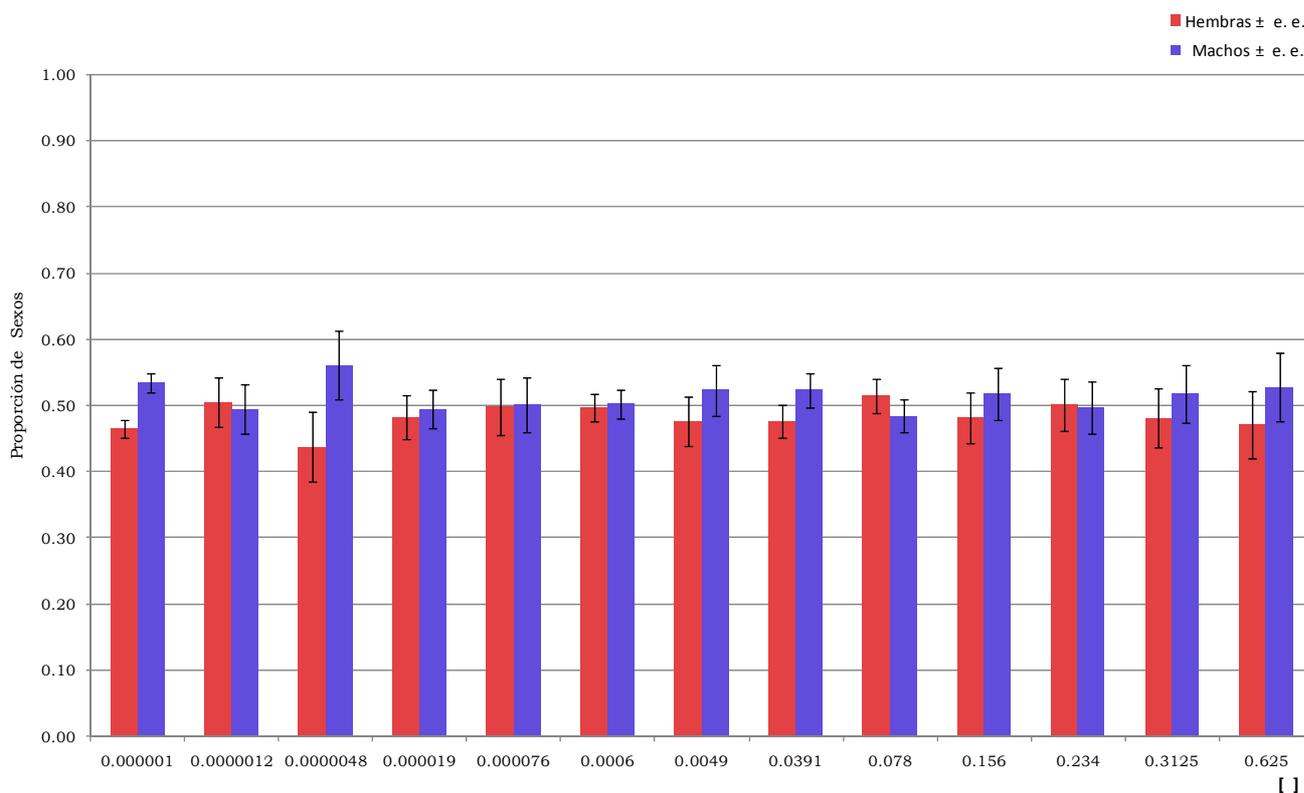
El promedio de los hijos por macho tratado para la cepa *D. melanogaster* no presentó diferencia significativa, con respecto a su testigo (Tabla 5).

La proporción de los sexos de los hijos de machos *D. melanogaster* (tabla 6), no indica diferencias significativas con respecto a las concentraciones, es decir, no hay cambios en el índice sexual de la progenie, se comporta de una manera similar al testigo (Graf. 11).

Tabla 6. Proporción de los sexos de la progenie de machos *D. melanogaster*, tratados con NDMA

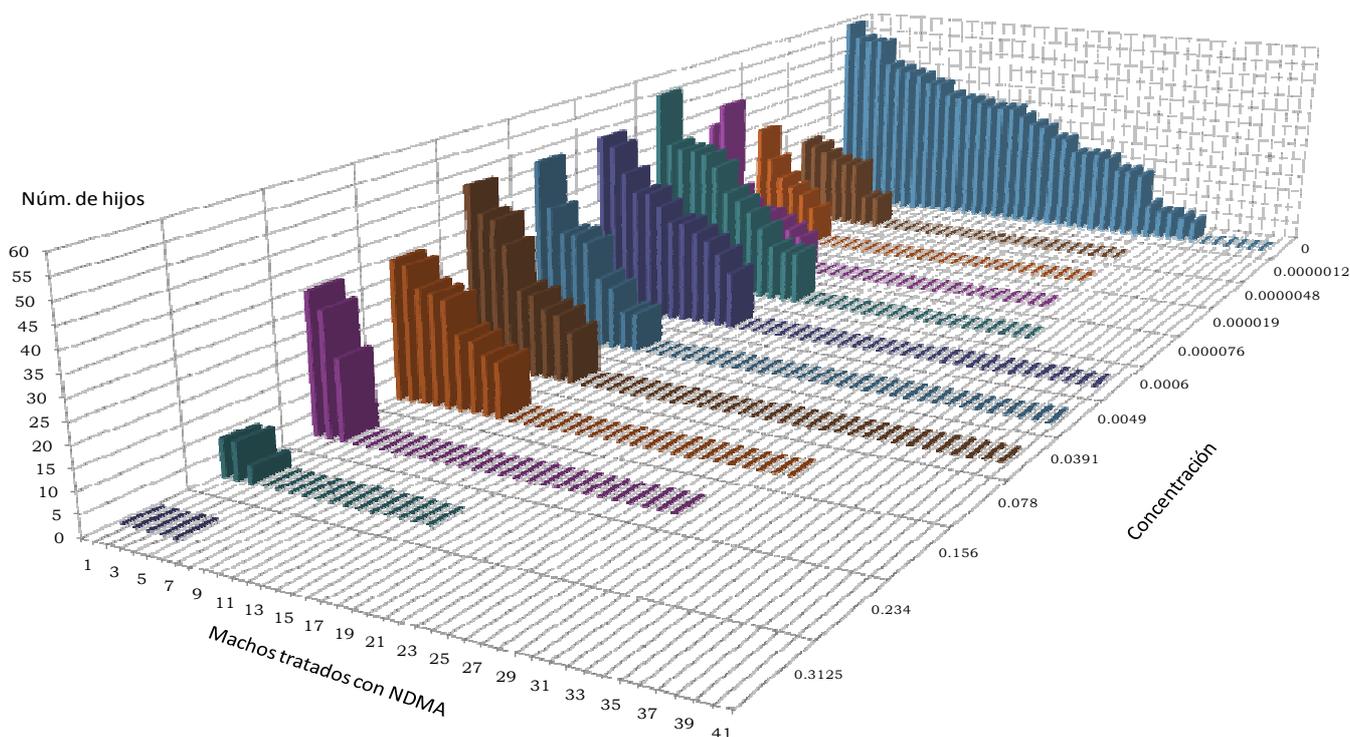
concentración	Hembras \pm e. e.		Machos \pm e. e.	
0	0.47	\pm 0.01	0.53	\pm 0.01
0.0000012	0.51	\pm 0.04	0.49	\pm 0.04
0.0000048	0.44	\pm 0.05	0.56	\pm 0.05
0.000019	0.48	\pm 0.03	0.50	\pm 0.03
0.000076	0.50	\pm 0.04	0.50	\pm 0.04
0.0006	0.50	\pm 0.02	0.50	\pm 0.02
0.0049	0.48	\pm 0.04	0.52	\pm 0.04
0.0391	0.48	\pm 0.03	0.52	\pm 0.03
0.078	0.52	\pm 0.03	0.48	\pm 0.03
0.156	0.48	\pm 0.04	0.52	\pm 0.04
0.234	0.50	\pm 0.04	0.50	\pm 0.04
0.3125	0.48	\pm 0.04	0.52	\pm 0.04
0.625	0.47	\pm 0.05	0.53	\pm 0.05

*.p> 0.005, no hay diferencias significativas en la proporción de sexos



Graf 11. Proporción de sexos de la progenie de los machos *D. melanogaster* tratados con NDMA

Se obtuvieron resultados de los hijos totales que hubo por cada macho y por cada concentración, en relación a cada macho de *D. mulleri*, tratado con NDMA, (Graf.12). Se observa que hay diferencias significativas entre la progenie de los machos que fueron tratados con el testigo.



Graf 12. Hijos totales por cada macho *D. mulleri*, sembrado por cada concentración.

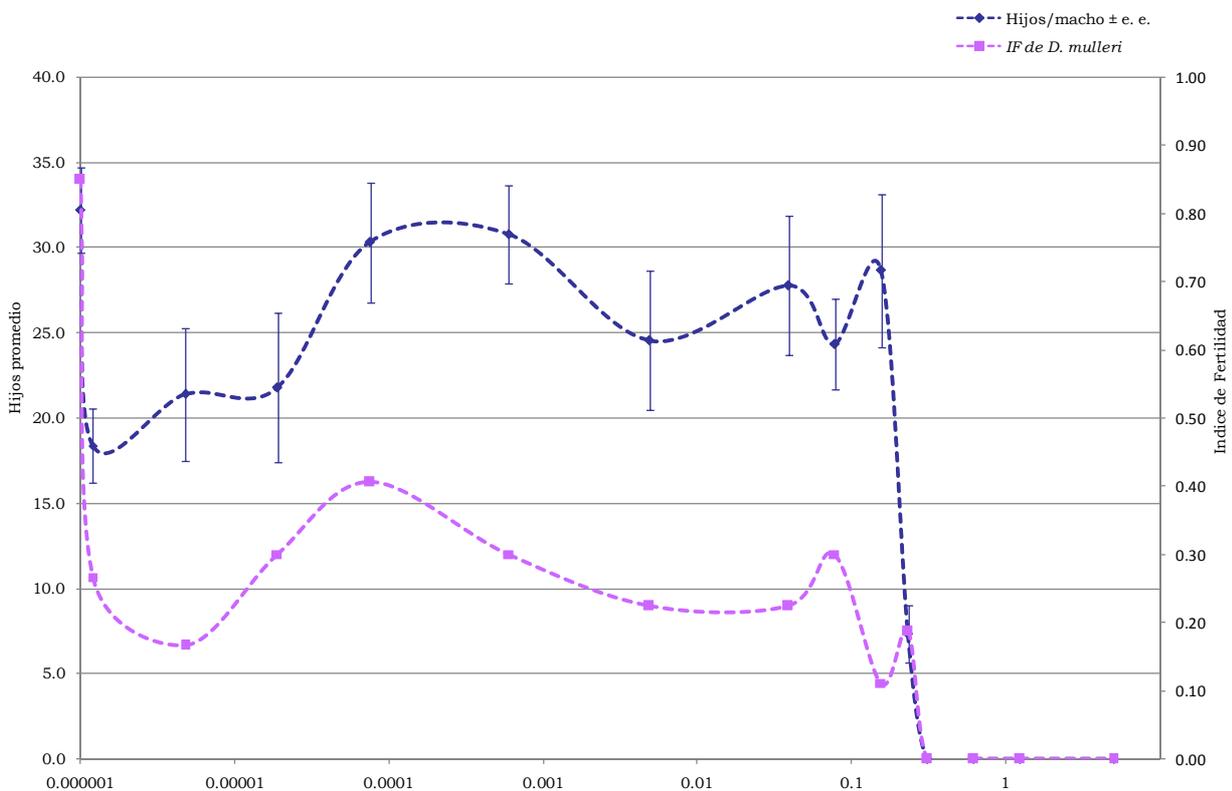
*, $p < 0.05$

Se obtuvo el promedio de los hijos por cada macho fértil de la cepa (Tabla 7), el análisis estadístico muestra que no existen diferencias significativas ($p > 0.05$), entre los promedios de las concentraciones. Después se hizo la relación entre el promedio de los hijos con el índice de fertilidad de estos machos, observando que no hay una relación entre los datos ($p > 0.05$) (Graf. 13).

Tabla 7. Promedio de Hijos por macho *D. mulleri* por concentración de NDMA

concentración	Hijos/macho \pm e. e.
0	32.18 \pm 2.51
0.0000012	18.38 \pm 2.19
0.0000048	21.40 \pm 3.88
0.000019	21.78 \pm 4.38
0.000076	30.31 \pm 3.53
0.0006	30.75 \pm 2.89
0.0049	24.56 \pm 4.08
0.0391	27.78 \pm 4.05
0.078	24.33 \pm 2.67
0.156	28.67 \pm 4.48
0.234	7.33 \pm 1.67
0.3125	0.00 \pm 0.00
0.625	0.00 \pm 0.00
1.25	0.00 \pm 0.00
5	0.00 \pm 0.00

p > 0.05



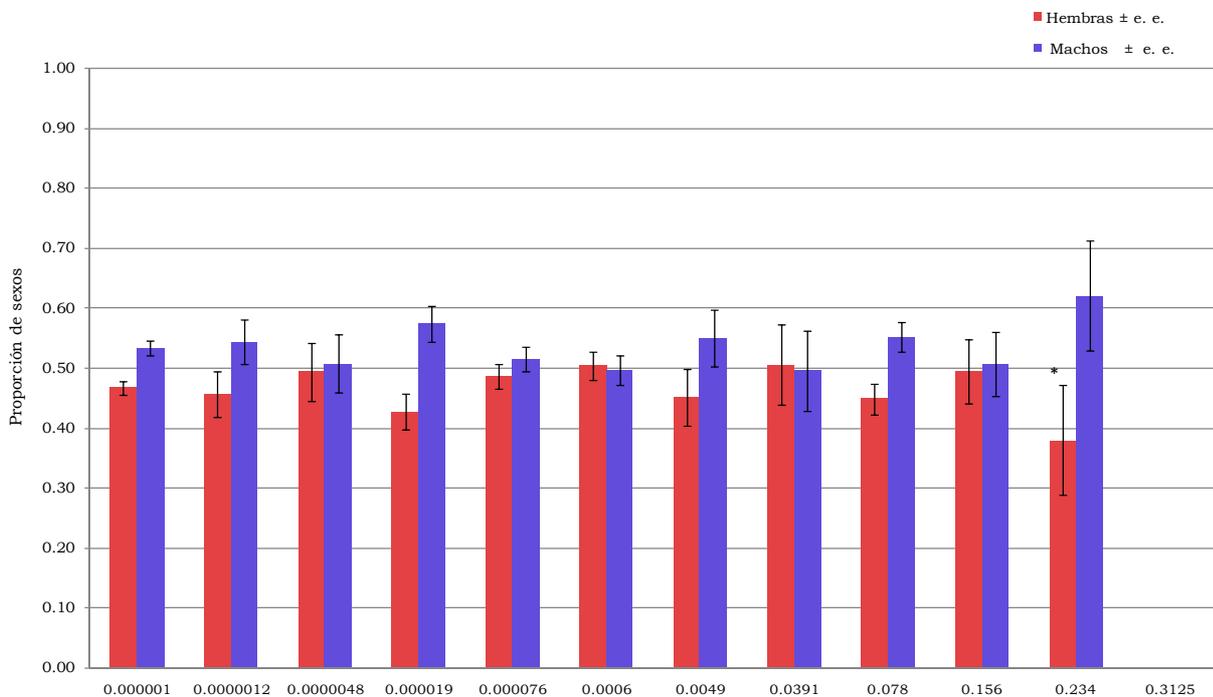
Graf. 13. Relación del índice de Fertilidad con el promedio de los hijos por macho *D. mulleri*, tratado con NDMA

Se obtuvo la proporción de los sexos (Graf. 14) del promedio de los hijos, el análisis muestra diferencias significativas entre el género de la progenie ($p < 0.05$), así como diferencias significativas entre la distribución del sexo por concentración ($p < 0.001$); (Tabla 8).

Tabla 8. Proporción de los sexos de la progenie de machos *D. mulleri* tratados con NDMA

Concentración	* Hembras \pm e. e.	* Machos \pm e. e.
0	0.47 \pm 0.01	0.53 \pm 0.01
0.0000012	** 0.46 \pm 0.04	** 0.54 \pm 0.04
0.0000048	** 0.49 \pm 0.05	** 0.51 \pm 0.05
0.000019	** 0.43 \pm 0.03	** 0.57 \pm 0.03
0.000076	** 0.48 \pm 0.02	** 0.52 \pm 0.02
0.0006	** 0.50 \pm 0.02	** 0.50 \pm 0.02
0.0049	** 0.45 \pm 0.05	** 0.55 \pm 0.05
0.0391	** 0.51 \pm 0.07	** 0.49 \pm 0.07
0.078	** 0.45 \pm 0.03	** 0.55 \pm 0.03
0.156	** 0.49 \pm 0.05	** 0.51 \pm 0.05
0.234	** 0.38 \pm 0.09	** 0.62 \pm 0.09
0.3125	** 0.00 \pm 0.00	** 0.00 \pm 0.00

*, $p < 0.05$ **, $p < 0.001$



Graf. 14. Proporción de sexos de la progenie de los machos *D. mulleri*, tratados con NDMA.

11

A partir de este punto el análisis de los datos sólo fueron para la cepa *D. mulleri*, donde se realizó un análisis detallado de los machos tratados.

Los datos del análisis morfológico muestran que para el testigo todos los machos presentan ambas gónadas, sin embargo en las demás concentraciones se presentó un fenómeno visible, donde los organismos presentaban cero, una o dos gónadas (Tabla 9). Fenómeno conocido como ginandromorfos, En las figura 17 y Figura 18, podemos observar ejemplos de este tipo de mosaicos.

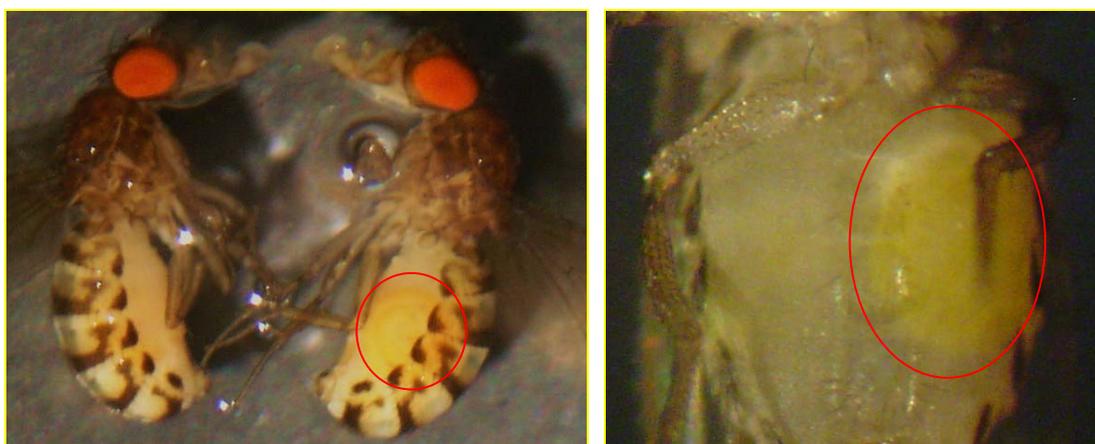


Fig. 17. Ginandromorfos de *D. mulleri*.

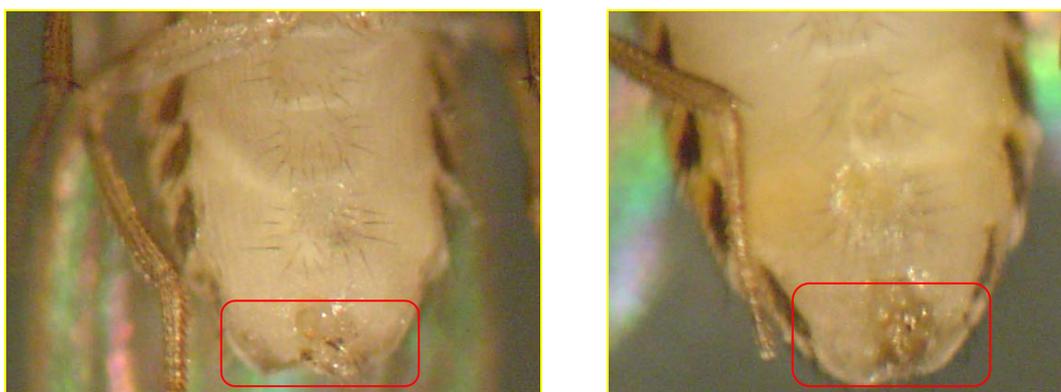


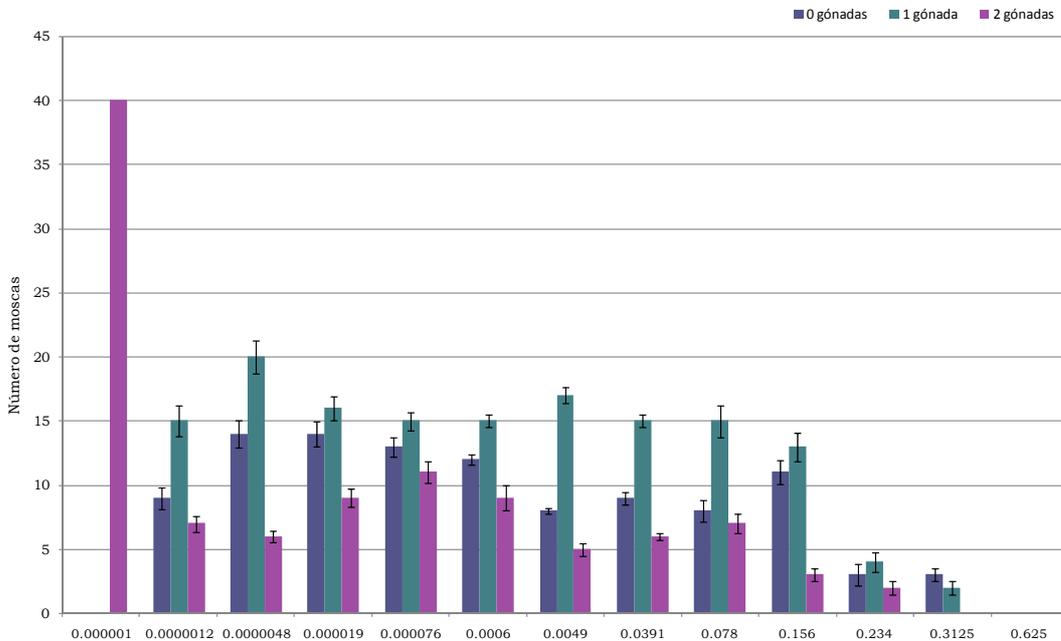
Fig. 18 Ginandromorfos de *D. mulleri*.

Tabla 9. Presencia-ausencia de gónadas de machos *D. mulleri*, tratados con NDMA

Machos <i>D. mulleri</i> , tratados con NDMA						
Concentración	**0 gónadas ± e. e.		** 1 gónada ± e. e.		2 gónadas ± e. e.	
0.000001	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00	1.00	± 0.00
0.0000012	0.30	± 0.85	0.50	± 1.19	0.23	± 0.63
0.0000048	0.47	± 1.03	0.67	± 1.31	0.20	± 0.48
0.000019	0.47	± 0.95	0.53	± 0.95	0.30	± 0.71
0.000076	0.41	± 0.75	0.47	± 0.71	0.34	± 0.87
0.0006	0.30	± 0.41	0.38	± 0.48	0.23	± 0.96
0.0049	0.20	± 0.25	0.43	± 0.65	0.13	± 0.50
0.0391	0.23	± 0.48	0.38	± 0.48	0.15	± 0.25
0.078	0.27	± 0.82	0.50	± 1.25	0.23	± 0.75
0.156	0.41	± 0.95	0.48	± 1.11	0.11	± 0.48
0.234	0.19	± 0.87	0.25	± 0.75	0.13	± 0.50
0.3125	0.60	± 0.48	* 0.4	± 0.50	0.00	± 0.00
0.625	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00

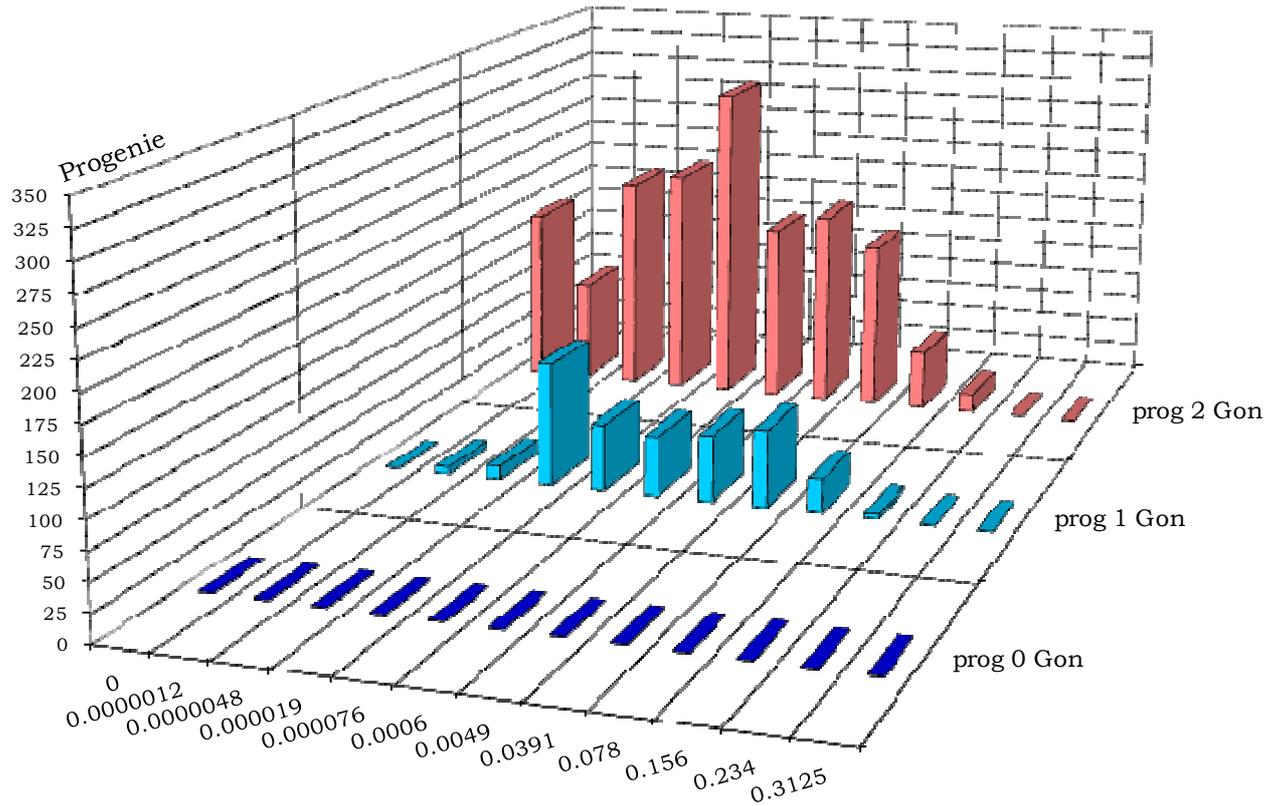
*, p< 0.05; **, p< 0.001

Estadísticamente, se muestra diferencias significativas entre los individuos tratados con NDMA (p< 0.001), esto solo comparando los grupos de machos con una y dos gónadas, también es significativo cuando se comparó para aquellos organismos que no tuvieron gónadas. (Graf. 15).



Graf 15. "Machos"; Ginandromorfos de *D. mulleri*, tratados con NDMA, distribuidos por su número de gónadas., p< 0.05; **, p< 0.001

La progenie se distribuyó, asignando el número de hijos por cada macho y por número de gónadas (Graf. 16). Es claro ver que aquellos organismos que no presentaron gónadas no fueron fértiles, por lo tanto no tienen progenie; la presencia de estos organismos se da en casi todas las concentraciones.



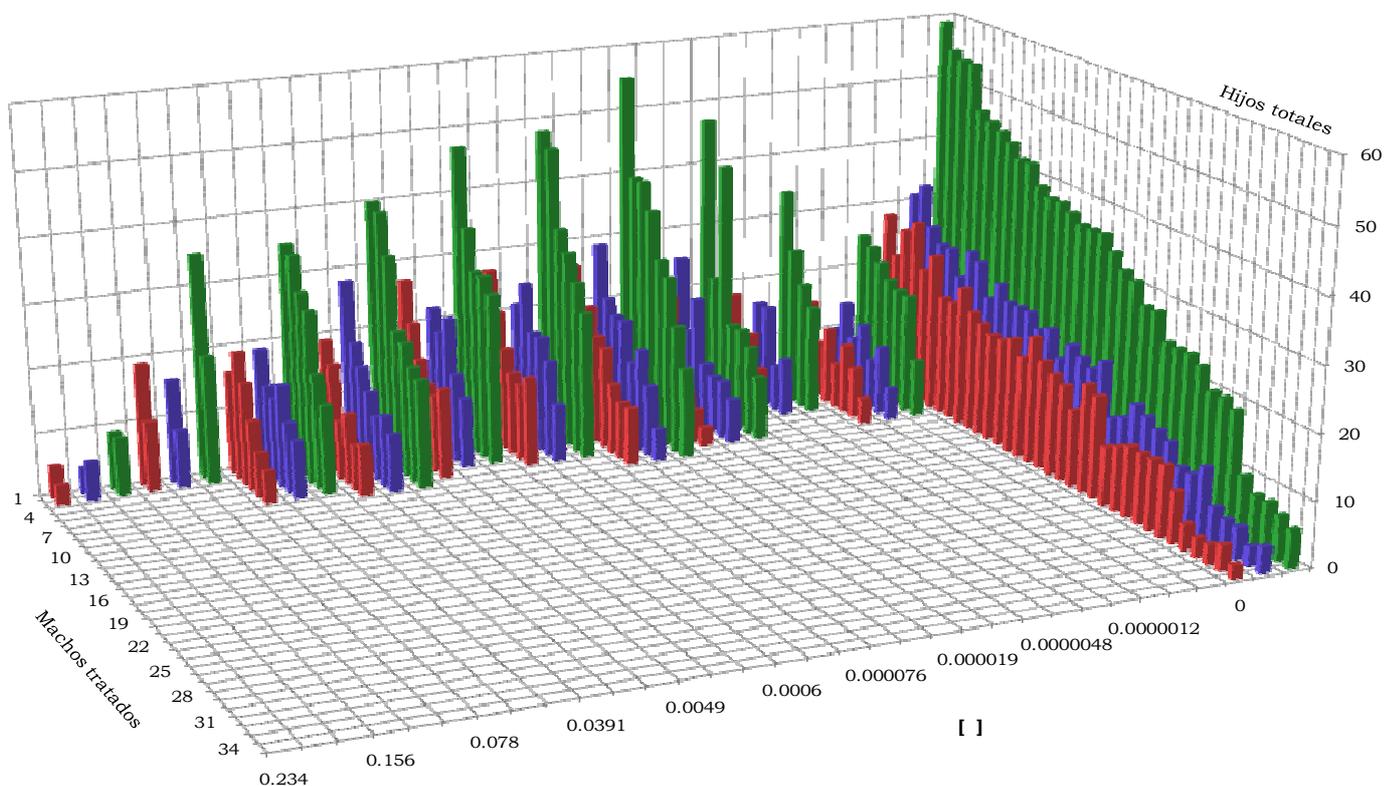
[]

Graf 16. Progenie de machos *tratados D. mulleri*, con diferente número de gónadas.
**, $p < 0.01$.

Se realizó el análisis de forma separada, para medir cuantos machos de dos gónadas y cuantos machos de una gónada habían tenido progenie. Los análisis estadísticos muestran diferencias significativas ($p < 0.01$), entre la progenie de los machos con dos gónadas y con los de una gónada (Graf. 16).

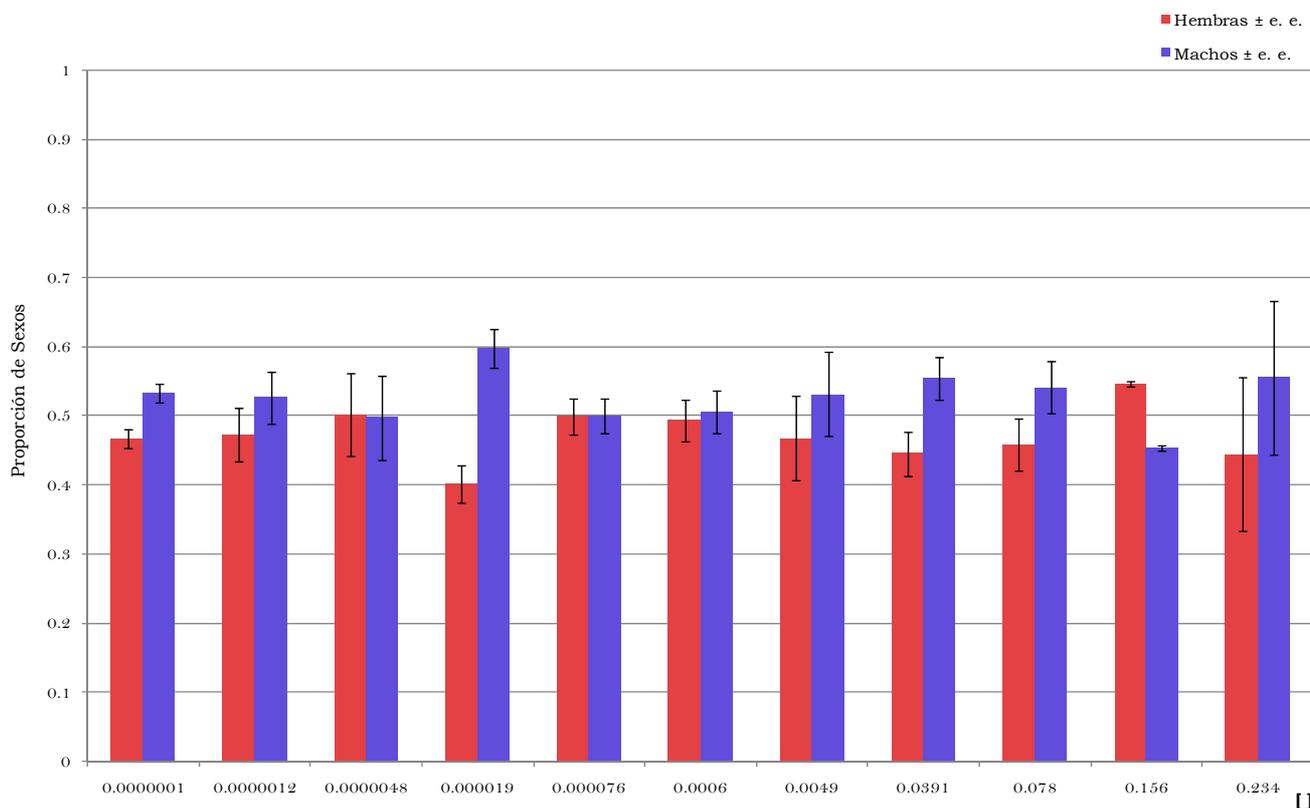
En la gráfica 17, se observa que el número de machos es significativamente menor al testigo, así como la progenie de estos machos es menor, existen diferencias significativas entre el número de hijos totales por cada concentración con respecto del testigo, y también se muestran diferencias significativas entre el número de hijos por cada macho con respecto del testigo.

También se muestra la distribución de los géneros, por cada concentración; la cual no muestra diferencia significativa con respecto al testigo.



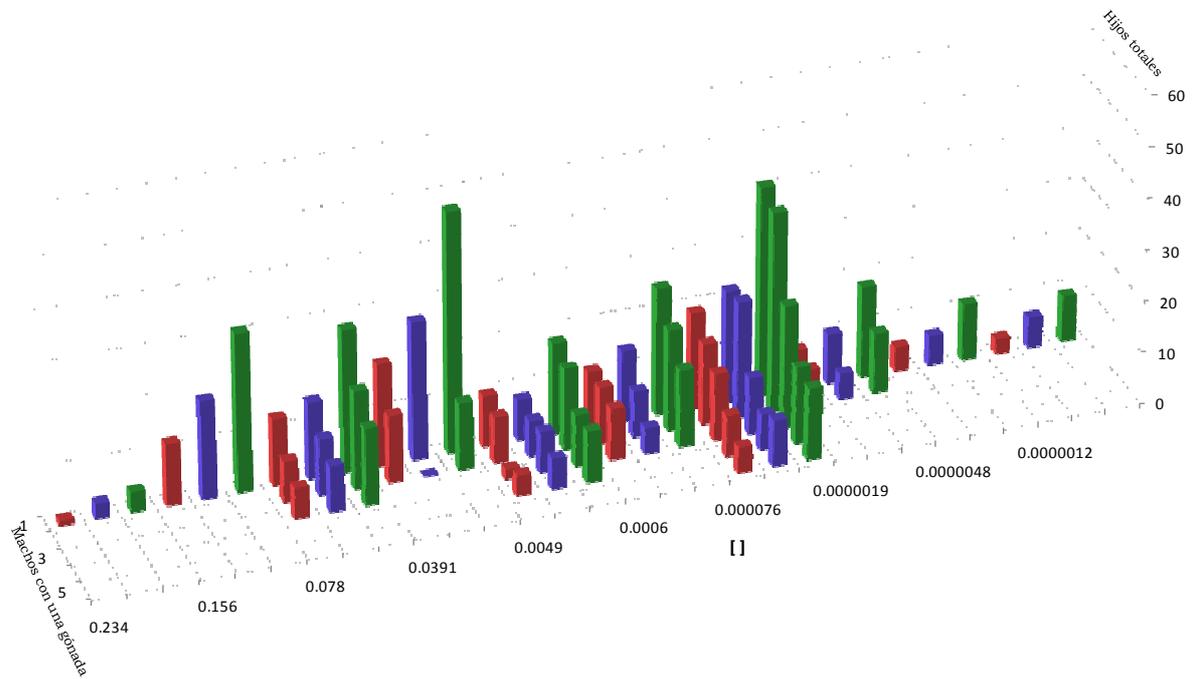
Graf. 17. Hijos totales de machos *D. mulleri*, tratados con NDMA con dos gónadas

La proporción de sexos de la progenie de machos con dos gónadas muestra diferencias significativas en las concentraciones de 0.000019, 0.0391, 0.156 y 0.234 μM ($p < 0.05$), (Graf. 18).



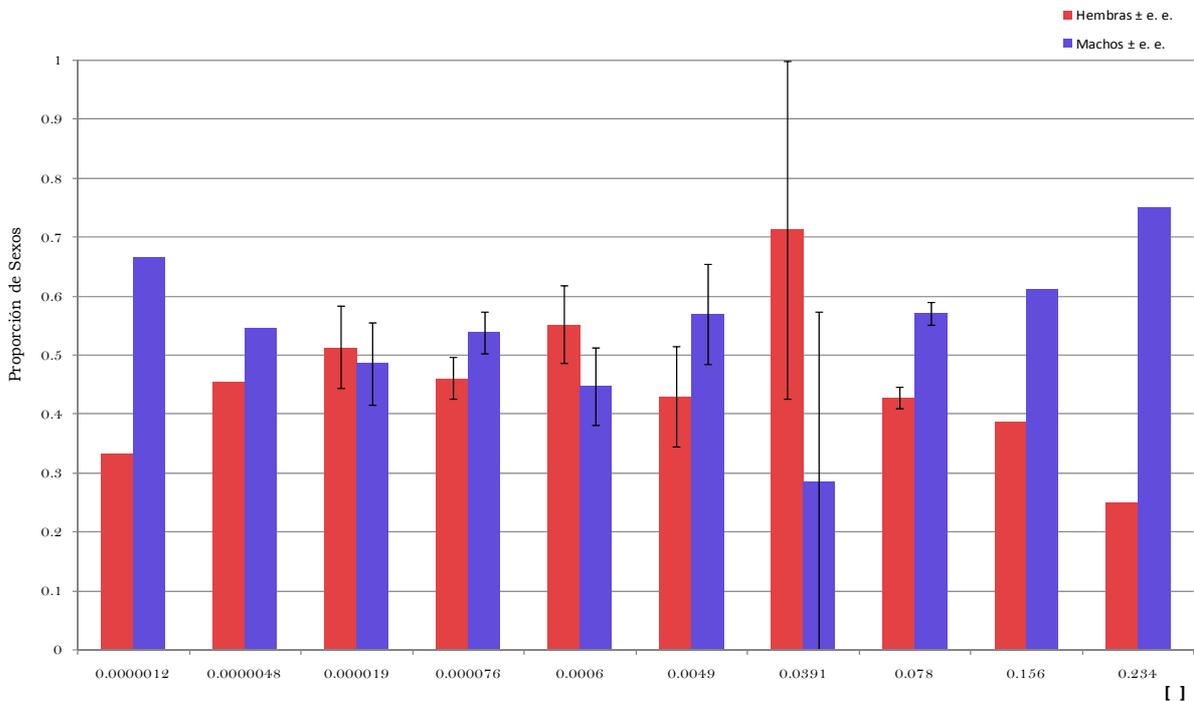
Graf. 18. Proporción de sexos de hijos de machos *D. mulleri*, con dos gónadas.

La distribución para los hijos de machos con una sola gónada, no se puede compara con respecto del testigo puesto que este fenómeno no se presenta en el control. Sin embargo entre las concentraciones de los machos con solo una gónada, si muestran diferencias significativas ($p < 0.05$). (Graf 19).



Graf. 19. Hijos totales de machos *D. mulleri*, con una sola gónada.

La proporción de los sexos de los hijos de machos con una gónada, muestran diferencias significativas entre todas las concentraciones con respecto a su testigo ($p < 0.05$) (Graf 20).



Graf. 20. Proporción sexual de hijos de machos *D. mulleri* con una gónada

7. DISCUSIÓN

Los químicos ambientales a través de sus efectos en la función de diferentes mecanismos son responsables de un gran número de anomalías, tanto en el desarrollo como en el ámbito de la reproducción, en un amplio rango de especies silvestres desde invertebrados, peces, aves, reptiles, y mamíferos incluyendo al humano (Cooper y Kavlock, 1997).

Algunos agentes ambientales tienen como blanco de acción a los órganos ocasionándoles una posible pérdida de función, en respuesta a exposiciones por periodos críticos del desarrollo. Además de que la complejidad de diferentes procesos celulares, que juegan un papel importante en la regulación de la diferenciación en etapas tempranas también se ven alterados por efectos de los tóxicos especialmente en desarrollo de los organismos (Cooper y Kavlock, 1997; Solomon y Schettler, 2000).

Se ha reportado que la exposición de NDMA en *D. melanogaster* afecta el índice de sobrevivencia así como la proporción de los sexos, con lo cual se sugiere que el efecto del compuesto se inclina hacia un género, dando como respuesta la pérdida de los organismos, sin embargo no existe pérdida evidente de la población recobrada (Ramos, 2006). Reporta también que el NDMA afecta el índice de sobrevivencia y la proporción de los sexos, en *D. melanogaster* es decir el compuesto altera el número de organismos recuperados por cada concentración, sin embargo, cuando se analiza la proporción de los sexos, ésta se ve favorecida

hacia los machos aunque teóricamente se espera una disminución de ambos sexos.

En este trabajo se reportan efectos similares en ambas cepas (*D. melanogaster*, *D. mulleri*), siendo *D. mulleri* un organismo más sensible ante la exposición de NDMA; estos efectos se reflejan en el índice de sobrevivencia.

Este comportamiento se observa porque *D. mulleri*, responde a partir de las concentraciones más bajas, comportándose siempre por debajo de su testigo.

Aunque para *D. melanogaster* las concentraciones más bajas son las más críticas para estos organismos, es decir, donde se recuperan menos organismos.

El tratamiento con este compuesto también indicó que la concentración letal para ambos organismos es diferente, siendo 0.625 μM una concentración letal para *D. mulleri*; mientras que para *D. melanogaster* la concentración letal está por arriba de 5 μM .

De manera regular la distribución de los sexos que se espera es aproximadamente una relación de 50:50 dentro de una población no expuesta (Deshpande *et al.*, 1995), sin embargo cuando hay una alteración, dada por una exposición de algún agente externo, se esperaría que disminuyera la población pero manteniendo algún equilibrio entre los sexos, sin embargo se ha observado para *D. melanogaster* que esta relación se ve afectada, inclinándose por uno de los dos géneros (Ramos, 2006).

En este caso el índice sexual se comporta de manera similar cuando se comparan ambas cepas, sin embargo, cuando se hace la relación entre las concentraciones por cada cepa, los análisis muestran que en *D. melanogaster* no hay variación significativa entre el número de machos recuperados por concentración con respecto de su testigo, mientras que para *D. mulleri* se observa que el índice de

machos en la mayoría de las concentraciones se encuentran por arriba del testigo, excepto 0.000076 μM y a partir de 0.156 μM .

Estos efectos se han observado con compuestos ambientales que tienen efecto de masculinizar o feminizar a los organismos expuestos (McLaughlin y Dixon, 1977; Gellert, 1978; Gray et al., 1985), observando cambios a nivel de desarrollo del tracto reproductor, alteración de los ciclos biológicos de los organismos. Desencadenando una variación en las poblaciones expuestas y también una disminución de organismos en las siguientes generaciones (Cooper y Kavlock, 1997).

Son muchos los organismos silvestres que al estar expuestos a compuestos químicos (ya sea de origen natural ó antropogénico), se ven alterados de manera permanente tanto en la diferenciación, el desarrollo y la fisiología del tracto reproductor; este tipo de alteraciones se reportan para insectos, anfibios, reptiles, aves, peces y mamíferos incluyendo al ser humano (Herbst et al., 1971; Gill et al., 1979; Fry y Toone, 1981; Crew et al., 1995; Guillette et al., 1995a, b).

Por lo tanto el análisis del índice sexual en poblaciones expuestas a compuestos químicos, muestra relevancia, ya que de manera preliminar se explica la variación que estas tienen entre los géneros, y también explica la existencia de organismos pseudohermafroditas, o de organismos que presentan características de ambos sexos, debido a la exposición.

En este trabajo se sugiere que en la progenie de los machos tratados, en algunos embriones femeninos se inactivó o perdió uno de los cromosomas sexuales por lo que a partir de la pérdida, ésta se amplifica mitóticamente. En insectos como *D. melanogaster* cada célula expresa un fenotipo que depende de su genotipo de manera independiente del resto de las células vecinas (García-Bellido y Merriam, 1971). Aunque no es significativa la variación en la proporción de sexos para ambas cepas, la aparición de ginandromorfos en *D. mulleri*, explica la existencia

de más machos en la proporción de sexos. Se sugiere también que estos machos que en un principio de su desarrollo eran hembras no son viables reproductivamente.

La determinación del sexo en *D. melanogaster* se da a través de un equilibrio entre los cromosomas sexuales y los autosómicos (2X: 2A), sin embargo cuando este equilibrio se rompe, alteran el número de cromosomas X funcionales, el mecanismo de determinación hacia la hembra se interrumpe, expresando la cascada preprogramada de determinación sexual, es decir, la correspondiente al macho (Deshpande *et al.*, 1995).

La aparición de mosaicos debido a la pérdida de función de los mecanismos de determinación, se expresa en *D. melanogaster* en forma de organismos con características de ambos sexos, los Ginandromorfos, sin embargo la aparición de estos organismos a veces no es evidente porque el efecto puede ser a nivel interno (Tsuchiyama *et al.*, 1978).

Los organismos ginandromorfos de *D. melanogaster* han sido utilizados para el estudio del comportamiento sexual de la especie, principalmente para el comportamiento del cortejo de los machos hacia las hembras (Szabad y Fajsz, 1982). Por otro lado el estudio de la función reproductiva, en organismos expuestos a agentes químicos, muestra que se ve afectada en cuanto al peso de las gónadas, así como los niveles de producción de ovocitos y espermatozoides (Price y Fenwick, 1985; Van Der Kraak *et al.*, 1992).

Si durante la diferenciación, y el desarrollo de estos organismos se les induce con un agente externo se puede evaluar el posible daño ambiental; estos eventos aunque se dan pocos en la naturaleza, si se inducen por algún compuesto alquilante o que produzca alguna pérdida de función de aquellos genes que regulan la cascada de genes de la determinación de los organismos, es muy

posible que se altere el índice sexual de las poblaciones, comprometiendo también la permanencia de esa población.

Se ha mostrado que la NDMA afecta a *D. melanogaster* a nivel reproductivo (Ramos P., 2006), sin embargo el análisis de *D. melanogaster* a ese nivel solo podría ser posible analizando a su progenie y si se quiere comprobar la falla del desarrollo gonadal de estos organismos se tendrían que hacer disecciones y este punto abarcaría mucho tiempo, y no se podría hacer ningún otro estudio con el mismo porque es una técnica invasiva.

D. mulleri por sus características morfológicas, simplifica este paso, ya que por el tamaño de sus gónadas y por el color de las mismas es fácil distinguir entre un macho y una hembra. Por lo que además de los datos que ya se obtienen con *D. melanogaster*, ahora podemos obtener un dato más acerca de la pérdida de función y compararla con la ausencia o presencia de las gónadas de los machos; así como, la aparición de organismos ginandromorfos.

La toxicidad de los compuestos además de comprometer la sobrevivencia y la fluctuación de los organismos, también tiene efecto a otros niveles; en el caso del desarrollo, así como el de la reproducción de estos organismos sufren alteraciones en los procesos fisiológicos relacionados con la diferenciación, la maduración sexual, la producción de gametos, la fertilización y la segregación de las siguientes generaciones (Repetto 1997).

El índice de fertilidad para *D. melanogaster* mostró valores por abajo del testigo, lo que nos está indicando que el compuesto en todas sus concentraciones altera y disminuye la capacidad de fertilidad de los machos tratados.

EL índice de fertilidad de *D. mulleri* mostró que las frecuencias de hijos en las distintas concentraciones se encuentran por debajo del testigo en más del 50%, de

su capacidad reproductora por lo tanto el compuesto compromete la fertilidad de estos organismos. Comparando estos resultados con los de la proporción de sexos de la cepa, observamos que los machos más prolíficos fueron aquellos donde en su concentración se recuperaron menos machos, teniendo una respuesta similar a la de *D. melanogaster*. Es decir entre las cepas existe una correlación con respecto a la respuesta del índice de fertilidad. Solo existe una tendencia que a mayor concentración *D. mulleri* pierde totalmente su capacidad reproductora.

Esto sugiere que hay un efecto en la disminución de la siguiente generación debido a una masculinización de las hembras, relacionado con las concentraciones a las que fueron expuestos estos organismos.

Se ha reportado que la exposición a diferentes compuestos altera la calidad, la producción, así como la eficiencia de gametos femeninos y masculinos en ciertas especies; lo que provoca anomalías en las siguientes generaciones que van desde una disminución en el número de la progenie hasta la ausencia total de la misma; es decir, los organismos expuestos son infértiles (Gupta, 2000).

De los hijos totales recuperados de la cruce de los machos tratados *D. melanogaster*, podemos observar que la curva se comporta de manera constante con respecto del testigo; este análisis muestra la progenie de todos los machos tratados por concentración sin embargo el análisis de hijos totales por macho si muestra variación.

De los hijos totales recuperados de la cruce de los machos tratados *D. mulleri*, podemos observar una diferencia importante tanto en el número de hijos por concentración así como el número de hijos por macho, lo que muestra el daño y la sensibilidad de *D. mulleri* ante el compuesto, alterando la progenie de estos machos expuestos.

Los machos tratados con NDMA, de la cepa *D. mulleri*, que se cruzaron con hembras vírgenes, fueron analizados y se separaron por número de gónadas (0, 1, 2 gónadas). La relación de estas alteraciones con respecto al testigo es muy evidente puesto que en el testigo no se presentaron organismos con alteraciones a nivel de las gónadas.

Es probable que los ginandromorfos, obtenidos sean productos de la pérdida de cromosoma o de la pérdida de función en organismos originalmente hembras, debido a la exposición de la NDMA.

De manera más interesante los datos indican que la aparición de organismos con una gónada puede tener dos orígenes diferentes; el primero que las larvas machos expuestas a NDMA sufrieron alteraciones en el tracto reproductor. Por otro lado que larvas hembras expuestas al compuesto, hayan sufrido daño a nivel de la diferenciación y del desarrollo del tracto reproductor, es decir, que se haya presentado pérdida de la función, alterando el equilibrio y desencadenando la formación fenotípica de un macho, es decir, presentaron masculinización como consecuencia de la exposición al compuesto durante su desarrollo.

Por lo tanto *D. mulleri* es un organismo que puede incorporarse en el análisis de las alteraciones causadas por compuestos a nivel del desarrollo y de la diferenciación del sexo, así como el efecto en la siguiente generación, lo que complementa la información acerca del potencial genotóxico de los compuestos en estudio.

8. CONCLUSIÓN

- Existen diferencias significativas en el índice de sobrevivencia entre las cepas, por lo tanto se sugiere que *D. mulleri* es un organismo mas sensible que *D. melanogaster*.
- No existen diferencias en la proporción de sexos de las cepas, por lo que la respuesta ante el compuesto es similar para los géneros de ambas cepas.
 - Existen diferencias significativas en la proporción de sexos entre las concentraciones por cada cepa.
- En ambas cepas existen diferencias significativas con respecto al índice de Fertilidad de los organismos tratados con respecto de su testigo.
 - Existe correlación entre los índices de fertilidad de ambas cepas.
- El número de hijos totales de machos tratados es menor significativamente para cada cepa, con respecto del testigo.
- La presencia o ausencia de gónadas en *D. mulleri* es un marcador que sugiere la pérdida de función en algún punto en el desarrollo de los organismos.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, M. D., *et al.* 2000 "The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*" *Science* 287: 2185- 2195.
2. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1989. Toxicological profile for N-nitrosodimethylamine. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Public Health Service and U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
3. Albert, Lilia A. (*comp.*) 2004. "Toxicología Ambiental" Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, México pp 45- 97
4. Ames, B.N. 1979. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science* 204: 587-593.
5. Andrews J. and Oliver B. 2002. Sex determination signals control *ovo-B* transcription in *Drosophila melanogaster* Germ Cells. *Genetics* 160: 537-545.
6. Anholt, R. R. H., Mackay, T.F.C., 2004. Quantitative genetic analyses of complex behaviours in *Drosophila*. *Nature Publishing Group*. 5:838-849.
7. Anwar Wagida A. 1997. Biomarkers of human Exposure to Pesticides. *Environmental Health Perspectives* 105(4): 801-806.
8. Ashburner, M., Bodmer, M., Lmeunir, F. 1984 "on the evolutionary relationships of *Drosophila melanogaster*" *Development Genetics* 4: 295- 312.
9. ATSDR 1989. Toxicological profile for N-nitrosodimethylamine. Prepared by the Syracuse Research Corporation in collaboration with the US Environmental Protection Agency. Washington, DC, US Public Health service, Agency for Toxic Substance and Disease Registry, pp119.
10. ATSDR. 1989. Toxicological Profile for N-Nitrosodimethylamine (Final Report). NTIS Accession No. PB90-182130. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 130 pp.
11. Baker, B. S. 1989. Sex in flies: the splice of life. *Nature*. 340: 521-524.

12. Baker, B. S., and J. Belote, 1982. Sex determination in *Drosophila melanogaster*: Analysis of transformer-2a sex-transforming locus. Proc Natl. Acad. Sci. USA, vol 79 pp. 1568- 1572.
13. Baker, B. S., and J. M. Belote, 1983. Sex determination and dosage compensation in *Drosophila melanogaster*. Ann. Rev. Genet. 17: 345-393.
14. Baker, B. S., K. Burtis, T. Goralski, W. Mattox and R. Nagoshi, 1988. Molecular genetic aspects of sex determination in *Drosophila melanogaster*. In: Proceedings of the XVI international congress of genetics. Genome 31: 638-645.
15. Baker, B. S., M. Wolfner, and J. Belote 1984. Sex determination in *Drosophila melanogaster*. Proc XV Int. Cong. Genetics, New Delhi, pp.223-232.
16. Baker, B. S., Nagoshi, R. N., and K. C. Burtis, 1987. Molecular genetic aspects of sex determination in *Drosophila*. BioEssays, 6: 66-70.
17. Belote, J. M., M. B. McKeown, D. J. Andrew, T. N. Scott, M. F. Wolfner, and B. S. Baker 1985. Control of sexual differentiation in *Drosophila melanogaster*. CSHSQB 50: 605-614.
18. Beranek, D. T. 1990. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. Mutat. Res. 231, 11-30
19. Bianchini, F., Montesano, R., Shuker, D. E. G., Cuzick, J. and Wild, C. P. 1993 Quantification of 7-methyldeoxyguanosine using immunoaffinity purification and HPLC with electrochemical detection. Carcinogenesis 14, 1677-1682
20. Bicudo, H. E. M. C., Richardson. 1977. "Gene regulation in *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis*, and their hybrids: The nucleolar organizer" Genetics 74: 3498-3502.
21. Bock, I. R., 1980. "Current status of the *Drosophila melanogaster* group. (Diptera)". Syst. Ent. 5(4): 341-356.
22. Bock, I. R., Wheeler, M.R. 1972. "The *Drosophila melanogaster* species group." Univ. Texas Publ. 7213: 1-102.
23. Bolognesi C., Rossi L., Santi L. 1988. A new method to reveal the genotoxic effects of *N*-nitrosodimethylamine in pregnant mice. Mutation research, 207:57-62.

24. Bridges C. B. 1916. Non-disjunction as proof of the chromosome theory of heredity. *Genetics* 1: 1-52.
25. Bridges C. B. 1921 Triploid intersexes in *Drosophila melanogaster*. *Science* 54: 252-254.
26. Bridges C. B. 1925 Sex in relation to chromosomes and genes. *Am Nat* 59: 127-137.
27. Brusick, David. 1987. "Principles of Genetic Toxicology" Ed. Plenum Press N.Y., EU.
28. Bryant, P. J. and Zornetzer, M. 1973. Mosaic Analysis of lethal Mutations in *Drosophila*. *Genetics* 75: 623-637.
29. Chandler D., McGuffin M.E., Piskur J., Ya J., Baker B.s., Mattox W. 1997. Evolutionary conservatrion of regulatory strategies for sex determination factor *transformer- 2*. *Molecular and Cellular Biology* 17(5): 2908-2919.
30. ChemSources. 2001. Chemical Sources International, Inc. <http://www.chemsources.com>.
31. Choi, J. and Valentine, R.L. 2002. Formation of *N*- itrosodimethylamine (NDMA) from reaction of monochloramine: a new disinfection by-product. *Water Research* 36: 817-824.
32. Choi, J. and Valentine, R.L. 2002. A kinetic model of *N*- itrosodimethylamine (NDMA) formation during water chlorination/chloramination. *Water Sci Technology* 46(3): 65-71.
33. Cline, T. W., Meyer, B. J., 1996. "Vive la difference: males vs females in flies vs worms". *Annu. Rev. Genet.* 30: 637-702.
34. Cooper R. L., Kavlock R. J. 1997. Endocrine disruptors and reproductive development: a weight-of-evidence overview. *Journal of Endocrinology*, 157: 159-166.
35. Craigmill, Arthur L., 2002. Genetic toxicology. University of California, Dep Environmental Toxicology.
36. Creus, A. 2001. Genotoxicidad, mutagénesis y carcinogénesis. *Genética toxicológica y carcinogénesis. In C. Paz-y-Miño, A. Creus, O. Cabré & P.*

- Leone (eds.). Laboratorio de Genética Molecular y Citogenética Humana. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito. pp 17-162
37. Crews D., Bergeron J. M., McLachlan J. A. 1995. The role of estrogen in turtle sex determination and the effect of PCB's. *Environmental Health Perspectives*. 103: 73-77.
 38. Cuenca, P., Ramírez, V., 2004. Mutagénesis ambiental y el uso de biomarcadores para predecir el riesgo de cáncer. *Rev. Biología Tropical* 52(3): 585-590.
 39. Dauwalder, B., Amaya-Manzanares, F., Mattox, W., 1996. A human homologue of the *Drosophila* sex determination factor *transformer-2* has conserved splicing regulatory functions. *Developmental Biology* 93: 9004-9009.
 40. Deshpande, G., Samuels, M.E., Schedl, P.D., 1996. *Sex-lethal* interacts with splicing factors in vitro and in vivo. *Molecular and Cellular Biology* 16(9): 5036-5047.
 41. Deshpande, G., Stuke, J., Schedl, P., 1995. *scute (sis-b)* Function in *Drosophila* sex determination. *Molecular and Cellular Biology* 15(8): 4430-4440.
 42. Dickerson R.L., Hooper M.J., Gard N.W., Cobb G.P. and Kendall R.J. 1994. Toxicological Foundations of ecological risk assessment: Biomarkers development and interpretation based on laboratory and wildlife species. *Environmental Health perspectives* 102(12): 65-69.
 43. Dorus, S., Busby, S. A., Gerike, U., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Karr, T. L., 2006. "Genomics and functional evolution of the *Drosophila melanogaster* sperm proteome" *38(12)*: 1440-1445.
 44. Durando, C. M., R.H. Baker, W.B. Heed, M. Wasserman and R. DeSalle. 2000. Phylogenetic analysis of the *repleta* species group of the Genus *Drosophila* using multiple sources of characters. *Molecular Phylogenetics, and Evolution* V. 16: 296-307.
 45. Environmental Mutagen –Society EMS. 1976. Environmental Mutagen hazard. *Science* 186: 503-514.

46. Falb, D., Fischer, J., Maniatis, T. 1992. Rearrangement of Upstream Regulatory elements leads to ectopic expression of the *Drosophila mulleri Adh-2 gene*” Genetics 132: 1071- 1079.
47. Farmer, P. B., Brown, K., Tompkins, E., Emms, V.L., Jones, D.J., Singh, R. and Phillips, D.H. 2005 DNA adducts: Mass spectrometry methods and future prospects. Toxicol. Appl. Pharmacol. 207, 293-301
48. Fry D. M. y Toone T. K. 1981. DDT- induced feminization of gull embryos. Science. 213: 922-924.
49. Fry, J. D., Nuzhdin, S. V., 2003. “Dominance of mutations Affecting Viability in *Drosophila melanogaster*” Genetics 163: 1357- 1364.
50. García, K., Duncan, T., Su, T. T., 2007. “Analysis of the cell division cycle in *Drosophila*” Methods 41: 198 –205.
51. García-Bellido A. and Merriam J.R. 1969. Cell lineage of the imaginal discs in *Drosophila gynandromorphs*. Journal Expl Zoology 170.61-76.
52. García-Bellido A. and Merriam J.R. 1971a. Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. Development Biology 24: 61-87.
53. García-Bellido A. and Merriam J.R. 1971b. Clonal parameters of the tergite development of *Drosophila melanogaster*. Development Biology 26: 264-276.
54. Gates, K. S., Nooner, T. and Dutta, S. 2004. Biologically relevant chemical reactions of N7-alkylguanine residues in DNA. Chem. Res. Toxicol. 17, 839-856
55. Gelbart William M. 1974. A new mutant controlling mitotic chromosome Disjunction in *Drosophila melanogaster*. Genetics 76: 51-63.
56. Gellert R. J. 1978. Kepone, Mirex, Dieldrin and Aldrin: Estrogenic activity and the induction of persistent vaginal estrus and anovulation in rats following neonatal treatment. Environmental Research. 16: 131-138.
57. Gil F. and Pla A. 2001. Biomarkers as biological Indicators of xenobiótico exposure. Journal of Applied Toxicology 21: 245-255.

58. Gilbert L. 2004. Halloween genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Endocrinology* (215): 1-10
59. Gill W.H., Schumacher F.B., Bibbo M., Straus F.H. and Schoenberg H.W. 1979. Association of diethylstilbestrol exposure *in utero* with cryptorchidism, testicular hypoplasia and semen abnormalities. *Journal of Urology* 122: 36-39.
60. Gonsebatt M.E., Salazar A.M., Montero R., Díaz Barriga F., Yañez L., Gómez H., and Ostrosky-Wegman P. 1995. Genotoxic Monitoring of Workers at a Hazardous Waste Disposal site in Mexico. *Environmental Health Perspectives* 1: 111-113.
61. González, M. Jaime, F., 2006. “*reacciones de biotransformación en peces: aplicaciones en metabolismo de drogas*” Universidad Nacional de Colombia. djfgonzam@yahoo.com
62. Goto S. G. y Kimura M. T. 2003. Heat-shock-responsive genes are not involved in the adult diapauses of *Drosophila triauraria*. *Gene* 326: 117-122.
63. Graf, U., Wild, D and Würigler, F.E. (1992b). Genotoxicity of [2-amino-3-methylimidazol-4-5-*f*] quinoline (IQ) and related compounds in *Drosophila*. *Mutagenesis* 7: 145-149.
64. Gray L. E Jr y Ostby, J. (1995). *In utero* TCDD alters reproductive morphology and function in female rat offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 133: 285-294.
65. Grimaldi, D. 1990. The phylogenetic classification of genera in the Drosophilidae (Diptera). *Bulletin of the American Museum of Natural History*.
66. Guengerich F. P. 2005. In *Cytochrome P450: structure, mechanism and biochemistry*, ed. Ortiz de Montellano, P. R. (Kluwer Academic/ Plenum, New York), pp 377-530.
67. Guengerich F. P. 2006. A malleable catalyst dominates the metabolism of drugs. *PNAS* 103(30): 13565-13566.
68. Guengerich F. P. 2006. Cytochrome P450 and other enzymes in Drug metabolism and Toxicity. *The AAPS journal* 8(1): E101-E111.

69. Guillette L.J., Crain D.A., Rooney A.A., Pickford D.B. (1995b). Organization versus activation: The role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environmental Health Perspectives* 103: 157-164.
70. Guillette L.J., Cross T.S., Cross D.A., Rooney A.A., Percival H.F. (1995a). Gonadal steroidogenesis in vitro from juvenile alligators obtained from contaminated or control lakes. *Environmental Health Perspectives* 103: 31-36.
71. Gupta, Chhanda (2000) Reproductive Malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *P. Society for Experimental Biology and Medicine*, 224: 61-68.
72. Habib SL, Badawi AF, Aweny HA, Mostafa MH, 1998. Modifications in the carcinogen-metabolizing capacity of mouse liver treated with N-nitroso compounds. *Oncol Rep. Jul-Aug; 5(4):965-9.*
73. Hard G. C., Butler W.H. (1970a). Cellular analysis of renal neoplasia: Light microscope study of the development of interstitial lesions induced in the rat kidney by a single carcinogenic dose of dimethylnitrosamine. *Cancer research*, 30: 2806- 2815.
74. Hard G.C. and Butler W.H. 1970a. Cellular analysis of renal neoplasia: Induction of renal Tumors in Dietary- Conditioned rats by Dimethylnitrosamine, with a Reappraisal of Morphological Characteristics. *Cancer Research* 30: 2796-2805.
75. Hard G.C. and Butler W.H. 1970b. Cellular analysis of renal neoplasia: Light Microscope study of the development interstitial lesions induced in the rat kidney by a single. *Cancer Research* 30: 2806-2815.
76. HEEP. 1980. Health and Environmental Effects Profile. Nitrosamines, No. 137. Washington, D.C.: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response.
77. Herbst A.L., Ulfelder H., Poskanzer D.C. (1971). Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal diethylstilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *New England Journal of Medicine*. 284: 878-881.

78. Hernández, B. 2000. "Comparación de la genotoxicidad de cuatro compuestos de cromo (VI) en células somáticas de *Drosophila melanogaster*" Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 72 pp.
79. HSDB. 2000. Hazardous Substances Data Base. National Library of Medicine.
80. Hsu, T.C. 1949. "The external genital apparatus of male Drosophilidae in relation to systematics." Univ. Texas Publ. 4920:80-142.
81. Hyne R.V. and Maher W. A. 2002. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 366-374.
82. IARC. 1978. Some *N-nitroso* compounds. Lyon, International Agency for Research on Cancer, (IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 17:125-175)
83. IARC. 1982. Chemicals, Industrial Processes and Industries Associated with Cancer in Humans. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Supplement 4. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 292 pp.
84. IARC. 1987. Overall Evaluations of Carcinogenicity. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Supplement 7. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 440 pp.
85. ICPEMC. 1983 Screening strategy for chemicals that are potential germ- cell mutagens in mammals. *Mutation research* 144: 117-177.
86. Ingham, P. W., McMahon, A. P., 2001. "Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles" *Genes and Development* 15: 3059 – 3087.
87. Inui N., Nishi Y., Taketomi M., Mori M. (1979) Transplacental action of sodium nitrite on embryonic cells of Syrian golden hamster. *Mutation Research*, 66: 149-158.
88. Janzer, B., Steinmann-Zwicky M., 2001. "Cell- autonomous and somatic signals control sex-specific gene expression in XY germ cell of *Drosophila*" *Mechanisms of Development* 100: 3-13.

89. Kimura, K., Ote, M., Tazawa, T., Yamamoto, D., 2005. "Fruitless specifies sexually dimorphic neural circuitry in the *Drosophila* brain" Nature Publishing Group 438: 229- 233.
90. Kivisto K.T., Kroemer H.K. and Eichelbaum M. 1995. The role of human cytochrome P450 enzymes in the metabolism of anticancer agents: implications for drug interactions.
91. Klaassen, C. 2001. "Casarett and Doull's Toxicology The basic science of poisons" McGraw Hill. United States of America. 1236 pp.
92. Kniewald J., Kmetić I., Gaurina-Srček V. and Kniewald Z. 2005. Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. Arh Hig Toksikol 56: 195-204.
93. Kohler R. 1994. Lords of the fly: *Drosophila* genetics and the experimental life. En: Johnston, D. (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. Nature Reviews. Genetics (3): 176-188
94. Lee, Ch., Yoon, J., Von Gunten, U. 2006. Oxidative degradation of *N*-nitrosodimethylamine by conventional ozonation and the advanced oxidation process ozone/hydrogen peroxide. Water Research 41:581-590.
95. Louis, M., Holm, L., Sánchez, L., Kaufman, M., 2003. "A theoretical model for the regulation of *sex-lethal*, a gene that controls Sex Determination and Dosage Compensation in *Drosophila melanogaster*" Genetics 165: 1355-1384.
96. Magee P.N., Barnes J.M. 1962. Induction of Kidney tumours in the rat with dimethyl- nitrosamine (*N-nitrosodimethylamine*). Journal of Pathology and bacteriology, 84: 19-31.
97. Marin, I., and Baker, B. S. 1998. The evolutionary dynamics of sex determination. Science, 281: 1990-1994.
98. Markow T. y O'Grady P. 2006. *Drosophila* a guide to species identification and use. Elsevier Inc. 259 pp.
99. Markow, Therese A., 1997. Assortative fertilization in *Drosophila*. The National Academy of Sciences 94: 7756-7760.
100. McKeown, M. B., J.M. Belote, D. J. Andrew, T. N. Scott, M. Wolfner, and B. S. Baker. 1986. Molecular genetics of sex determination in *Drosophila*. In:

- Gametogenesis and the early embryo (44th Symp. Soc. for Devel. Biol.), Alan R. Liss, Inc. pp3-17
101. McLachlan J.A., Dixon R. L 1977. Toxicologic comparison of experimental and clinical exposure to diethylstilbestrol during gestation. *Advances in sex steroid Hormone research*. 3: 309-336.
 102. McLean A. E. M., Magee P. N. 1970. Increased renal carcinogenesis by dimethyl nitrosamine in protein deficient rats. *British journal of experimental pathology*, 51: 587-590.
 103. Merck. 1983. *The Merck Index*, 10th ed. Rahway, NJ: Merck & Company, Inc.
 104. Mitch W. A. and Sedlak D. L. 2002. Factors affecting the formation of NDMA during the chlorination. *Environmental Science Technology* 36: 588-595.
 105. Moya, A., Ayala F. J., 1989 "Fertility interactions in *Drosophila*: Theoretical model and experimental tests" *J. Evolution Biology* 2: 1-12.
 106. Muñoz A. 1995. Relación entre el tiempo de acción de dos mutágenos y el tamaño de manchas inducidos en células somáticas de alas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 58 pp.
 107. Najm I., Trussell R.R. 2000. NDMA formation in water and wastewater. Proc. 2000 WQTC, Salt Lake City, UT.
 108. Negishi, T., Shiotani, T., Fujikawa, K and Hayatsu, H. 1991. The genotoxicities of N-nitrosamines in *Drosophila melanogaster* in vivo: The correlation of mutagenicity in the wing spot test with the DNA damage detected by the DNA-repair test. *Mutagenesis Research*. 252: 119-128.
 109. Nöthiger R. 1970. Sucrose density separation: a method for collecting large numbers of *Drosophila* larvae, *Dros. Inf. Serv.* (45): 177
 110. Nozawa, M., Aotsuka, T., Tamura, K., 2005. "A novel chimeric gene, *siren*, with retroposed promoter sequence in the *Drosophila bipectinata* Complex. *Genetics* 171: 1719-1727.
 111. Okada, T. 1954. "Comparative morphology of the Drosophilid flies." *Kontyu*. 22:36-46.

112. Oliveira, C. I., Bicudo, H. E. M. C. itoyama M. M.2006. "New evidence for nucleolar dominance in hybrids of *Drosophila arizone* and *Drosophila mulleri*" *Genetics Molecular*: 5(4): 632- 637.
113. Olmstead A.W. and LeBlanc G.A. 2007. The environmental-Endocrine Basis of Gynandromorphism (Interex) in a Crustacean. *International Journal Of Biological Sciences* 3(2): 77-84.
114. Osborne, M. R. and Phillips, D. H. 2000 Preparation of a methylated DNA standard, and its stability on storage. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 257-261
115. Patterson, J. T. 1943. "Drosophilidae of the Southwest", University of Texas. 4313 pp 330
116. Patterson, J. T., Mainland, G. B. 1944. "Drosophilidae of Mexico", University of Texas. 4445 pp 9-101
117. Peña, C., Carter, D., Ayala- Fierro, F. 2001 Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental. University of Arizona <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/>
118. Pfeiler, E., Markow, T. A., 2001 "Ecology and population genetics of Sonoran Desert *Drosophila*" *Molecular Ecology* 10: 1787- 2790.
119. Pordom C.E., Hardiman P.A., Bye V.J., Eno N.C., Tyler C.R., Sumpter J.P. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chemistry and Ecology* 4: 275-285.
120. Price K.R. and Fenwick G.R. 1985. Naturally occurring oestrogen in foods. *Additive and Contaminants* 2:73-106.
121. Ramos Morales, Patricia. 1994 "Efectos Genotóxicos de Algunas sales de arsénico en *Drosophila melanogaster*" UNAM, Tesis de Doctorado en Ciencias. México, pp 54-59
122. Ramos, P., Abundis, H., Gaytán, J., Ordáz, M., Orozco, P., Maldonado, J., Hernández, J., González, E., Reyes, P., Galicia, E. y Muñoz, J. 1993. "Manual de Laboratorio de Genética para *Drosophila melanogaster*" Ed. Mc Graw Hill Interamericana, México 131 pp.
123. Ramos, P. 2006. *N*- nitrosodimethylamine: From lethal concentrations to NOEC. Survival and genotoxic activity- concentration curve: effects on fertility

- and transgenerational induction of somatic mutation. *Journal of Environmental and Molecular Mutagenesis* 47(6): 437.
124. Repetto M. 1997. *Toxicología fundamental*. 3ª edición Edit. Diaz de Santos, Madrid.
 125. Richardson, R. H., Smouse, P.E., y Richardson, M.E. 1977. "Patterns of molecular variation. II. Associations of electrophoretic mobility and larval substrate within species of *Drosophila mulleri* complex". *Genetics* 85: 141-154.
 126. Richardson, R. H., Smouse, P.E., y Richardson, M.E. 1977. "Patterns of molecular variation. I. Interspecific comparison of electrophoretic in the *Drosophila mulleri* complex". *Biochemistry Genetic*. 14: 447-465.
 127. Rifkin, Scott A., Kim, J., White, K. 2003. "Evolution of gene expression in the *Drosophila melanogaster* subgroup" *Nature Genetics* 33: 138-144.
 128. Rodríguez- Arnaiz, R., Ramos, M., P. 1992 "Drosophila como sistema para detectar agentes genotóxicos" Coordinación de servicios editoriales de la Facultad de Ciencias, UNAM. México, pp. 7-9.
 129. Russo, C. A. M., Takezaki N., Nei M., 1995. "Molecular Phylogeny and divergence times of Drosophilid species" *Molecular Biology Evolution* 12(3): 391-404.
 130. Salz Helen 2007. Male or female? The answer Depends on When you Ask *PLoS Biology* 5, 12: 2782- 2784.
 131. Sánchez L. and Nöthiger. 1983. Sex determination and Dosage compensation in *Drosophila melanogaster*: production of male clones in XX females. *The EMBO Journal* 2(4): 485-491.
 132. Sanz, P., 2002. El análisis de polimorfismos de ADN puntuales (SNPS) en *Toxicología*. *Rev. Toxicol.* 19: 131-134.
 133. Sax N. and Lewis R. 1987. *Hawley's condensed chemical dictionary*, 11th ed. New York, NY, Van Nostrand Reinhold Co., p. 832.
 134. Schawaroch, V. 2002. "Phylogeny of a paradigm lineage: the *Drosophila melanogaster* species group (Diptera: Drosophilidae)." *Biological Journal of the Linnean society*. 76:21-37.

135. Schimidt J. D., Murphy G.P. (1966). Urinary Lactic dehydrogenase activity in rats with dimethylnitrosamine induced renal tumors. *Investigative urology*, 4: 57-63.
136. Schneider, D. 2000. Using *Drosophila* as a model insect. *Nature Reviews Genetics* (1): 218-226.
137. Schuzlze, D., Lee C. S., 1986. DNA sequence comparison among closely related *Drosophila* species in the *Drosophila mulleri complex*. *Genetics* 113: 287-303.
138. Shibahara, T., Ogawa, H. I., Ryo, H. and Fujikawa, K. 1995. DNA- damaging potency and genotoxicity of aflatoxin M1 in somatic cells in vivo of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis*. 10: 161-164.
139. Shirangi, T. R., Taylor B. J., McKeown M., 2006. "A double-switch system regulates male courtship behavior a male and female *Drosophila melanogaster*" *Nature Publishing Group* 38 (12): 1435-1439.
140. Simpson, P., 2002. Evolution Development in closely related species of flies and worms" *Nature Publishing Group* 3: 1-5.
141. Sittig, M. 1985. *Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens*, 2nd ed. Park Ridge, NJ: Noyes Publications. 950 pp.
142. Solomon G.M., Schettler T. 2000. Endocrine disruption and potential human health implications. *Canadian Medical Association Journal* 163(11): 1471-1476.
143. Stewart B.R. and Merriam J.R. 1975.Regulation of gene activity by dosage compensation at the chromosomal level in *Drosophila*. *Genetics* 79: 635-647.
144. Stewart B.R. and Merriam J.R. 1980. In: M. Asburner, and Wright, T. R. F. (eds.). *The genetics and Biology of Drosophila*. Vol. 2d. Academic Press, New York/ London, pp 107-140.
145. Sumpter J.P. 1995. Feminized responses in fish to environmental estrogens. *Toxicology Letters* 82-83: 737-742.
146. Szabad J. and Nöthiger R. 1992. Gynandromorphs of *Drosophila* suggest one common primordium for the somatic cells of the female and male gonads in the region of abdominal segments 4 and 5. *Development* 115: 527-533.

147. Szabad, J., Fajsz, C., 1982. Control of female reproduction in *Drosophila*: Genetics Dissection using Gynandromorphs. *Genetics* 100: 61-78.
148. Tarone A.M., Nasser Y.M. and Nuzhdin S.V. 2005. Genetic variation for expression of the sex determination pathway genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetic Research of Cambridge* 86: 31-40.
149. Throckmorton, L. H. 1982 the *virilis* species group. In: M. Asburner, H. Carson and J. Thompson, (eds.). *The genetics and Biology of Drosophila*. Vol. 3. Academic press, New York.
150. Timbrell, John. 2002 *Introduction to Toxicology*. 3rd edición, Licrary of Congreso U.S. pp.181.
151. TSCA. 1979. Toxic Substances Control Act, Chemical Substances Inventory.
152. Tsuchiyama, S., Sakaguchi, B., Oishi K. 1978. Analysis of Gynandromorphs survivals in *Drosophila melanogaster* infected with the male-killing SR organisms. *Genetics* 89: 711- 721.
153. Van Der Kraak G.J., Munkittrick K.R., McMaster M.E., Portt C.B., Chang J.P. 1992. Exposure to bleached Kraft pulp mill effluent disrupts the pituitary-gonadal axis of the white sucker at multiple sites. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 115: 224-233.
154. Venitt, A. and D. Phillips. 1995. The importance of environmental mutagens in human carcinogenesis and germline mutation. *Environmental mutagenesis*. Bios Scientific, Londres pp 1-17.
155. Vied, C., Horabin, J. I., 2001. The sex determination master switch, *sex-lethal*, responds to Hedgehog signaling in the *Drosophila* germline. *Development Research* 128: 2649-2660.
156. Vilela, C.R. 1983. A revision of the *Drosophila repleta* species group (diptera, drosophilidae). *Rev. Brasil. Entomol.* 27: 1-114.
157. Vogel, E., 1992. *Genotoxic chemicals an introduction into the basic principles of genetic toxicology*. Laboratorium voor Stralengenetica en chemische Mutagenese, RU Leiden, Sylvius Laboratoria.

158. Wasserman M. Koepper, H. R., 1979. Cytogenetics of the South American *Drosophila mulleri* complex: The *Martensis* clusters. More interspecific Sharing of inversions. *Genetics* 93: 935- 946.
159. Wasserman M. 1960. Cytological and phylogenetic relationship in the repleta group of the genus *Drosophila*. Univ, Texas. *Genetics*: 46: 842-859.
160. Wasserman, M., 1968. "Recombination-induced chromosomal heterosis" *Genetics* 58: 125- 139.
161. World Health Organization. 2002. N-nitrosodimethylamine. Concise international 22. National Toxicology Program. 2004. N-Nitrosodimethylamine CAS no. 62- 75-9. Eleventh report on carcinogens. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Washington, D.C.
162. Young R. 2002. Genetic toxicology: Web resources. *Toxicology* (173): 103-121.