



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Comparación de la genotoxicidad de la  
N-nitrosodimetilamina (NDMA) en dos  
nuevos mutantes de *Drosophila melanogaster*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

TANIA VÁZQUEZ FACI.

Directora de Tesis.  
DRA. PATRICIA RAMOS MORALES

2008





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Hoja de datos del jurado.

<p><b>1. Datos de la alumna.</b> Vázquez Faci Tania (+52) 55 56 61 12 70 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 402021836</p>
<p><b>2. Datos de la tutora.</b> Dra. Ramos Morales Patricia</p>
<p><b>3. Datos del sinodal 1.</b> Dr. Favila Castillo Mario Enrique</p>
<p><b>4. Datos del sinodal 2.</b> M. en C. Burgos Chaidez Rosa María</p>
<p><b>5. Datos del sinodal 3.</b> M. en C. Muñoz Hernández Adriana</p>
<p><b>6. Datos del sinodal 3.</b> Biol. Arellano Aguilar Rodolfo Omar</p>
<p><b>7. Datos del trabajo escrito.</b> Comparación de la genotoxicidad de la N-nitrosodimetilamina (NDMA) en dos nuevos mutantes de <i>Drosophila melanogaster</i>. 60 p 2008</p>

## **Dedicatoria**

**A Mitzi  
(Va por las dos)**

## **Agradecimientos**

**A Hugo Rivas que me ha apoyado desde que entré al laboratorio.**

**A Rodolfo Omar Arellano Aguilar que me ayudó mucho con esta tesis.**

**A los dos Reyes Vagos (Adonis y Adler Reyes Reyes).**

**A Rosa María Burgos Chaidez que me apoyo mucho en esta tesis.**

**A Mario Favila Castillo que sin él no hubiera terminado mi tesis.**

**A las brujas.**

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	7
2. INTRODUCCIÓN.....	8
2.1 Toxicología y Toxicología genética.....	8
2.2 Absorción, distribución, metabolismo y excreción de un tóxico.....	11
2.3 Biomonitores y Biomarcadores.....	14
2.4 La utilización de <i>Drosophila melanogaster</i> en la toxicología genética .....	16
2.5 Mutación .....	20
2.6 N-nitrosodimetilamina (NDMA).....	22
3. JUSTIFICACIÓN .....	27
4. HIPÓTESIS .....	28
5. OBJETIVOS .....	29
6. MATERIALES Y MÉTODO.....	30
6.1 Cultivo de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	30
6.2 Preparación de NDMA.....	30
6.3 Obtención de larvas.....	30
6.4 Procedimiento experimental .....	31
6.4.1 Primera parte del experimento.....	33
6.4.2 Segunda parte del experimento .....	34
6.5 Análisis estadístico.....	34
6.5.1 Primera parte del experimento .....	34
6.5.2 Segunda parte del experimento .....	35
7. RESULTADOS .....	36
7.1 Primera parte del experimento.....	36
7.1.1 Índice de sobrevivencia de los parentales.....	36

7.1.2	Sobrevivencia y proporción sexual de la progenie.....	39
7.2	Segunda parte del experimento .....	39
7.2.1	Índice de supervivencia de los parentales.....	40
7.2.2	Proporción sexual de los parentales.....	42
7.2.3	Índice de fertilidad.....	42
7.2.4	Promedio de la progenie por macho.....	44
8.	DISCUSIÓN .....	47
8.1	Primera parte del experimento .....	47
8.2	Segunda parte del experimento .....	48
8.3	Mutantes .....	52
9.	CONCLUSIONES .....	54
10.	ANEXO.....	55
10.1	Ejemplos de experimentos con organismos distintos a..... <i>Drosophila melanogaster</i> .	55
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	57

## 1. RESUMEN

Se compara el efecto de la N-nitrosodimetilamina (NDMA), un conocido promutágeno, sobre dos potenciales cepas mutantes (CS1 y CS2) y una cepa silvestre (Canton-S, CS) de *Drosophila melanogaster*, para ello se utilizaron cuatro biomarcadores: el índice de sobrevivencia, la proporción sexual, el índice de fertilidad y el promedio de la progenie por macho.

Se produjeron dos líneas de *D. melanogaster* al exponer especímenes silvestres (CS) a NDMA en concentraciones normalmente letales, más allá de la LD<sub>50</sub>. Cada línea de las cepas producidas se obtuvo a partir de los organismos recobrados de la cruce de un macho tratado con dos hembras no tratadas. Si estos organismos son posibles portadores de mutaciones, es probable que biomarcadores descritos con base en la población silvestre sean diferentes.

Para determinar si las cepas CS1 y CS2 son mutantes en este trabajo se exponen larvas de tercer estadio de las tres líneas (CS, CS1 y CS2) a 10 concentraciones de NDMA durante 72 horas. El objetivo de este trabajo es observar el efecto que tiene la N-nitrosodimetilamina en los biomarcadores para encontrar las diferencias entre las dos posibles mutantes y la cepa silvestre.

A partir de los resultados obtenidos se observó que la cepa CS2 muestra diferencias significativas en el índice de sobrevivencia y la proporción sexual para altas concentraciones de NDMA (1.25 mM y 2.5 mM). Al analizar la progenie promedio por macho se advirtió que en la concentración de 0.078 mM en las líneas CS1 y CS2 existen diferencias significativas con respecto a CS (ANOVA, p=0.05). Además se encontró que gran cantidad de huevos en concentraciones de NDMA mayores a 0.156 mM no se desarrollaron.

Los resultados apoyan la propuesta de que las cepas CS1 y CS2 podrían ser mutantes, es necesario continuar con la descripción de otros indicadores e identificar el tipo de mutación que podría estar involucrado en cada cepa.



## 2. INTRODUCCIÓN

El estudio de los efectos que producen los diferentes compuestos orgánicos e inorgánicos en los organismos es importante para determinar si dichos compuestos son tóxicos o no, las investigaciones toxicológicas realizadas abarcan desde los efectos que pueden producir en los órganos hasta aquellos que pueden inducir en el ADN.

En este capítulo se da una breve explicación de las dos disciplinas que se encargan de este tipo de estudios: la toxicología y la toxicología genética; posteriormente se describen las diferentes vías de absorción, distribución, metabolismo y excreción que un tóxico puede seguir en un organismo. Después se explica como el uso de biomonitores y biomarcadores permiten identificar la presencia de los compuestos a estudiar y sus efectos, en particular se detallan las características que hacen de *Drosophila melanogaster* un biomonitor muy importante en toxicología genética. A continuación se definen las mutaciones, se describe como puede ser inducida por tóxicos y se les diferencia de los organismos resistentes y de las fenocopias. Finalmente se puntualizan las características que hacen de la NDMA un tóxico importante en el estudio de las mutaciones.

### 2.1 Toxicología y Toxicología genética

La toxicología estudia el efecto que tienen los compuestos químicos, sean naturales o de origen antropogénico, sobre los seres vivos [Walker *et al*, 1996]. El estudio de la toxicología incluye la intensidad (dosis, concentración y tiempo), forma y ruta de exposición, el órgano u órganos blancos, el efecto del tóxico y las formas de eliminación y excreción de éste por los organismos expuestos. La exposición es el contacto de una población o individuo con un agente químico o físico y está determinado por la forma, duración, dosis o concentración del agente; así como la edad,

sexo y condición de salud del organismo. El órgano blanco es la parte del organismo que recibe el impacto del tóxico, puede ser el hígado, el corazón, los pulmones, etc. o moléculas como el ADN, a este último lo estudia la toxicología genética. La ruta de exposición es la forma por la que un agente químico ingresa al organismo, ésta puede ser: contacto, respiración, ingestión etc. Al alcanzar al órgano o molécula blanco, el agente físico o químico puede provocar una desviación del funcionamiento normal del organismo. El efecto depende de la dosis a la que se haya expuesto el individuo [Peña, 2001].

Muchos de los tóxicos tienen un efecto directo en el ADN y a largo plazo pueden provocar cáncer, incluso cuando la exposición ocurre a concentraciones muy pequeñas del tóxico. Los tóxicos pueden dañar a las células sexuales y si este daño afecta al ADN los efectos serán heredables, en este caso al agente causante del daño se le denomina genotóxico [Muñoz, 1998]. Algunos de los procesos por los cuales los genotóxicos pueden modificar el ADN son: alquilación (introducción de un etilo o metilo), intercalaciones entre los nucleótidos y el genotóxico, rompimiento de hebra sencilla de ADN, aductos de una molécula grande, introducción de fosfotriesteres, daño a las bases nitrogenadas, rompimiento de la doble hebra de ADN, entrecruzamiento de hebra de ADN y enlaces cruzados ADN-proteína, entre otros [Muñoz, 1998].

Valle Vega (1986) hace una clasificación de los tóxicos (cuadro 1). Los tóxicos naturales se pueden encontrar en los alimentos sin procesar; los tóxicos intencionales son los que se utilizan como ingredientes en los productos industrializados; los tóxicos accidentales son los que se encuentran en los productos de consumo y que por descuido no son eliminados en la preparación de los alimentos, por ejemplo, en la producción de frutas se utilizan plaguicidas, los cuales no necesariamente son eliminados antes de consumir las frutas; el último grupo son los tóxicos generados al cocinar los alimentos.

**Cuadro 1. Clasificación de los tóxicos a los que puede estar expuesto el ser humano[Valle 1986].**

NATURALES					
Leguminosas	Cereales	Bebidas estimulantes	Proteínas, péptidos y aminoácidos	Antivitaminas	Varios
Haba (glucósidos cianógenos)	Moho (micotoxinas)	Café (cafeína)	Toxina botulínica	Avidina	Algodón (gossipol)
Papa (inhibidores enzimáticos)	Semillas de leguminosas (ácido fítico)	Té (teofilina)	Toxina estafilococos	Tiaminasa	Papa (solanina, chaconina)
Alubias (fitohemaglutinas)	Haba (inhibidores de amilasas)	Chocolate (teobromina)	Falotoxina	Antivitamina K	Camote ( <i>Ipomea amarona</i> )
Alfalfa (saponinas)		Vinos y Licores (alcohol)	Anatoxina	Lipoxidasa	Chile (capsaicina)
Chícharo (favismo)			Islanditoxina	Antiniacina	Crucíferas, mostaza (bocio)
			Latirismo	Antipiridoxina	Pescados y mariscos (tetradotoxina, saxitoxina)
			Selenoaminoácidos		
			Mimosina		Quesos (aminas biógenas)
			Hipoglicina		Sorgo (taninos)
			Canavanina		Huevo (colesterol)
					Sasafrás (safrol)
					Champiñones (mutágenos)
					Cicadas (cicacina)
INTENCIONALES (ADITIVOS)					
	Conservadores	Aromatizantes	Nitritos	Acidulantes	Antiespumantes
	Colorantes	Edulcorantes	Emulsificantes	Secuestrantes	Enzimas
	Potenciadores	Estabilizadores	Clarificantes	Gomas	Vitaminas
	Antioxidantes	Nitratos	Minerales	Disolventes	
	Saborizantes				
ACCIDENTALES					
	Plaguicidas	Metales	Microorganismos	Varios	
	Organoclorados	Plomo	<i>Salmonella</i>	Radiaciones	
	Carbamatos	Mercurio	Coliformes	Antibióticos	
	Nicotinoides	Selenio	Virus	Hormonas	
	Piretrinas	Cadmio	<i>Shigela</i>	Triquinosis	
	Organofosforados	Arsénico	Estafilococos	Ftalatos	
	Ciclodienos	etc.			
	Rotenoides				
TÓXICOS GENERADOS DURANTE EL PROCESAMIENTO DE LOS ALIMENTOS					
	<b>Nitrosaminas</b>		Racemización de aminoácidos		
	Isopéptidos				
	Benzopirenos		Aminas biógenas		

## **2.2 Absorción, distribución, metabolismo y excreción de un genotóxico.**

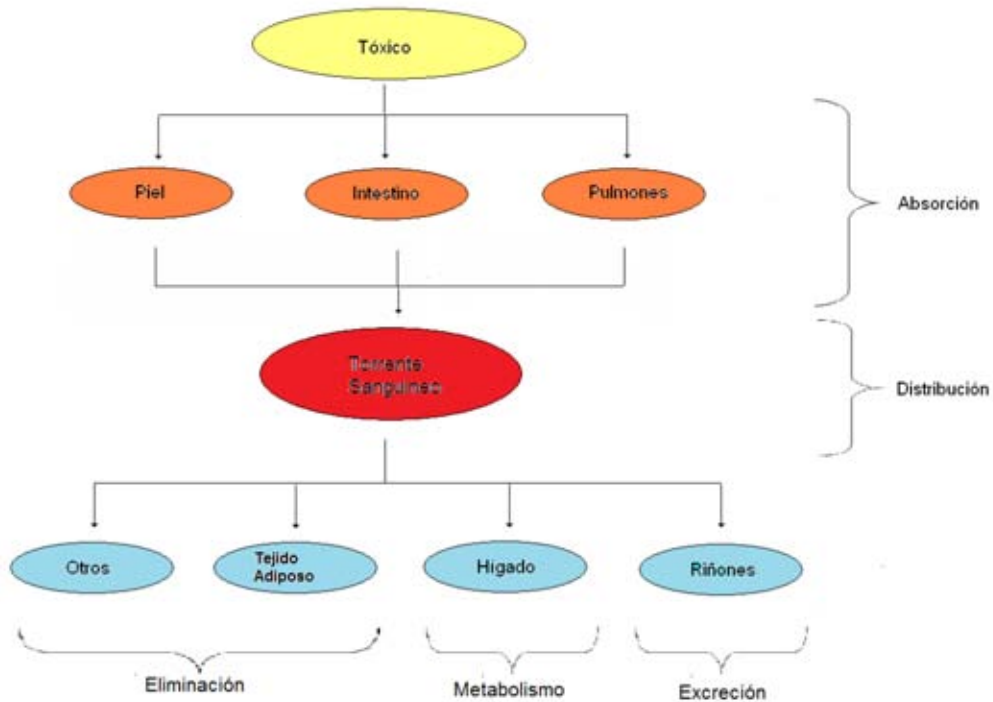
Al proceso por el cual se transporta y se transforma el genotóxico, desde el contacto con el organismo hasta llegar al órgano blanco, se le llama ADME (Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción. Fig. 1). A la absorción se le puede definir como “el proceso por medio del cual el genotóxico atraviesa membranas y capas de células hasta llegar al torrente sanguíneo” (ingestión, inhalación y absorción cutánea) [Peña, 2001]. La absorción ocurre por medio de difusión simple (las moléculas hidrófobas cruzan a través de los poros acuosos), difusión mediada por transportador, endocitosis o atravesando las barreras del cuerpo; por ejemplo, el cerebro tiene sus células tan juntas que están cerradas herméticamente y prácticamente no dejan pasar a ninguna sustancia sin un transportador activo [Casarett *et al*, 2005].

De acuerdo con Casarett (2005) una vez que el genotóxico llega al torrente sanguíneo, se distribuye en el organismo y puede ser excretado o eliminado. Este autor establece diferencias claras entre el proceso de excreción y el proceso de eliminación. La excreción sucede cuando disminuye la concentración de un genotóxico en el organismo, sacándolo del cuerpo por medio de los riñones, pulmones o glándulas a través de la orina, heces, bilis, aire exhalado y secreciones corporales como la leche, el sudor y la saliva. La eliminación del genotóxico ocurre cuando disminuye su concentración en la sangre sin ser excretado, esto es por medio de la biotransformación o por almacenamiento en alguna parte del cuerpo. Si se transporta al hígado, el genotóxico es biotransformado; si llega a los tejidos grasos es almacenado por difusión simple, es decir, que no es necesaria una reacción para que se almacene; también se puede almacenar en los huesos, en donde algunos iones como los fluoruros y metales (el plomo y el estroncio) se pueden intercambiar en las interfases entre los huesos y el

fluido extracelular, produciendo un intercambio en los cristales de hidroxiapatita de la superficie ósea [Casarett *et al*, 2005].

Las propiedades de algunos genotóxicos cambian a través del metabolismo propio del organismo. Así, la biotransformación es la alteración del genotóxico mediante el metabolismo del organismo en el que una molécula poco soluble en agua es gradualmente modificada para incrementar su solubilidad y facilitar su eliminación; por ejemplo, el benceno que es 1g en 1500 ml soluble en agua, al entrar al organismo primero se biotransforma en fenol que es 100 veces más soluble en agua que el benceno [Peña, 2001].

También a través de la biotransformación es que un compuesto puede volverse dañino. La biotransformación consta de dos fases, en la primera el compuesto se convierte en sustratos para las enzimas de la segunda fase; normalmente este proceso lo realiza el sistema enzimático dependiente del citocromo P450. En la segunda fase estos sustratos pasan por reacciones de conjugación donde metabolitos con enlaces de alta energía les ceden un grupo funcional polar, cualquiera de los cambios que sufre un tóxico puede, potencialmente, llevar a la formación de un derivado con actividad genotóxica [Peña, 2001].



**Fig 1. Rutas de acción de un genotóxico en el organismo (ADME).**

Hay varios factores que modifican la genotoxicidad de un compuesto al ser biotransformado, como la etapa de desarrollo en la que se encuentre el organismo, el sexo, las enfermedades que haya sufrido y en el caso de las hembras, la preñez [Agrual, 1997] (Ver ejemplo 1 en Anexo).

La metabolización de los genotóxicos a través de las etapas de desarrollo del organismo es muy variable: los fetos prácticamente no tienen las enzimas para biotransformar los tóxicos, éstas llegan a su máximo nivel en la edad adulta y disminuyen al envejecer. Algunas enzimas se van produciendo conforme se desarrolla el organismo, otras se originan en etapas críticas de éste, como por ejemplo, en el nacimiento, destete y pubertad de los mamíferos. Otros cambios son dependientes de las transformaciones en el medio ambiente y de las necesidades del individuo [Hodgson, 2001].

La biotransformación puede ser modificada por las hormonas y el metabolismo de cada sexo. A veces un genotóxico puede modificar la acción de la hormona de crecimiento en etapas tempranas y provocar problemas con el dimorfismo sexual. En algunos casos la testosterona y el estrógeno estimulan directamente la expresión de enzimas para metabolizar a los genotóxicos [Hodgson, 2001] (Ver ejemplo 2 en Anexo).

Goff (2006) realizó un experimento con *D. melanogaster* para diferenciar el metabolismo entre hembras y machos. Expuso a *D. melanogaster* (usando la cepa Oregon como mosca silvestre) durante 72 horas a 5 mM de fenobarbital o a 5 mM de atrazina. Utilizando la prueba de micronúcleos de células asociadas a la desintoxicación observó que existía un mayor número de éstos en las hembras que en los machos, y por lo tanto un mayor número de rompimientos de cromosomas.

### **2.3 Biomonitores y biomarcadores.**

En la toxicología genética se utiliza a los biomonitores para medir la genotoxicidad de un genotóxico. Son organismos empleados para detectar contaminantes y la acumulación de genotóxicos en el organismo. Por medio de biomarcadores se determinan los cambios bioquímicos, fisiológicos o morfológicos que presenten los biomonitores en su metabolismo (Butterworth *et al*, 1995).

Los biomonitores usados tienen distintos niveles de complejidad y organización de los organismos, desde bacterias hasta algunos modelos en donde se utilizan células humanas [Snape *et al*, 2004]. Snape (2004) realizó un estudio que utiliza diferentes organismos para observar la toxicidad de un medicamento que contiene interferon *IFN- $\alpha$* , comúnmente usada en el tratamiento alopático de la hepatitis. En el estudio utilizaron bacterias (*Salmonella typhimurium*), micronúcleos (células de humanos), ratones, ratas,

conejos de Nueva Zelanda y monos. Las bacterias se utilizaron para hacer la prueba de AMES (*Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test*), ésta consiste en exponer bacterias que no se pueden reproducir por ser auxotrófas para algún nutriente al interferon *IFN- $\gamma$* , si existe algún efecto genotóxico las bacterias tienen la posibilidad de reproducirse sin la necesidad de la administración del nutriente; la especie más utilizada es *Salmonella typhimurium*. En el caso de los micronúcleos son material genético no incorporado correctamente a las células hijas durante la división celular; se originan por roturas cromosómicas y posterior división celular [Casarett *et al*, 2005]. Se observó que no existe efecto genotóxico del interferon *IFN- $\gamma$* . En los ratones, ratas, conejos de Nueva Zelanda y monos se cuantificaron los efectos sobre la temperatura, respiración, sistema cardiovascular, movilidad, función hepática, período en que duermen, función renal y necrosis en el cuerpo. Tampoco en estas pruebas se encontró un cambio sobresaliente con respecto al funcionamiento normal del organismo de los animales empleados.

Este tipo de experimentos se hacen al no poder utilizar a los seres humanos directamente; la variedad de organismos que se utilizan es tal porque cada biomonitor tiene distintas características metabólicas, morfológicas o fisiológicas que es conveniente evaluar. Normalmente la evaluación de genotoxicidad se comienza en las bacterias hasta llegar a biomonitores como los micronúcleos de células de humano. El estudio en diversos organismos se realiza para determinar si un compuesto podría ser genotóxico para el ser humano.



## 2.4 La utilización de *Drosophila melanogaster* en la toxicología genética.

Uno de los biomonitores más utilizados en toxicología genética es *D. melanogaster* (comúnmente conocida como mosca del vinagre o mosca de la fruta) cuyas características se resumen en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Características principales de *D. melanogaster*.

- Posee rutas metabólicas parecidas a las de un mamífero.
- Tiene enzimas dependientes del citocromo P450.
- El metabolismo de desintoxicación es parecido al de los mamíferos.
- Ciclo de vida de 10 días.
- Existe una gran variedad de mutaciones conocidas en *D. melanogaster*.

A continuación se explican detalladamente cada una de las características enumeradas y cómo estas características hacen de *D. melanogaster* un buen biomonitor para los estudios de toxicología genética.

En primer lugar, en el metabolismo de *D. melanogaster* las enzimas dependientes del citocromo P450, que se encuentran en el intestino medio, en los cuerpos grasos y en los túbulos de Malpigi [Kulkarni *et al*, 1980] son similares a las enzimas dependientes de citocromo P450 de la fracción S9 del hígado de los mamíferos [Baar, *et al*. 1980].

Al tener un metabolismo de desintoxicación muy parecido al del mamífero *D. melanogaster* es capaz de biotransformar los genotóxicos sin la necesidad de utilizar un sistema metabólico exógeno. Un ejemplo en el que se emplea un sistema metabólico exógeno es la introducción de preparaciones enzimáticas de hígado en la prueba de AMES, estas preparaciones biotransforman los tóxicos a sus formas activas haciendo más completa la prueba. Se necesita utilizar preparaciones enzimáticas de hígado porque las bacterias usadas en la prueba de AMES no tienen un metabolismo endógeno para biotransformar los tóxicos (Madigan *et al*, 2001).

El ciclo de vida de *D. melanogaster* es de 10 días a 25°C (Fig 2). Las primeras 24 horas *D. melanogaster* es huevo. Durante las siguientes 24 horas es una larva de primer estadio. Cumplidas 48 horas es una larva de segundo estadio. Después de 72 horas se convierte en una larva de tercer estadio, al final de este estadio deja de producir hormona del crecimiento y produce ecdisona, la hormona que induce la pupación, en este momento los genotóxicos tienen un efecto mayor al coincidir con el cambio hormonal. A las 96 horas la forma siguiente que adopta es pupa; en este periodo el organismo no ingiere alimento ni tiene contacto con el exterior. También en esta fase es cuando las células imagales se diferencian, dando lugar a los órganos y extremidades del adulto; estas células son diferentes a las demás por su tamaño pequeño, porque son células diploides y porque alcanzan su diferenciación hasta después de la metamorfosis que ocurre en la pupa. La ecdisona es la principal responsable de la diferenciación, la cual provoca cambios en el organismo como la destrucción de órganos de la larva para formar órganos y estructuras del adulto [Ramos *et al*, 1993].

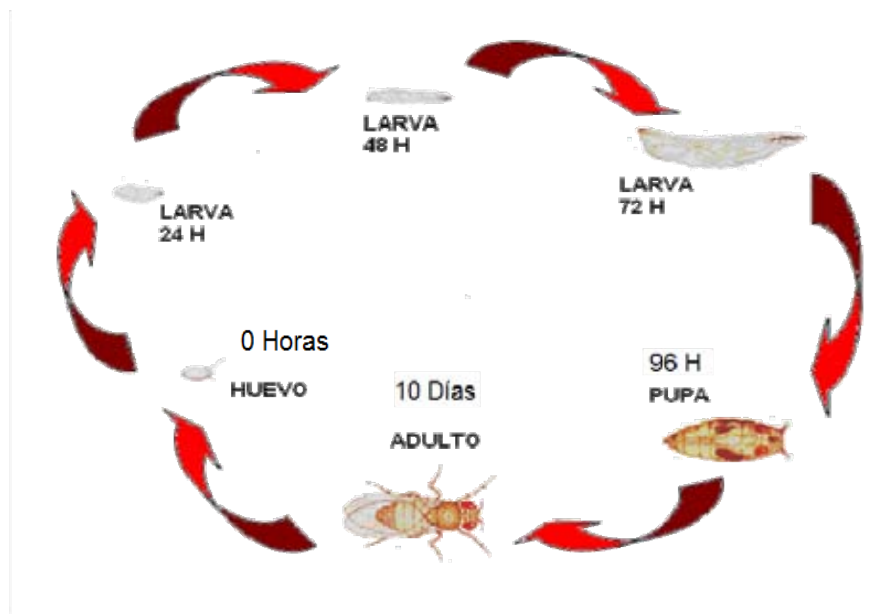


Fig 2. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

El hecho de que el ciclo de vida de *D. melanogaster* sea de 10 días, facilita el análisis de los efectos de un tóxico en un periodo relativamente corto. Un ejemplo de esto es el estudio realizado sobre la recombinación y mutación somática que produce una mezcla compuesta con cromo en *D. melanogaster* [Muñoz, 2007], en el que se logra observar los efectos del tóxico en tan solo 10 días.

Existe gran variedad de mutaciones conocidas en *D. melanogaster*, desde morfológicas o fenotípicas, hasta fisiológicas que permiten estudiar las deleciones, translocaciones, inversiones y duplicaciones que ocurren en el ADN al estar expuesto a un genotóxico (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Tipos de mutaciones de *Drosophila melanogaster* (Greenspan, 2004)**

Nombre de la mutación	Característica
Alelo nulo	Mutación que elimina completamente una función de un gen; puede ser causada por cualquier lesión que bloquea completamente la transcripción o traducción del gen.
Hipomorfos	Produce una pérdida parcial de funciones; consiste en lesiones que reducen el nivel o eficiencia del producto de los genes.
Neomorfos	Mutación que produce una nueva función en el organismo.
Antimorfos	Es una mutación que es contraria con respecto al alelo silvestre.

Existen pruebas que permiten evaluar el efecto de diferentes compuestos. Una de estas es la prueba de mutación y recombinación somática (SMART por sus siglas en inglés) que utiliza mutantes de *D. melanogaster* para hacer cruza (Arellano-Aguilar, 2002). También es posible utilizar los cromosomas llamados politénicos que se encuentran en la interfase de las células larvarias para hacer preparaciones, éstos son muy fáciles de ver al microscopio porque las fibras de cromatina están replicadas pero no están separadas en diferentes núcleos desde la mitosis. Los cromosomas politénicos también pueden servir para estudiar la actividad de la síntesis cromosomal, esta actividad se puede observar citológicamente usando microscopía y métodos

bioquímicos, porque cada uno de los cromosomas del complemento tiene una única pareja de bandas e interbandas (claras y oscuras) que pueden ser identificadas fácilmente, lo que permite analizar a los cromosomas por separado; estos estudios de las bandas de los cromosomas politénicos pueden dar información acerca de los genes localizados en estos cromosomas, pero principalmente se utilizan para observar las deleciones, translocaciones, inversiones y duplicaciones en el ADN cuando las larvas se exponen a un genotóxico [Avers, 1984]. Otras pruebas que permiten evaluar los efectos de compuestos se presentan en el Cuadro 4.

**Cuadros 4. Pruebas de evaluación de compuestos (Roberts, 1986)**

<b>Mutación puntual</b>	
Letales recesivos ligados al sexo	Determina la eficiencia de la mutagénesis. Se hacen cruzas de <i>D. melanogaster</i> con un balanceador ligado al sexo, estas cruzas se realizan hasta obtener la F <sub>2</sub> para observar las mutaciones.
Letales autosómicos	Determina la eficiencia de la mutagénesis. Se hacen cruzas de <i>D. melanogaster</i> con genes homócigos letales, estas cruzas se realizan hasta obtener la F <sub>4</sub> para observar las mutaciones.
Mutación somática	Se utiliza para determinar el efecto de los compuestos. Se observa el desarrollo de las células imagales en <i>D. melanogaster</i> de modo que la inducción de alteraciones se manifiesta en el fenotipo.
<b>Aberraciones cromosomales</b>	
Deficiencia	Se utiliza para mapear las mutaciones. Se expone a <i>D. melanogaster</i> a un compuesto y las proteínas son analizadas en una electroforesis comparándolas con las proteínas de una mosca silvestre. Cuando no se encuentra una banda en la electroforesis de las moscas expuestas con respecto a la silvestre significa que se encontró una deficiencia y por lo tanto <i>D. melanogaster</i> sufrió una mutación.
<b>Aberraciones cromosómicas</b>	
No disyunción	Se utiliza para determinar efectos de un compuesto en la segregación de cromosomas. Se basa en la alteración de los fenotipos de una craza dada.
<b>Reparación de ADN</b>	
Reparación-deficiencia	Sirve para observar el daño directo al ADN. Se utilizan organismos con deficiencia en reparación.

## 2.5 Mutación

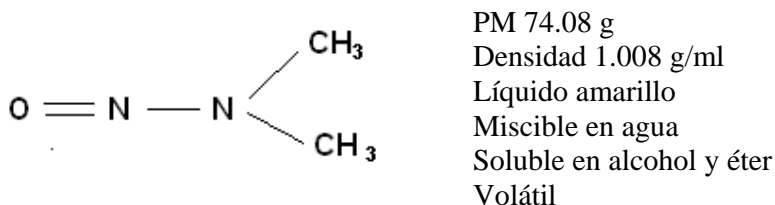
Una mutación es la modificación de una base nitrogenada en la secuencia del ADN de un gen [Avers, 1984]. Hay varios tipos de mutaciones dependiendo de la forma en que actúan: pueden ser letales, morfológicas, condicionales o mutaciones que afectan a la fisiología. Las mutaciones letales son las que provocan la muerte en algún punto de vida del organismo previo a la reproducción. Por ejemplo, el gen que hace que los perros salchicha tengan tal forma, al estar en homocigosis los cachorros nacen muertos. Las mutaciones morfológicas son las que presentan características externas visibles en el organismo, como los ojos blancos en *D. melanogaster*. La mutación condicional es la que depende del medio para expresarse, como algunas mutantes de bacterias, que dependiendo de la temperatura del medio pueden expresar la mutación o no expresarla [Johansson, *et al*, 2002]. Las mutaciones que afectan a la fisiología son aquellas que provocan un cambio en la bioquímica del organismo, un ejemplo en el ser humano es la hemofilia.

Las mutaciones se pueden inducir utilizando agentes mutagénicos. Por ejemplo, cambiando las bases al replicarse el ADN. Otra forma de inducir mutaciones es por la exposición a agentes alquilantes, estos agentes donan un  $\text{CH}_3$  o un  $\text{CH}_2\text{CH}_3$  a los grupos amino o ceto en los ácidos nucleicos. Otro agente son los rayos ultravioleta (UV), éstos son ondas electromagnéticas que producen la unión de los carbonos de timinas y citosinas adyacentes creando interacciones covalentes a una longitud de onda de 260 nm. El agente más usado para inducir mutaciones son las radiaciones iónicas como los rayos-X, que puede atravesar a las células y transformar las moléculas estables en radicales libres y iones reactivos o provocar reacciones químicas que pueden afectar directamente o indirectamente al ADN; también puede romper las cadenas de fosfatos y alterar la integridad de los cromosomas [Klug *et al*, 2006].

Las mutaciones se pueden confundir muchas veces con características fenotípicas no heredables, pero hay diferencias importantes entre estas dos: el componente genético y las formas de inducción son distintas (Weaver *et al*, 1997). La inducción del fenotipo parecido al efecto de las mutaciones fue estudiada por George Streisinger (1981), quién estudiando a los peces cebra descubrió que inyectando 10 ng de morfolino a huevos fertilizados, los peces presentaban un fenotipo parecido a la línea mutante *bona fide*, pero no podían heredar esta característica a la siguiente generación. Se les da el nombre de fenocopias a los organismos que presentan cambios originados por factores ambientales que inducen un fenotipo particularmente anormal que comunmente es determinado genéticamente [Weaver *et al*, 1997]. Estos cambios no afectan al ADN y por lo tanto no son heredables.

También hay que diferenciar entre la resistencia y las mutaciones que producen una mayor tolerancia a ciertos tóxicos. La resistencia, según Islas (2006), se define como la capacidad de un organismo para sobrevivir a la exposición a toxinas (sean naturales como los alcaloides, o sintéticos como los plaguicidas). Si se deja de estimular a los organismos con el tóxico se pierde la resistencia en las siguientes generaciones ya que no es una característica heredable, debido a que los organismos no fueron modificados genéticamente [Tamarin, 1996].

## 2.6 N-nitrosodimetilamina

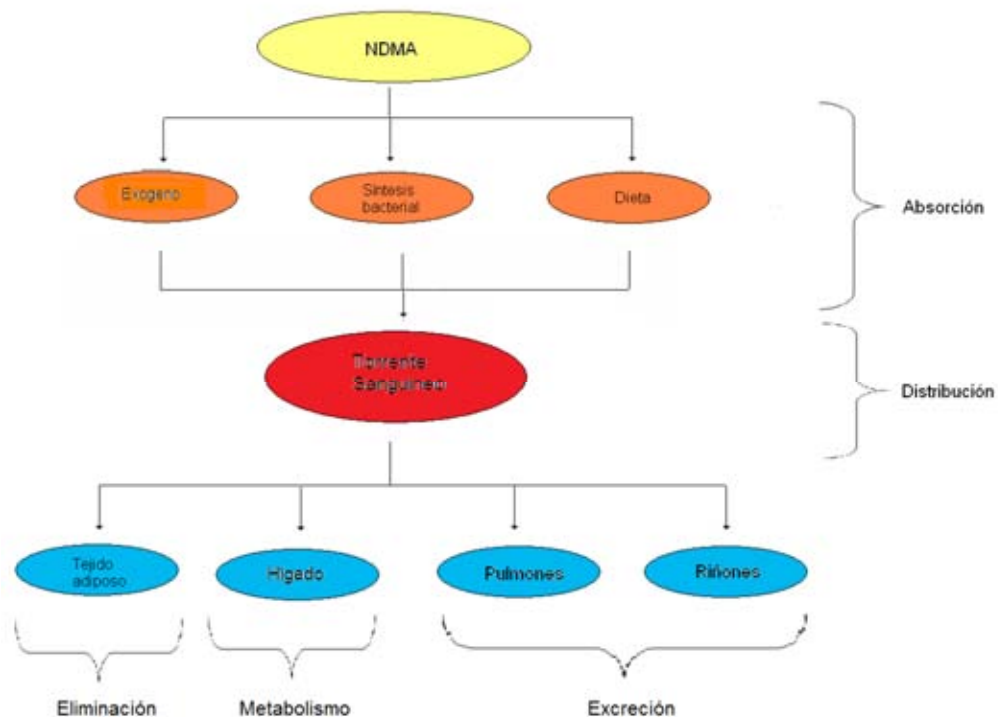


**Fig 3. N-nitrosodimetilamina (NDMA), fórmula, propiedades químicas y físicas [Muñoz, 1998].**

La N-nitrosodimetilamina (NDMA) es un compuesto alquilante monofuncional; es también un promutágeno que se utiliza en estudios de mutagénesis, (Fig. 3) [Smith *et al*, 1994. Fujita *et al*, 2001; Harrington, 1990]. Su actividad carcinogénica ha sido reportada en varios animales como ratones, conejos, peces y pájaros. Normalmente en ratas la exposición a la NDMA produce tumores en el hígado, estómago, riñón y en la faringe [Krull, *et al*, 2003].

Las vías en que el ser humano puede estar en contacto con la NDMA son tres: exógeno por medio de la biotransformación, síntesis bacteriana y por la dieta [Smith, 1994] (Fig. 4). De forma exógena puede ser inhalado; por ejemplo, se ha encontrado que un cigarrillo de tabaco contiene NDMA en concentraciones de 0.25 a 0.45 ng. Por síntesis bacteriana, primero entra al estómago dimetilamina (DMA) al ingerir por ejemplo pescado, vino y otros licores [Zeisel *et al*, 1986]; el DMA es un compuesto muy común e inocuo, pero las bacterias realizan una reducción del nitrato de la saliva y producen NDMA como se observó en el experimento realizado por Krull (2003), quien construyó un modelo que reproducía todas las condiciones del intestino humano, usó *Escherichia coli* para transformar 5 mM de dimetilamina (DMA) en NDMA y tomando como referencia otros estudios de cáncer en ratas, observó que la concentración de NDMA que se produjo en el modelo llegaba a las concentraciones que causan cáncer en el ser humano. La NDMA se puede consumir en la dieta diaria, principalmente se encuentra

en la carne roja cocida al horno, asada, a la parrilla y frita (la carne de oveja frita que se refrigera a 5°C contiene 1.3 µg de NDMA por Kg), también se puede hallar en el pescado (cocido a 150°C contiene 0.15 µg/Kg) y puerco (refrigerado a 5°C durante 2 días contiene 2.0 µg/Kg); en algunos saborizantes que se agregan a la comida y en algunas bebidas como el vino y la cerveza oscura (refrigerada a 5°C contiene 0.95 µg/L) [Smith *et al*, 1994. Jameson *et al*, 2002. Dashwood, 2002. Nagao, 1999; Yurchenko, 2006]].



**Fig 4. Absorción, distribución, metabolismo, eliminación y excreción del NDMA en el organismo.**

Smith (1994) realizó estudios en ratones inyectándoles NDMA con <sup>14</sup>C para identificar la cantidad desecheda por el organismo y observó por medio de espectroscopia la cantidad del tóxico que se recuperaba en la orina, excremento y



respiración; encontró que los ratones desecharon por la orina un 96%, por medio del excremento un 0.5%, de la respiración otro 0.5%, aunque también observó que pueden almacenarlo en los tejidos adiposos [Smith *et al*, 1994].

Como la NDMA es un promutágeno, en su biotransformación se producen metabolitos que incrementan la polaridad [Peña, 2001]. Esta biotransformación ocurre en dos fases (Fig 5). La primera fase ocurre por acción del citocromo P450 que se encuentra en la membrana del retículo endoplásmico, el cual está formado por dos proteínas, una reductasa y una hemoproteína que tiene actividad de oxigenasa. Esta fase es un conjunto de oxidaciones en las que se introduce un OH en el alfa-carbono de la NDMA, produciendo formaldehído e hidroximetil-metilnitrosamina. La NDMA entra en la enzima oxigenasa, en donde se encuentra su sitio activo, la reductasa transfiere un electrón al hierro reduciéndolo de (III) a (II), lo cual abre el sitio activo del O<sub>2</sub>, este entra al sitio activo, produciendo una hidroxilación al transferir un OH al CH<sub>3</sub> de la NDMA. Si la concentración de oxígeno es baja entonces el NADPH es el donador de electrones.

La segunda fase consiste en reacciones de conjugación no enzimáticas que ocurren en el citosol del retículo endoplásmico. Después de la hidroxilación, la NDMA se transforma en hidroximetil-metilnitrosamina y formaldehído, el primero se convierte en monometilnitrosamina y después en mutágeno. [Fujita *et al*, 2001. Peña, 2001]. Fujita (2001) introdujo el gen del citocromo P450 en cepas de *S. typhimurium* para que éstas pudieran biotransformar la NDMA como los mamíferos e hizo la prueba de AMES. Expuso la mitad de los cultivos bacterianos transformados a NDMA sin biotransformar y la otra mitad a NDMA biotransformada de la primera fase. Con este experimento comprobó el proceso de biotransformación de la NDMA.

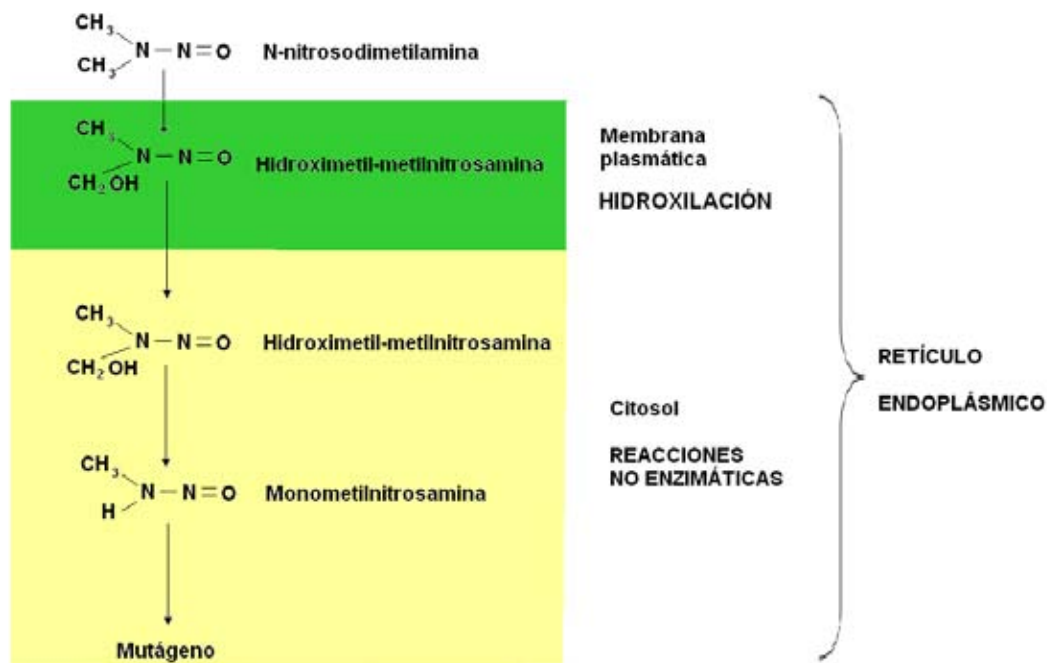


Fig 5. Biotransformación de la NDMA. (Modificado de Muñoz, 1998)

Otra forma de biotransformación de la NDMA es a través de la unión con el etanol. El etanol es un inhibidor del citocromo P450, por lo tanto el OH del citocromo P450 no se puede unir al alfa-carbono, por lo que este último se une al OH del etanol produciendo  $\text{CO}_2$ . Es la forma más común de exposición del ser humano al mutágeno ya que se ha visto que el consumo de NDMA y etanol a la vez aumenta el riesgo de cáncer en ratas. El ser humano consume ambos compuestos al fumar e ingerir alcohol simultáneamente aumentando su riesgo de contraer cáncer [Encell *et al*, 1996; Yoo, 1988; Anderson, 1986].

Se sabe que la NDMA interactúa covalentemente con el ADN produciendo aductos. En esta interacción la NDMA alquila a la guanina o a la timina formando  $O^6$ -alquildeoxiguanosina en el primer caso y  $O^4$ -alquiltimidina y  $O^2$ -alquiltimidina en el segundo caso [Tardiff, 1994]. Los aductos son considerados un paso importante en las mutaciones y el inicio del cáncer [Goto *et al*, 1999]. Lo anterior se ha demostrado en los

humanos y en algunos animales a través de inmunoensayos, como la técnica de ELISA. En esta técnica los anticuerpos se unen covalentemente a los aductos del ADN mostrando su existencia [Goto *et al*, 1999].

### 3. JUSTIFICACIÓN

En un experimento realizado para comparar el cambio en los valores característicos de diferentes biomarcadores de *D. melanogaster*, larvas de tercer estadio se expusieron por alimentación a NDMA utilizando diluciones sucesivas a partir de una concentración letal. Los adultos recobrados se contabilizaron para obtener el índice de sobrevivencia y la proporción de sexos. En la siguiente fase, machos tratados fueron cruzados con hembras no tratadas para determinar el efecto del tratamiento en la fertilidad y el número de hijos por macho tratado. El tratamiento indujo esterilidad total en los machos que fueron expuestos a concentraciones mayores a 0.234 mM del compuesto. De manera excepcional en uno de los experimentos se recobró progenie (1 y 4 machos, respectivamente) en dos concentraciones altas (1.04 y 2.5 mM). A partir de estos organismos se construyeron dos líneas de moscas, las cuales se denominaron CS1 y CS2 [Ramos *et al*, 2006]. Debido a que el rango de concentración en el que se obtuvieron estos organismos se separó considerablemente de la máxima concentración en la que se recobró progenie, se consideró necesario determinar si estos organismos pudieran ser mutantes inducidos por el tratamiento. En este trabajo se comparan el índice de sobrevivencia, la proporción sexual, el índice de fertilidad y el promedio de la progenie por macho de las cepas CS1 y CS2 con respecto a Canton-S como indicadores de diferencias entre las cepas.

#### **4. HIPÓTESIS**

Al seleccionar individuos sobrevivientes de una población expuesta a NDMA, se pueden recuperar individuos con posibles mutaciones. Si las cepas CS1 y CS2 tienen modificaciones en las características biológicas (e. i. índice de sobrevivencia, fertilidad, fecundidad o proporción sexual) respecto a la cepa silvestre CS, entonces podremos considerarlas cepas mutantes.

## **5. OBJETIVO**

En este trabajo se evaluó el efecto que tiene la NDMA en dos potenciales cepas mutantes (CS1 y CS2) y en una cepa silvestre (CS) de *D. melanogaster* para discernir si existen diferencias entre las cepas mutantes y la cepa silvestre en los índices de sobrevivencia, fertilidad, fecundidad y la proporción sexual.

## **6. MATERIALES Y MÉTODO**

### **6.1 Cultivo de *Drosophila melanogaster***

Las cepas CS (donada por el laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental, UNAM), CS1 y CS2 (donadas por el Banco de Moscas, UNAM) se mantuvo en un medio semisólido de harina de maíz (adicionado con azúcar, levadura, carragenina y agua) a temperatura ambiente (alrededor de 25°C) y humedad del 60%. Durante 5 días las moscas adultas fueron colocadas en frascos de vidrio para el apareamiento y ovoposición, pasado este tiempo se sacrificaron. Después de 10 días la nueva generación alcanzó la etapa adulta.

### **6.2 Preparación de la NDMA**

Las concentraciones de NDMA (SIGMA, N3632) a evaluar se obtuvieron a partir de disoluciones sucesivas de NDMA en agua destilada, tomando como referencia las utilizadas en experimentos previos. La NDMA se disolvió a temperatura ambiente. Posteriormente se distribuyó en los tubos homeopáticos que contenían 1g de medio instantáneo Carolina (Carolina Biological Supply Company, Fórmula 4-24), se agregaron 4.5 ml de la disolución de NDMA. Para cada ensayo las disoluciones se hicieron de nuevo.

### **6.3 Obtención de larvas**

Para sincronizar la edad de las moscas ( $\pm$  4 horas) se colocó un cultivo maduro de moscas de cada cepa durante 8 horas en medio fresco para coleccionar huevos, pasado este tiempo los adultos se retiraron. Cuando las larvas llegaron al tercer estadio (72 horas) se les administró el tratamiento subcrónico alimentándolas con NDMA por 48 horas.

Para trasladar las larvas de tercer estadio produciendo el menor estrés posible se adicionaron 20 ml de solución acuosa de sacarosa al 20% a los frascos donde se encontraban las larvas, esta solución produce que las larvas floten. Se decantaron los frascos a un embudo de separación de 400 ml y 4-5 mm de apertura. Se enjuagaron para retirar restos del medio de cultivo y se recibieron en una malla de nylon. Con la ayuda de una espátula se colocaron aproximadamente 100 larvas en los tubos ya preparados con la disolución a probar o con agua destilada. Las larvas permanecieron en este medio por 48 horas, puparon en el vial y los adultos se colectaron 5 días después.

#### **6.4 Procedimiento experimental**

Por sus características, el experimento se desarrolló en dos etapas: En la primera, se cuantificaron el índice de sobrevivencia y la proporción sexual y en la segunda etapa se estudiaron los índices de fertilidad y el promedio de la progenie por macho de las moscas expuestas (Fig 6).

Para la primera etapa del experimento se trataron a las larvas de las 3 cepas (Canton S, CS1 y CS2) de tercer estadio, exponiéndolas durante 48 horas al medio con las distintas concentraciones de NDMA. Al llegar a la edad adulta las moscas se retiraron de los tubos homeopáticos y se cuantificó el índice de sobrevivencia y la proporción sexual.

El índice de sobrevivencia (IS) se define por la relación:

$$IS = \frac{\textit{Total de moscas vivas por concentración}}{\textit{Total de moscas vivas en el Testigo}}$$

Este índice sirve para medir el nivel de toxicidad y ver la respuesta de los organismos expuestos a un tóxico [Arellano-Aguilar, 2002].



La proporción sexual (PSx) está definida como

$$PSx = \frac{\text{Número de machos de cada concentración}}{\text{Total de moscas de la concentración}}$$

La proporción sexual sirve para identificar los efectos de la NDMA sobre el organismo, aunque el índice de sobrevivencia no muestre diferencias con respecto al testigo.

En la segunda etapa se recuperaron de cada concentración de NDMA a los primeros 15 machos, con éstos se realizaron cruza individuales (un solo macho tratado con NDMA con una sola hembra virgen no tratada por tubo homeopático, por lo que se efectuaron 15 cruza por concentración en cada ensayo. Se determinó el número de hembras, el número de machos y el total de *D. melanogaster* adultos que sobrevivieron de la F<sub>1</sub>. Con la información anterior se obtuvieron el índice de fertilidad y el promedio de la progenie por macho.

El índice de fertilidad (IFr) se calcula con la siguiente fórmula

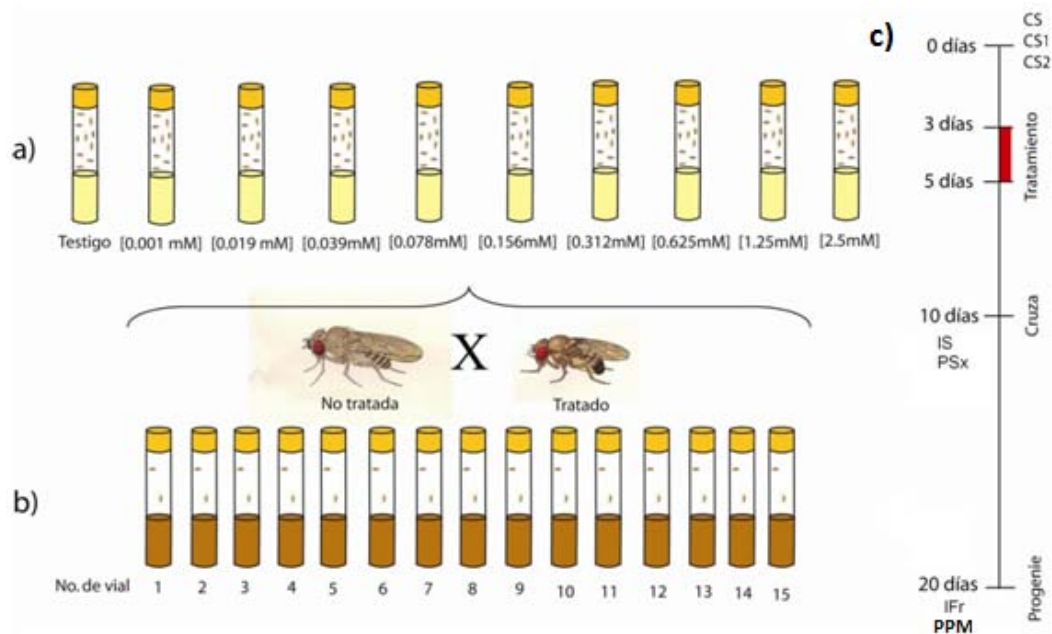
$$IFr = \frac{\text{Número de machos con progenie por concentración}}{\text{Número de machos sembrados}}$$

El índice de fertilidad permite identificar cambios producidos por la NDMA en la capacidad reproductiva de los organismos.

El promedio de la progenie por macho (PPM) se obtiene usando la relación

$$PPM = \frac{\text{Total de individuos de la } F_1 \text{ por concentración}}{\text{Número de machos fértiles por concentración}}$$

El promedio de la progenie por macho es un biomarcador dependiente de factores como citotoxicidad, metabolismo y daño en el material genético, entre otros [Herrera, 2005].



**Fig 6. a)** Exposición de las larvas de *Drosophila melanogaster* de tercer estadio, durante 48 horas a NDMA en medio Carolina. Se obtiene el índice de sobrevivencia y la proporción sexual. **b)** Cruza individual de hembras no tratadas por machos tratados (15 cruzas por concentración), se midió el índice de fertilidad y fecundidad. **c)** Línea del tiempo del experimento

#### 6.4.1 Primera parte del experimento.

En el experimento de donde se obtuvieron las cepas CS1 y CS2 se determinó que la cepa CS no sobrevive a concentraciones de NDMA mayores a 2.5 mM [Ramos, *et al*, 2007]. Tomando en cuenta este hecho se realizó un primer ensayo para estudiar la sobrevivencia de las cepas CS1 y CS2 a concentraciones de NDMA mayores a 2.5 mM, para lo anterior se utilizaron las siguientes concentraciones: testigo. 0.001 mM, 0.156 mM, 0.312 mM, 0.625 mM, 1.25 mM, 2.5 mM, 5 mM, 7.5 mM, 10 mM, 20 mM. A partir de los resultados de este ensayo se determinó que las concentraciones a utilizar en

los ensayos posteriores serían: testigo, 0.001, 0.019, 0.038, 0.078, 0.156, 0.312, 0.625, 1.25 y 2.5 mM.

#### **6.4.2 Segunda parte del experimento.**

Con las concentraciones determinadas a partir de la primera parte del experimento se realizaron tres ensayos más. En cada ensayo se realizó una repetición de la primera etapa del experimento. De cada ensayo se obtuvieron el índice de sobrevivencia y la proporción sexual correspondientes a cada concentración. Para cada concentración se calcularon los promedios del índice de sobrevivencia y la proporción sexual. Debido a que en algunas concentraciones el número de sobrevivientes no fue suficiente para realizar las 15 cruces de la repetición simultánea de la segunda etapa del experimento, los datos de los tres ensayos se trataron como si fueran parte de un solo experimento, esto es, se obtuvo el total de machos parentales por concentración, el total de individuos de la  $F_1$  por concentración y el total de machos estériles por concentración, con estos datos se calculó el índices de fertilidad y el promedio de la progenie por macho.

### **6.5 Análisis estadístico**

#### **6.5.1 Primera parte del experimento**

Para identificar las diferencias significativas entre las cepas en los índices de sobrevivencia, fertilidad, el promedio de la progenie por macho y proporción sexual se realizó una prueba de Kruskal-Wallis, se analizó el error estándar y en caso de ser necesario se aplicó un posttest Dunn. La prueba de Kruskal-Wallis permite identificar si existen diferencias significativas entre las cepas, pero no indica en donde se encuentran. El error estándar muestra si las cepas responden en forma diferente entre sí, a pesar de que no existan diferencias significativas entre las cepas. El posttest Dunn se aplica

cuando la prueba de Kruskal-Wallis confirma la existencia de diferencias significativas, señalando en que datos se encuentran estas diferencias.

### **6.5.2 Segunda parte del experimento**

Dado que se realizaron tres ensayos y en la primera etapa de cada ensayo se hizo una repetición, se aplicó una prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov para determinar si los índices de sobrevivencia, fertilidad, el promedio de la progenie por macho y la proporción sexual presentan una distribución normal. La prueba Kolmogorov-Smirnov confirmó que el índice de sobrevivencia y la proporción sexual, así como el promedio de la progenie por macho presentaron una distribución normal, por su parte el índice de fertilidad es una variable de tipo binomial.

Como el índices de sobrevivencia, la proporción sexual y el promedio de la progenie por macho tienen una distribución normal se aplicó una ANOVA con  $p < 0.05$  para determinar las diferencias significativas existentes entre las tres cepas. Para el índice de fertilidad se utilizó una prueba de  $\chi^2$  con  $p < 0.05$  para determinar las diferencias significativas entre las tres cepas. En los casos en que hubo diferencias significativas se aplicó una prueba de Tukey, la cual determina entre qué datos se encuentran estas diferencias.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Primera parte del experimento

#### 7.1.1 Índice de sobrevivencia de los parentales

Las moscas no sobrevivieron a concentraciones mayores a 1.25 mM de NDMA, salvo la cepa CS en la concentración 7.5 mM. La prueba de Kruskal-Wallis ( $H=0.06$ ,  $p=0.97$ ) no mostró diferencias significativas para la sobrevivencia, pero la gráfica de sobrevivencia (Fig. 7) se puede separar en dos partes con respecto a la tendencia del índice de sobrevivencia: la primera empieza en el testigo hasta 0.156 mM donde la sobrevivencia de CS1 fue mayor que CS y CS2 y en la segunda parte (inicia con 0.156 mM hasta 1.25 mM) donde el índice de sobrevivencia para CS2 fue mayor que CS y CS1. En el Cuadro 3 se observa que el número de moscas que se obtuvo en el testigo es menor en CS (65 moscas) que en CS1 (121 moscas) y CS2 (126 moscas), esto muestra un posible cambio en el comportamiento de las cepas. Por su parte los errores estándares para la misma concentración fueron mayores en CS1 que en CS y CS2.

**Cuadro 3. Índice de sobrevivencia (IS) de la primera parte del experimento. Se presenta el error estándar (e.e.) de cada concentración.**

NDMA (mM)	CS			CS 1			CS2		
	Número de sobrevivientes	IS	e.e.	Número de sobrevivientes	IS	e.e.	Número de sobrevivientes	IS	e.e.
Testigo	65	1.000	0	121	1.000	0	126	1.000	-
0.001	71	1.092	0.020	199	1.645	0.137	114	0.905	0.020
0.156	70	1.077	0.016	144	1.190	0.041	114	0.905	0.020
0.315	63	0.969	0.007	124	1.025	0.005	134	1.063	0.014
0.625	43	0.700	0.064	77	0.636	0.078	109	0.865	0.029
1.25	23	0.354	0.138	17	0.140	0.183	52	0.413	0.125
2.5	0	0	0	0	0	0	1	0.008	0.211
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7.5	1	0.015	0.210	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0

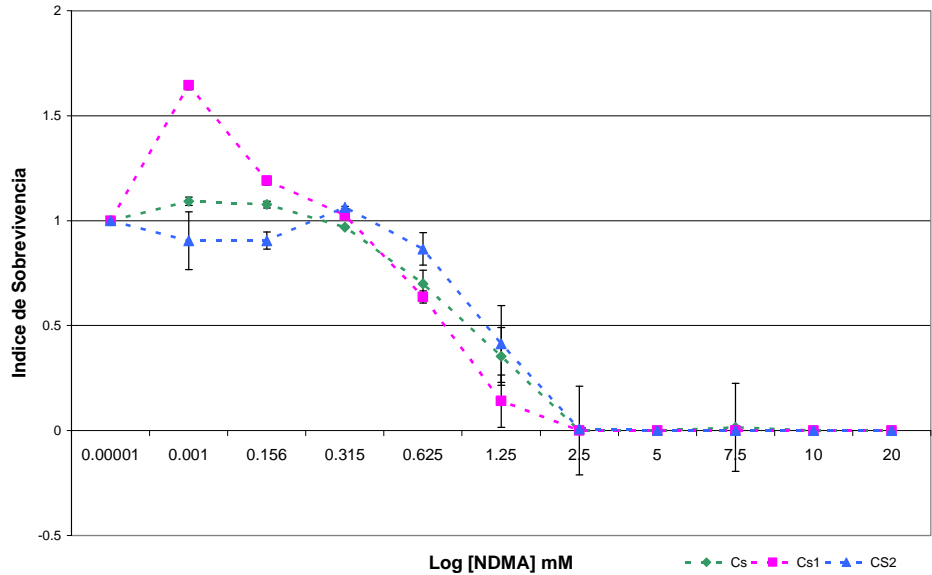


Fig. 7. Índice de supervivencia de la primera parte del experimento.

### 7.1.2 Supervivencia y proporción sexual de la progenie

Al analizar el número de moscas de la progenie se observó que para las tres cepas existe una disminución drástica entre las concentraciones 0.001 mM y 0.156 mM, siendo aún mayor en la cepa CS2 (Fig. 8), además las moscas no sobrevivieron en concentraciones mayores a 0.156 mM de NDMA.

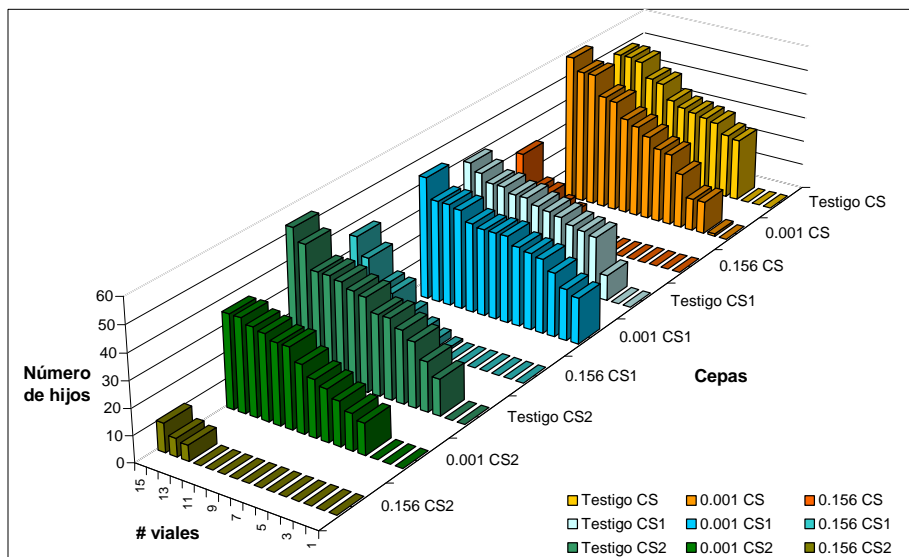
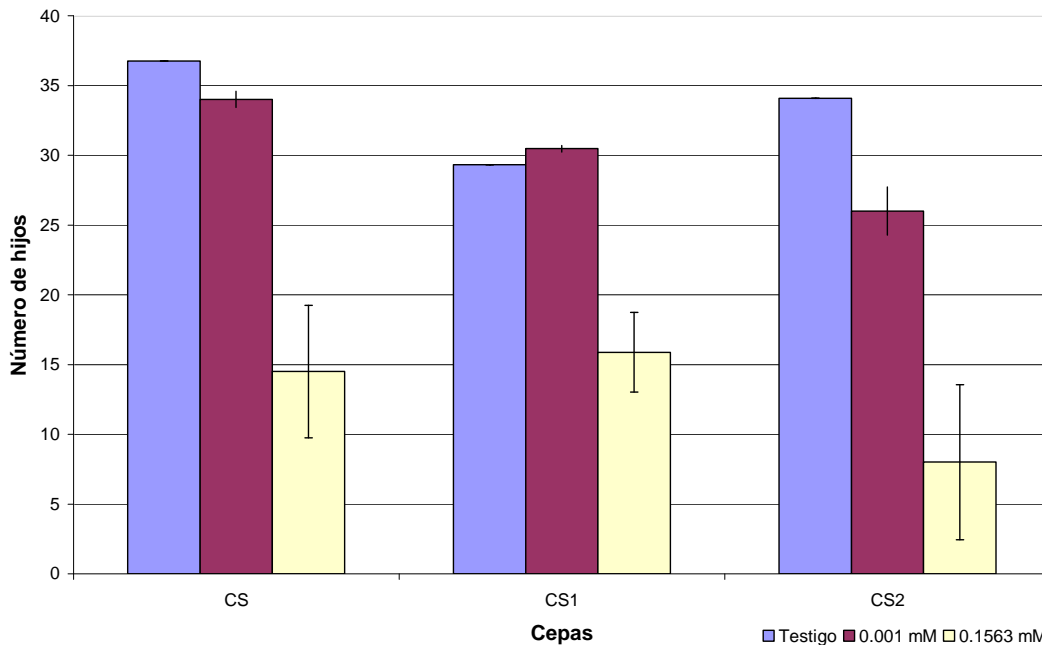


Fig 8. Progenie que se obtuvo por cada macho en cada concentración de la primera parte del experimento donde se cruzó un macho tratado con una hembra virgen no tratada. Se observa de manera clara la caída drástica en el número de la progenie entre las concentraciones 0.001 y 0.156 mM en las tres cepas.

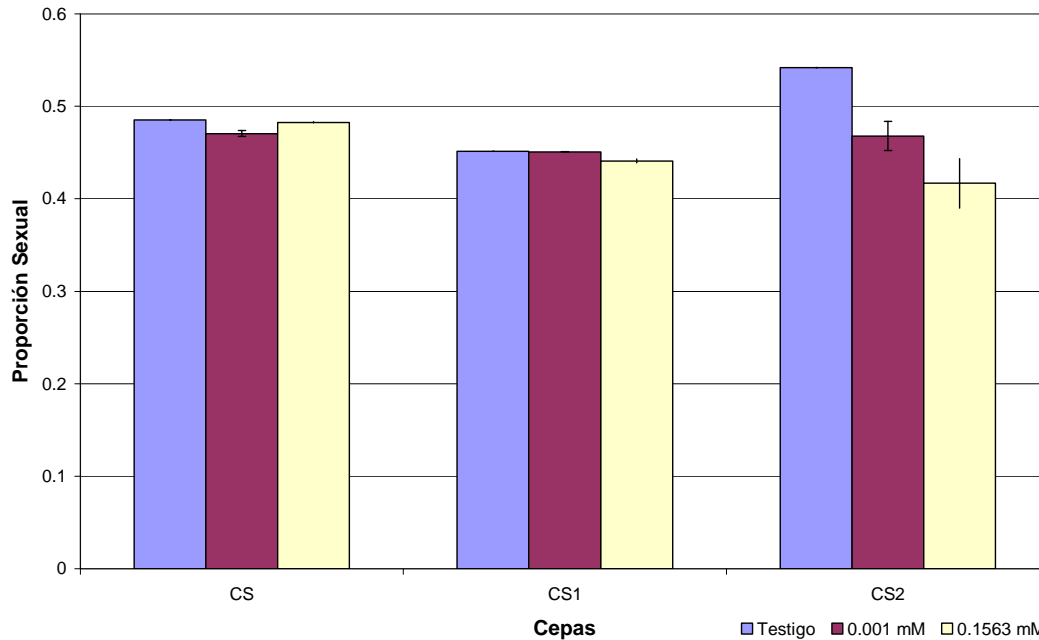
La prueba de Kruskal-Wallis aplicada a el promedio de la progenie por macho (Fig. 9) no reveló diferencias significativas ( $H=0.97$ ,  $p=0.62$ ). Sin embargo es posible observar determinados comportamientos, por ejemplo en la concentración 0.156 mM, el promedio de la progenie por macho de las tres cepas disminuyó de manera considerable con respecto al testigo y 0.001 mM. Además en el testigo el promedio de la progenie por macho fue mayor en la cepa CS que en CS1 y CS2. En las cepas CS y CS2 conforme aumentó la concentración de NDMA, disminuyó el promedio de la progenie por macho, mientras que en la cepa CS1 ésta alcanzó su máximo en la concentración 0.001 mM.



**Fig. 9. Promedio de la progenie por macho de la primera parte del experimento, donde se cruzó un macho tratado con una hembra virgen no tratada.**

Aunque la prueba de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas en la proporción sexual entre las cepas ( $H=3.2$ ,  $p=0.2$ ), se puede observar que en la cepa CS2 la proporción fue mayor que 0.5 y disminuyó conforme aumentaba la concentración

hasta 0.42 (Fig 10). Mientras que en las cepas CS y CS1 la proporción sexual se mantuvo alrededor del mismo valor (0.48 para CS y 0.45 para CS1).



**Fig. 10. Proporción sexual de machos de la primera parte del experimento, donde se cruzó un macho tratado con una hembra virgen no tratada. Sólo se encontró progenie en las dos concentraciones menores.**

## 7.2 Segunda parte del experimento

Se encontraron diferencias significativas en el índice de sobrevivencia (ANOVA,  $F=18.33$ ,  $p=0.0001$ ) y proporción sexual (ANOVA  $F=3.54$ ,  $p=0.03$ ) en CS2 en las concentraciones 1.25 mM y 2.5 mM de NDMA con respecto a su concentración Testigo (Cuadros 4 y 5). Al comparar el promedio de la progenie por macho, entre las cepas se encontraron diferencias significativas en CS1 y CS2 con respecto a CS (ANOVA  $F=3.56$ ,  $p=0.05$ ) en la concentración 0.078 mM.



**Cuadro 4. Prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) en el índice de sobrevivencia (IS) de la cepa CS2 de *Drosophila melanogaster*. Las diferencias significativas en las moscas expuestas a las concentraciones 1.25 mM y 2.5 mM de NDMA se indican en rojo.**

NDMA (mM)	Testigo	0.001	0.019	0.038	0.078	0.156	0.312	0.625	1.25	2.5
Testigo		-0.177	-0.177	-0.143	-0.053	0.057	0.173	-0.116	0.470	0.965
0.001	-0.177		-0.0004	0.034	0.123	0.234	0.350	0.060	0.646	1.141
0.019	-0.177	-0.0004		0.034	0.124	0.234	0.350	0.061	0.647	1.142
0.038	-0.143	0.034	0.034		0.089	0.200	0.316	0.027	0.613	1.108
0.078	-0.053	0.123	0.124	0.089		0.110	0.227	-0.063	0.523	1.018
0.156	0.057	0.234	0.234	0.200	0.110		0.116	-0.173	0.413	0.908
0.312	0.173	0.350	0.350	0.316	0.227	0.116		-0.289	0.297	0.792
0.625	-0.116	0.060	0.061	0.027	-0.063	-0.173	-0.289		0.586	1.081
1.25	0.470	0.646	0.647	0.613	0.523	0.413	0.297	0.586		0.495
2.5	0.965	1.141	1.142	1.018	1.018	0.908	0.792	1.081	0.4951	

**Cuadro 5. Prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) en la Proporción sexual (PSx) de la cepa CS2 de *Drosophila melanogaster*. Las diferencias significativas en las moscas expuestas a las concentraciones 1.25 mM y 2.5 mM de NDMA se indican en rojo.**

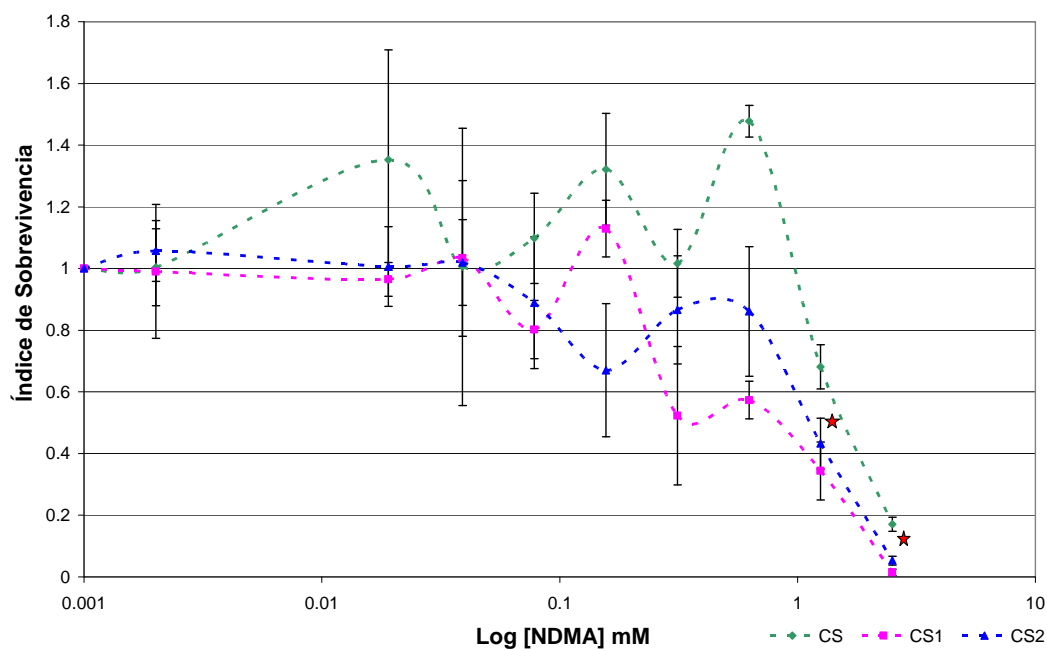
NDMA (mM)	Testigo	0.001	0.019	0.038	0.078	0.156	0.312	0.625	1.25	2.5
Testigo		0.014	0.090	0.029	0.037	-0.018	0.049	-0.012	-0.058	0.536
0.001	0.014		0.076	0.015	0.023	-0.031	0.035	-0.026	-0.072	0.522
0.019	0.090	0.076		-0.061	-0.053	-0.107	-0.041	-0.102	-0.148	0.447
0.038	0.029	0.015	-0.061		0.008	-0.046	0.020	-0.041	-0.087	0.507
0.078	0.037	0.023	-0.053	0.008		-0.054	0.012	-0.049	-0.095	0.499
0.156	-0.018	-0.031	-0.107	-0.046	-0.054		0.066	0.005	-0.041	0.554
0.312	0.049	0.035	-0.041	0.020	0.012	0.066		-0.061	-0.107	0.487
0.625	-0.012	-0.026	-0.102	-0.041	-0.049	0.005	-0.061		-0.046	0.548
1.25	-0.058	-0.072	-0.148	-0.087	-0.095	-0.041	-0.107	-0.046		0.595
2.5	0.536	0.522	0.447	0.507	0.499	0.554	0.487	0.548	0.595	

### 7.2.1 Índice de sobrevivencia de los parentales.

En las moscas expuestas a concentraciones mayores a 0.625 mM se observó una disminución en el índice de sobrevivencia de las tres cepas (Fig. 11). El índice de sobrevivencia en general fue mayor en la cepa CS que en las cepas CS1 y CS2. En concentraciones mayores a 0.312 mM el índice de sobrevivencia de CS1 fue menor que para CS y CS2.

**Cuadro 6. Índice de sobrevivencia de los parentales. Las diferencias significativas de la cepa CS2 en las concentraciones 1.25 mM y 2.5 mM se indican en rojo. N es el número total de moscas de los tres ensayos.**

[NDMA] (mM)	CS		CS1		CS2	
	N	IS	N	IS	N	IS
Testigo	148	1.00	218	1.00	235	1
0.001	147	1.00	205	0.99	251	1.06
0.019	195	1.35	207	0.96	243	1.01
0.039	143	1.01	211	1.03	249	1.02
0.078	163	1.10	168	0.80	207	0.89
0.156	193	1.32	230	1.13	191	0.67
0.312	152	1.02	100	0.52	194	0.87
0.625	218	1.48	123	0.57	208	0.86
1.25	101	0.68	69	0.34	107	0.43
2.5	25	0.17	3	0.01	12	0.05



**Fig 11. Índice de sobrevivencia (IS) de tres cepas de *Drosophila melanogaster* (CS, CS1 y CS2), expuestas a diferentes concentraciones de NDMA. Las diferencias significativas de la cepa CS2 en las concentraciones 1.25 mM y 2.5 mM se indican con una estrella.**

### 7.2.2 Proporción sexual de los parentales

Antes de la concentración 0.625 mM las barras de error de la proporción sexual de las cepas CS2 y CS1 incluyeron al valor 0.5, lo cual se esperaba ya que la proporción de machos y hembras en *D. melanogaster* es alrededor del 50%. Después de esta concentración las tres cepas se alejaron del 0.5 alcanzando su máxima separación en la concentración 2.5 mM mostrando un efecto causado por la NDMA (Fig. 12).

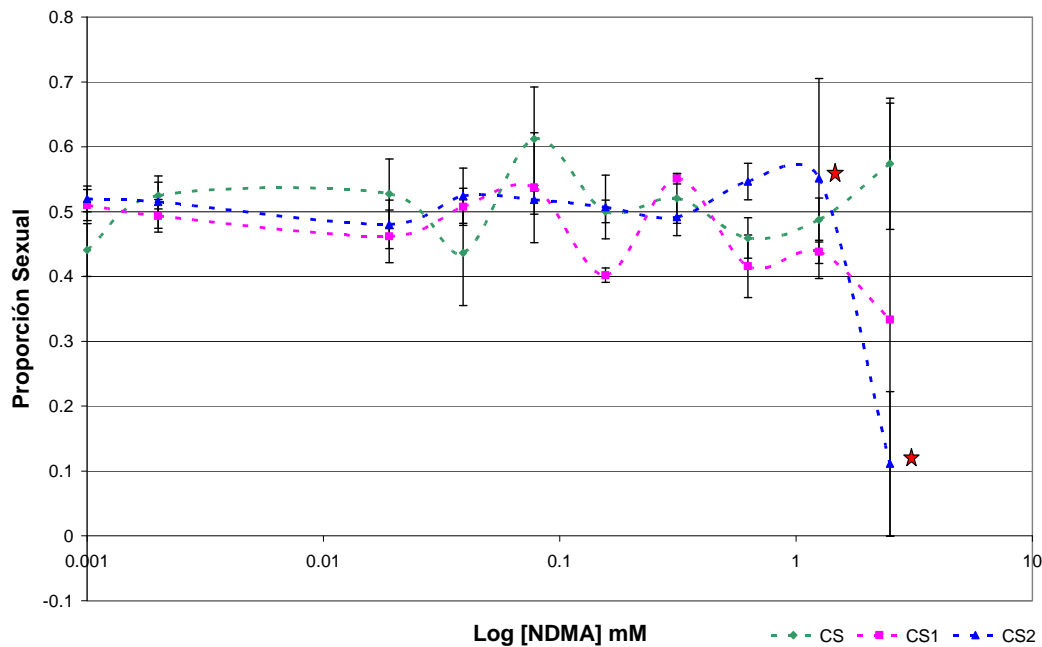


Fig 12. Proporción sexual (PSx) de tres cepas de *Drosophila melanogaster*. Las diferencias significativas de la cepa CS2 en las concentraciones 1.25 mM y 2.5 mM se indican con una estrella.

### 7.2.3 Índice de fertilidad

En el índice de fertilidad no se encontraron diferencias significativas entre las cepas ( $\chi^2$ ,  $p=0.05$ ). Un aspecto interesante es que a partir de la concentración 0.156 mM se observaron huevos que no se desarrollaron en todas las cepas, sin embargo no se consideran huevos letales dado que no presentaban la característica propia de estos: un corion de color café.

En el cuadro 7 y la figura 13 se puede observar que el índice de fertilidad del testigo de la cepa CS fue mayor que los correspondientes a CS1 y CS2. Analizando el

comportamiento de la gráfica del índice de fertilidad de la cepa CS se puede observar que en la concentración 0.001 mM de NDMA este índice fue más alto que en el testigo. A partir del testigo el índice disminuyó hasta 0.156 mM. Después de este valor la gráfica muestra un aumento drástico, con lo que el índice alcanzó nuevamente un valor mayor al testigo en la concentración 0.312 mM. A partir de aquí el índice disminuyó nuevamente hasta 2.5 mM. El índice de fertilidad de la cepa CS2 se comportó muy parecido a CS pero la disminución que tuvo CS en 0.156 mM, CS2 la presentó en los organismos expuestos a 0.078 mM. Además, en la cepa CS2 sólo en la concentración 0.019 mM el índice de fertilidad fue mayor que el correspondiente al testigo.

En el caso del índice de fertilidad de CS1 primero se observó disminución en el intervalo comprendido entre el testigo y la concentración 0.156 mM. Después de esta concentración hubo un aumento en la concentración 0.312 mM y luego disminuyó nuevamente.

**Cuadro 7. Índice de fertilidad de CS, CS1 y CS2**

<b>NDMA (mM)</b>	<b>CS</b>	<b>CS1</b>	<b>CS2</b>
Testigo	0.867	0.711	0.622
0.001	0.956	0.356	0.556
0.019	0.733	0.511	0.689
0.039	0.578	0.400	0.511
0.078	0.578	0.378	0.178
0.156	0.244	0.156	0.267
0.312	0.889	0.356	0.022
0.625	0.044	0.067	0.022
1.25	0	0	0.022
2.5	0	0	0

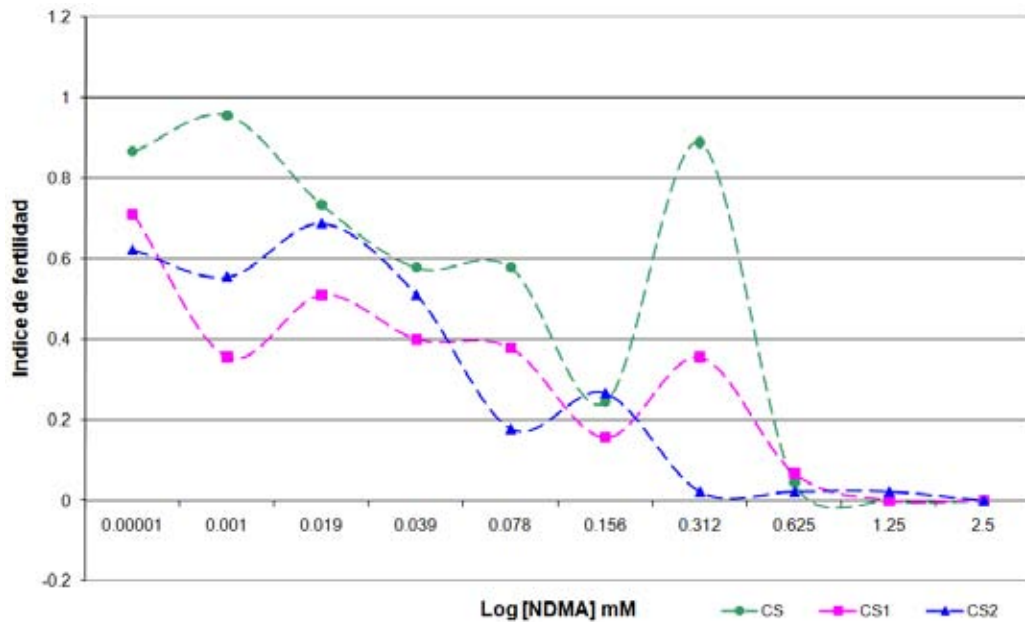


Fig 13. Fertilidad de los machos tratados con NDMA. Progenie de la cruce de hembras virgenes no tratadas con machos tratados.

#### 7.2.4 Promedio de la progenie por macho

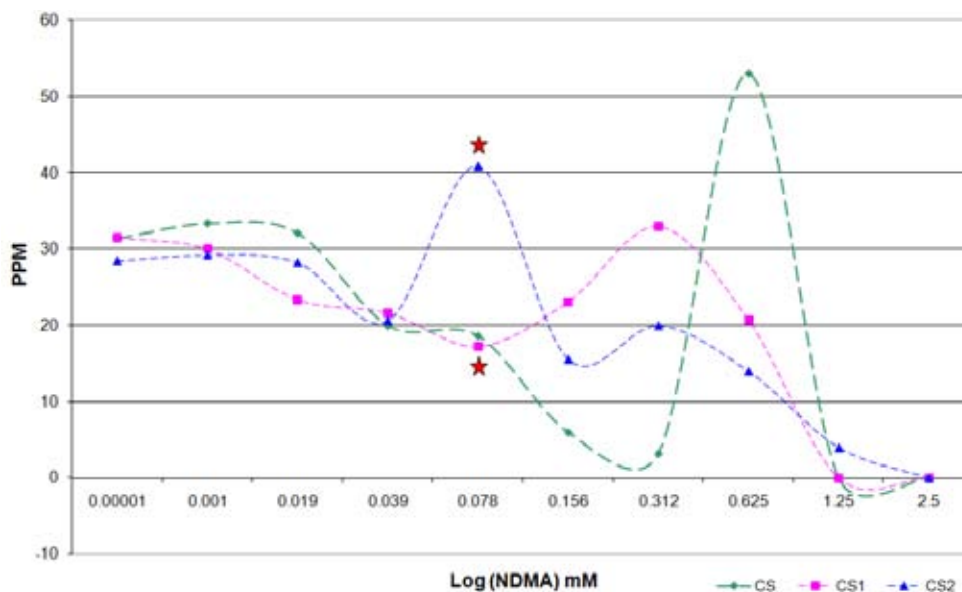
Al comparar el promedio de la progenie por macho sólo se encontraron diferencias significativas en CS1 y CS2 con respecto a CS (ANOVA  $F= 3.56$ ,  $p=0.005$ ) en la concentración 0.078 mM.

El promedio de la progenie por macho del testigo de CS1 fue mayor que los correspondientes a los testigos de CS y CS2. Particularmente en la cepa CS se observó un aumento del promedio en la concentración 0.625 mM, este aumento fue cercano al doble con respecto al promedio del testigo. Las cepas expuestas a 2.5 mM de NDMA fueron estériles (Cuadro 8).

**Cuadro 8. Promedio de la progenie por macho y número de machos con progenie de las tres cepas de *D. melanogaster*. Las diferencias significativas en la concentración 0.078 mM se indican en rojo.**

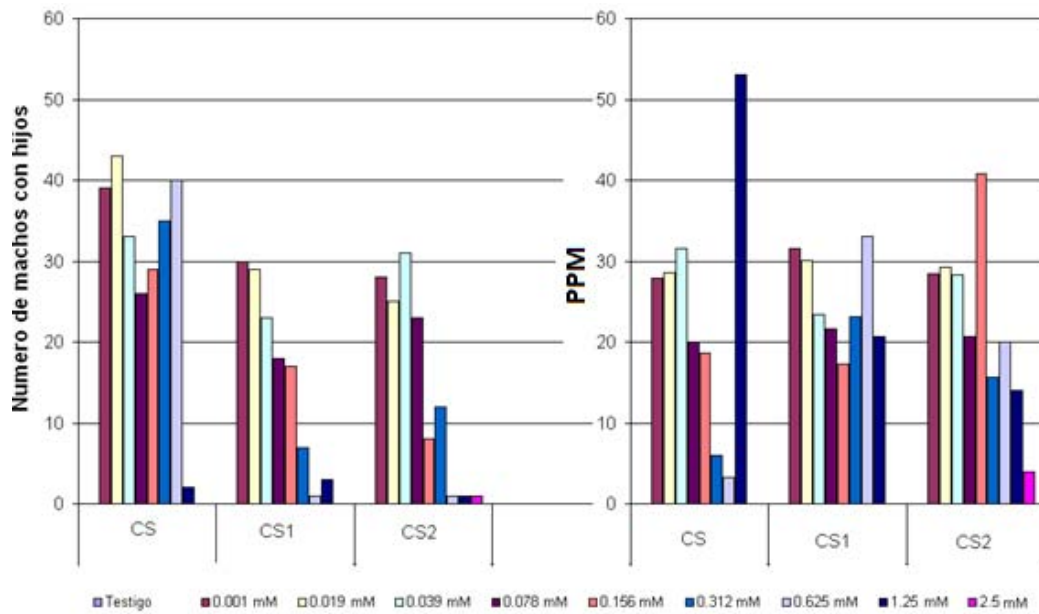
NDMA (mM)	CS		CS1		CS2	
	PPM	Número de machos con progenie	PPM	Número de machos con progenie	PPM	Número de machos con progenie
Testigo	27.85	39	31.53	30	28.50	28
0.001	28.63	43	30.03	29	29.24	25
0.019	31.58	33	23.39	23	28.26	31
0.039	19.96	26	21.67	18	20.65	23
0.078	18.62	29	17.38	17	40.88	8
0.156	6.00	35	23.10	7	15.58	12
0.312	0.47	40	33.00	1	20.00	1
0.625	53.00	2	20.67	3	14.00	1
1.25	0	0	0	0	4	1
2.5	0	0	0	0	0	0

Al graficar los promedios de la progenie por macho se aprecia que las cepas se comportaron de manera distinta. En la gráfica sobresalieron dos picos en las concentraciones 0.078 mM y 0.625 mM, en la primera sobresalió la CS2 y en la segunda sobresalió CS, en particular el comportamiento en la concentración 0.078 mM fue consistente con el resultado dado por ANOVA. A partir de la concentración 1.25 mM el promedio de la progenie por macho disminuyó hasta llegar a cero. (Fig. 14).



**Fig 14. Promedio de la progenie por macho de los machos tratados con NDMA. Las diferencias significativas en la concentración 0.078 mM se indican con una estrella.**

Es interesante mencionar que al hacer el análisis de datos de los machos con progenie, se observó que en las últimas concentraciones (especialmente en CS) los machos tuvieron en promedio más hijos que en el testigo y en la última concentración ninguna cepa tuvo progenie (Fig. 15).



**Fig 15. Promedio de la progenie por macho y número de machos con hijos. Datos obtenidos de la cruce de un macho tratado por una hembra virgen no tratada.**

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Primera parte del experimento

El primer punto sobresaliente que se obtuvo de la primera parte del experimento fue la sobrevivencia de CS. Se recuperaron los valores de sobrevivencia reportados anteriormente en el Laboratorio de Toxicología Genética y Ambiental de la Facultad de Ciencias, UNAM para las concentraciones: testigo, 0.001, 0.0098, 0.0195, 0.0391, 0.0781, 0.1563, 0.2344, 0.3125, 0.4688, 0.625, 0.8325, 1.04, 1.25, 1.5, 2.5, 5 mM [Ramos *et al*, 2006].

La ausencia de diferencias significativas al utilizar concentraciones mayores a las de experimentos anteriores indicó que las cepas CS1 y CS2 no muestran mayor resistencia al tratamiento que las moscas de la cepa CS.

Estos resultados son similares a los obtenidos previamente, en los que la cepa CS no sobrevive a concentraciones mayores a 2.5 mM de NDMA, lo cual es congruente con la  $LC_{50}$  de esta cepa, cuyo valor se encuentra entre 0.6 y 0.8 mM de NDMA [Ramos, *et al*, 2006]. Aunque no se han establecido los valores de  $LC_{50}$  para las cepas CS1 y CS2, se puede observar que estas cepas se comportan de manera similar.

El comportamiento encontrado en el índice de sobrevivencia en la concentración 7.5 mM se debe a que sólo sobrevivió un individuo, por lo cual el índice de sobrevivencia es muy bajo (0.015) y su desviación estándar es 14 veces mayor (0.210). La explicación más probable para la sobrevivencia de esta mosca a tan altas concentraciones de NDMA se encuentra en la variabilidad de los organismos, ésta permite entender por qué en una población no todas las moscas tienen las mismas características ni responden igual a la NDMA.

El índice de sobrevivencia de la cepa CS1 entre las concentraciones 0.001 y 0.019 mM de NDMA mostró una caída abrupta. Esta caída es interesante porque señala



un comportamiento que la toxicología ha empezado a estudiar recientemente: los efectos de concentraciones bajas de un genotóxico en los organismos. En este trabajo se tiene que, al ser baja la concentración de NDMA (0.001 mM) su efecto sobre las moscas aumenta. De acuerdo con Ramos (2006) una vez que la NDMA se ha distribuido en el organismo produce estrés, puede producir un cambio en el metabolismo de las moscas y por lo tanto logran sobrevivir más que en el testigo. Hasta hace poco sólo se estudiaban concentraciones altas pensando que de esa manera se observarían los efectos del genotóxico, pero cada vez más se han comenzado a estudiar concentraciones bajas para observar los efectos del tóxico como ocurre en la cepa CS1 [Ramos *et al*, 2006. Ledezma, 2006].

La observación de que los errores estándares del índice de sobrevivencia de CS1 fueron mayores que los de las cepas CS y CS2 indica que existe mayor heterogeneidad en la respuesta a la NDMA en la cepa CS1. Lo anterior confirma que se necesita una muestra mayor para establecer de manera más confiable la respuesta de las cepas.

El número de moscas sobrevivientes en la F<sub>1</sub> del testigo de CS (65 moscas) fue la mitad del correspondiente a los testigos de las cepas CS1 (121 moscas) y CS2 (126 moscas). Dado que las cepas CS1 y CS2 se obtuvieron al exponer a *D. melanogaster* silvestre a NDMA [Ramos *et al*, 2006], lo anterior sugiere que en ausencia de NDMA estas cepas responden distinto con respecto a CS.

## **8.2 Segunda parte del experimento**

Las diferencias significativas en el índice de sobrevivencia y proporción sexual en CS2 mostraron que hay relación entre estos, ya que los dos exponen una respuesta a la toxicidad en las mismas concentraciones (1.25 y 2.5 mM de NDMA).

En las moscas expuestas a concentraciones mayores a 0.625 mM de NDMA se observó una disminución en el índice de sobrevivencia de las tres cepas, esto es debido a que la  $LC_{50}$  en CS empieza en 0.6 mM y posiblemente las cepas CS1 y CS2 tienen un  $LC_{50}$  muy cercano a este valor. Particularmente para CS2 lo anterior es plausible porque la comparación del índice de sobrevivencia se hizo entre diferentes concentraciones para la misma cepa, encontrando diferencias significativas en las concentraciones 1.25 y 2.5 mM de NDMA.

El índice de sobrevivencia en general fue mayor en la cepa CS que en las cepas CS1 y la CS2, esto sugiere que el metabolismo de estas últimas es diferente con respecto a CS. Este resultado es representativo porque se compararon las cepas entre sí y no sólo entre las concentraciones de cada cepa, además es el promedio de 3 ensayos y sus repeticiones [Vogel, *et al.* 1987].

El índice de sobrevivencia en ninguna concentración utilizada en la segunda parte del experimento fue igual a cero (Cuadro 6), esto es congruente con los resultados reportados anteriormente [Ramos, *et al.* 2006]. Si bien en la primera parte del experimento no se observó este comportamiento aunque el número de organismos recobrados fue baja (en la concentración 2.5 mM sólo la cepa CS2 tuvo un índice de sobrevivencia distinto a cero, 0.008), en la segunda parte este comportamiento se manifiesta claramente gracias a que se realizaron más ensayos y se pudo recuperar más progenie. Por lo tanto los índices de sobrevivencia de la concentración 2.5 mM en la segunda parte fueron de 0.17 para la cepa CS, 0.01 para la cepa CS1 y 0.05 para la cepa CS2.

Antes de la concentración 0.625 mM las barras de error de la proporción sexual de las cepas CS1 y CS2 incluyeron al valor 0.5, esto indica que en estas concentraciones no hubo un efecto en la proporción de machos. Después de la concentración 0.625 mM

la proporción sexual se alejó de 0.5, esto refleja un daño del NDMA en las moscas. La cepa CS tuvo una proporción de machos mayor a 0.5 mientras que la cepa CS1 tuvo una proporción de 0.31 y la cepa CS2 de 0.01. Esto muestra que a altas concentraciones las cepas CS1 y CS2 se comportan diferente a la cepa CS, dando como resultado un número menor de machos en las primeras dos cepas.

En el cuadro 7 y la figura 13 se puede observar que el índice de fertilidad del testigo de la cepa CS fue mayor que los correspondientes a CS1 y CS2. Esto muestra que en la cepa CS hubo más machos estériles en ausencia de NDMA que en las cepas CS1 y CS2.

En la figura 13 se observa que los índices de fertilidad de las cepas CS y CS1 en la concentración 0.312 mM mostraron un aumento, pero CS1 aumenta menos que CS. Esto sugiere que el metabolismo de CS1 podría ser diferente al de CS. El hecho de que la cepa CS2 no mostró un aumento en la concentración 0.312 mM sugiere que el metabolismo de esta cepa es distinto a los de las cepas CS y CS1.

Para la cepa CS2 se observó que sólo en la concentración 0.019 mM el índice de fertilidad fue mayor que el correspondiente al testigo. Esto indica que hubo menos machos estériles que en el testigo. Esto puede deberse a que es una concentración baja y produce un mayor efecto (discutido anteriormente en la sección 8.1) [Ramos, 2007]. De lo anterior se sigue que la respuesta al estrés producido por la NDMA es distinta en la cepa CS2 con respecto a la respuesta de la cepa CS. En el caso del índice de fertilidad de CS1 se observó una disminución en el intervalo comprendido entre el testigo y la concentración 0.156 mM. Este es un comportamiento muy parecido al de la cepa CS, por lo tanto las cepas CS y CS1 responden de manera similar al estrés generado por la NDMA. Los índices de fertilidad de las cepas CS y CS1 tienen una respuesta lineal

como se reporta en la toxicología clásica, a mayor concentración mayor daño y por lo tanto un aumento en el número de machos estériles.

Al comparar el promedio de la progenie por macho sólo se encontraron diferencias significativas en CS1 y CS2 con respecto a CS en la concentración 0.078 mM. Porque en esta concentración la progenie de CS1 y CS2 presentó una mayor homogeneidad que la cepa CS.

El promedio de la progenie por macho del testigo de CS1 es mayor que en los testigos de CS y CS2. Esto indica que CS1 tiene más progenie en condiciones normales que CS y CS2.

En la cepa CS el promedio de la progenie por macho de la concentración 0.625 mM presentó un aumento de casi el doble con respecto al testigo, dado que ANOVA no presentó diferencias significativas en esta concentración, este hecho pudo ser producido por condiciones que no pueden ser evaluados en este trabajo. En la cepa CS2 el promedio de la progenie por macho presentó un aumento similar al descrito en la concentración 0.078 mM y ANOVA indica la existencia de diferencias significativas, lo que señala que la cepa CS2 se comporta de manera diferente con respecto a CS.

Los machos de las tres cepas expuestas a 2.5 mM de NDMA son estériles (Cuadro 8) ya que las cruza se hicieron con una hembra no tratada y un macho tratado. Esto confirma los resultados reportados por Ramos (2006).

Es interesante mencionar que al hacer el análisis de datos de los machos con progenie, se observó que en las últimas concentraciones (especialmente en CS) los machos tienen en promedio más hijos que en el testigo. Esto puede deberse a que las altas concentraciones a las que están expuestas las moscas generan estrés en las mismas, pudiendo inducir cambios en el metabolismo que les permiten sobrevivir [Ramos, 2006. García, 2006].

En la Sección 7.2.3 se reporta la aparición de los huevos que no se desarrollaron. Una posible causa para la aparición de estos huevos es la infertilidad del macho, los machos de este tipo sólo estimulan a las hembras para ovopositar. Bloch (2006) observó que para que las hembras ovopositen no es necesario que ocurra la fertilización, por lo que los huevos no tienen la carga genética necesaria para desarrollarse [Bloch, *et al*, 2006]. Los factores que pueden provocar esterilidad en los machos son: gónadas agaméticas, espermatozoides detenidos en periodos tempranos del desarrollo (fase mitótica o meiótica), espermatozoides con anomalías (con dos cabezas o sin cola), problemas con el núcleo espermático, la no fusión de la mitocondria, mala localización del material genético, elongación espermática defectuosa, mala individualización, dificultades en la motilidad de los espermatozoides o en la viabilidad. Se ha visto que en el caso de la viabilidad algunos espermatozoides pueden penetrar el óvulo pero no producen una embriogénesis normal. [Wakimoto *et al*, 2004. Castrillon *et al*, 1993. Green *et al*, 1990. Kettaneh, *et al* 1980]

#### **8.4 Mutantes**

Las diferencias significativas encontradas en los biomarcadores sugieren que las cepas CS1 y CS2 pueden ser mutantes. Aunque no es suficiente para asegurar que estas cepas son mutantes no se puede descartar que lo sean, pues presentan algunas características que las diferencian de CS.

La cepa CS2 es muy probable que sea mutante porque existen tres biomarcadores que mostraron diferencias significativas con respecto a CS, estos son el índice de sobrevivencia, la proporción sexual y el promedio de la progenie por macho. A pesar de no haber diferencias significativas en el índice de fertilidad, este no es un

biomarcador que descarte que la cepa CS2 sea mutante ya que no es concluyente que el comportamiento de CS2 sea diferente con respecto a CS en la fertilidad.

En el caso de CS1 el biomarcador que sugiere que es mutante es el promedio de la progenie por macho, ya que se encuentran diferencias significativas con respecto a CS. A pesar de que no se encontraron diferencias significativas en ningún otro biomarcador, el hecho de que la tendencia del índice de fertilidad de CS1 es diferente al mostrado por CS y CS2 apoya la diferencia de CS1 con respecto a CS.

Se necesitan realizar más estudios para determinar la función o funciones que son modificadas en las cepas CS1 y CS2 utilizando otro tipo de biomarcadores. Esto permitirá saber el cambio que produjo la NDMA en *Drosophila melanogaster*.

Es necesario hacer más experimentos, utilizando compuestos con diferente actividad química (por ejemplo Azida de sodio), para confirmar las semejanzas y diferencias entre las cepas CS1, CS2 y la silvestre CS encontradas con NDMA y establecer nuevos comportamientos.

## 9. CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que las cepas CS1 y CS2 tienen una probabilidad alta de ser mutantes, ya que responden distinto con respecto a CS en el índice de sobrevivencia, la proporción sexual y el promedio de la progenie por macho.

Se confirma que el índice de sobrevivencia, proporción sexual, el índice de fertilidad y el promedio de la progenie por macho son buenos biomarcadores para identificar los efectos de la NDMA sobre *D. melanogaster*.

El índice de sobrevivencia de las moscas fue afectado en las concentraciones mayores en la siguiente relación: CS1 < CS2 < CS.

La proporción sexual de *D. melanogaster* fue afectado en la concentración 2.5 mM en la siguiente relación: CS2 < CS1 < CS.

El índice de fertilidad tiene la siguiente relación: CS1 = CS2 < CS.

La progenie promedio por macho tiene una relación a partir del testigo hasta 0.019 mM de la siguiente manera: CS2 < CS1 < CS. Después de la concentración 0.078 mM tiene una relación: CS1 < CS2 < CS.

## **10. ANEXO**

### **10.1 Ejemplos de experimentos en organismos distintos a *Drosophila melanogaster***

#### **Ejemplo 1**

Se hizo un experimento con ratones para observar las diferencias de metabolismo entre sexos y etapas de desarrollo, se les inyectó de 2 a 4 mg de glutamato monosódico durante distintas etapas del desarrollo, desde fetos hasta adultos, se determinó la concentración del tóxico en la sangre, la concentración de la hormona de crecimiento, en caso de los machos la concentración de testosterona y en las hembras la de progesterona y el metabolismo del glutamato monosódico. Midiendo la concentración de las enzimas P450; encontraron que la hormona del crecimiento disminuía con respecto al control (ratones no inyectados con glutamato monosódico) y provocaba problemas en el dimorfismo sexual. Por lo tanto, Agrual (1997) llegó a la conclusión que es distinto el metabolismo entre sexos y entre las distintas etapas del desarrollo del organismo.

#### **Ejemplo 2**

La preñez en mamíferos provoca grandes cambios fisiológicos y bioquímicos en la hembra que normalmente afectan la capacidad de metabolizar los tóxicos. Un gran número de enzimas maternas como la progesterona, pregnanodiol y la gonadotropina son secretadas durante la gestación. Varios cambios en la capacidad metabólica de los organismos durante este periodo parecen estar asociados con la alteración hormonal. El nivel de progesterona aumenta, que es un inhibidor de algunas enzimas, y el pregnanodiol provoca la disminución de enzimas en el feto y en la placenta se produce la hormona gonadotropina que permite la activación del citocromo P450 del mismo. La preñez tiene efecto hepático ya que afecta al citocromo P450, que provoca reducción de



esta enzima en la hembra [Hodgson, 2001]. Falany (2005) hizo un experimento con ratas preñadas y no preñadas inyectándoles 0, 5, 20 y 100 mg/kg de Octametiltetracilosiloxano, que es un químico que se desprende de las implantaciones artificiales de seno, esto se hizo para ver la capacidad metabólica de los dos diferentes estados de la hembra y predecir los efectos que se pueden producir en las mujeres que se someten a implantación de seno; analizó la concentración de las enzimas del citocromo P450 y las reacciones inmunológicas que provoca este compuesto; encontró que la concentración de las enzimas del citocromo P450 era menor en las ratas preñadas que en las no preñadas [Falany, 2005].

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal A., Shapiro B. 1997. Gender, age and dose effects of neonatally administered aspartate on the sexually dimorphic plasma growth hormone profiles regulating expression of the rat sex-dependent hepatic cyp isoforms. *Drug Metabolism and Disposition*. Num. 11. Pág. 1249-1256.
- Anderson L., Harrington G., Pylypiw H., Hagiwara A., Magee P. 1986. Tissue levels and biological effects of N-nitrosodimethylamine in mice during chronic low or high dose exposure with or without ethanol. *Drugs Metabolism and Distribution*. Vol. 14 Num. 6. Pág. 739-773.
- Arellano-Aguilar O. 2002. *Drosophila* como modelo *in vivo* para evaluar el potencial genotóxico de muestras ambientales. Tesis de Licenciatura. UNAM.
- Avers C. 1984. *Genetics*. Prindle, Weber and Schmidt. E.U.A.
- Baar A.J., Bligleven H., Mohn G.R., Natarajan A.T., Breimer D.D. 1980. Preliminary studies on the ability of *Drosophila* microsomal preparations to activate mutagens and carcinogens. *Mutation Research*. Num. 72. Pág. 257-264.
- Buckwold V., Lang W., Scribner C., Blanchett D., Alessi T., Langecker P. 2006. Safety pharmacology, toxicology and pharmacokinetic assessment of recombinant human  $\omega$ -interferon produced from CHO-SS cells. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. Num. 99. Pág. 62-70.
- Bloch M., Wolfner M. 2006. Emergence of sperm from female storage sites has egg-influenced and egg-independent phases in *Drosophila melanogaster*. *Biological Letter*. Num 2. Pág. 128-130.
- Cassaret, Dull: Compilado por Curtis D. y Watkins J. 2005. *Fundamentos de toxicología*. McGraw Hill/Internacional de España. Madrid, España.
- Castrillon D., Gonczy P., Alexander S., Rawson R., Eberhart C., Viswanathan S., DiNardot S., Wasserman S. 1993. Toward a molecular genetic analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster* characterization of male-sterile mutants generated by single P element mutagenesis. *Genetics*. Num. 135. Pág. 489-505.
- Dashwood R. 2002. Modulation of heterocyclic amine-induced mutagenicity and carcinogenicity: an 'A-to-Z' guide to chemopreventive agents, promoters, and transgenic models. *Mutation Research*. Num. 511. Pág. 89-112.
- Encell L., Foiles P., Gold B. 1996. The relationship between *in vivo* nitrosodimethylamine metabolism and DNA methylation in isolated rat hepatocytes. *Carcinogenesis*. Vol. 17. Num. 5. Pág. 1127-1134.
- Falany C., Li G. 2005. Effects of age and pregnancy on Cytochrome P450 induction by octamethyltetracyclosiloxane in female sprague-dawley rats. *Biochemical molecular toxicology*. Num. 2. Pág. 129-138.
- Feyresen R. 1999. Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology*. Num. 44. Pág. 507-533.
- Fujita K., Kamatak T. 2001. Role of human Cytochrome P450 (CYP) in the metabolic activation of N-alkylnitrosamines: application of genetically engineered *Salmonella typhimurium* YG7108 expressing each form of CYP together with human NADPH-Cytochrome P450 reductase. *Mutation Research*. Num. 483. Pág. 1123-1145.
- Garcia V. 2006. Participación de inversiones múltiples en la modulación de la respuesta genotóxica de *Drosophila melanogaster*. Tesis de licenciatura, UNAM.

- Goff G., Hillioub F., Siegfried B. D., Boundya S., Wajnberg E., Soferb L., Audantb L., ffrench-Constanta R., Feyereisen R. 2006. Xenobiotic response in *Drosophila melanogaster*: sex dependence of P450 and GST gene induction. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Num. 36. Pág. 674-682.
- Goto Y., Matsuda T., Ito K., Huh N., Thomale J., Rajewsky M.F., Hayatsu H., Negishi T. 1999. Mutagenicities of *N*-nitrosodimethylamine and *N*-nitrosodiethylamine in *Drosophila* and their relationship to the levels of *O*-alkyl adducts in DNA. *Mutation Research*. Num. 425. Pág. 125-134.
- Green L., Wolf N., McDonald K., Fuller M. 1990. Two Types of genetic interaction implicate thew *hirligig* gene of *Drosophila melanogaster* in microtubule organization in the flagellar axoneme. *Genetics*. Num. 126. Pág. 961-973.
- Greenspan R. 2004, Fly Pushing. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, E.U.A.
- Harrington G., Magee P., Pylypiw H., Kozeniauskas R., Brvil R., Nelson D., Thurmond J. 1990. The formation, disposition and hepatic metabolism of Dimethylnitrosamine in the pig. *Drug Metabolism and Disposition*. Vol. 18 Num. 5. Pág. 354-260.
- Herrera J. 2005. Efecto de concentraciones bajas de Talidomida en la fertilidad de moscas (*Drosophila melanogaster*) expuestas durante el desarrollo larvario. Tesis de Licenciatura. UNAM.
- Islas M. 1996. Comparación de la actividad genotóxica de tres compuestos del grupo de las azidas en células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Maestría. UNAM.
- Jameson C., Lunn R., Jeter S., Sabella A. 2002. Selected heterocyclic amines: PhIP, MeIQ, and MeIQx (Compendio). U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program. Pág. 198.
- Johansson J., Mandin P., Renzoni A., Chiaruttini C, Springer M., Cossart P. 2002. An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *listeria monocytogenes*. *Cell Press*. Vol. 110. Pág. 551-561.
- Kettaneh N., Hartl D. 1980. Ultrastructural analysis of spermiogenesis in segregation distorter males of *Drosophila melanogaster*: the homozygotes. *Genetics*. Num. 96. Pág. 665-683.
- Kulkarni A., Hodgson. 1980. Multiplicity of Cytochrome P450 in microsomal membranes from the housefly *Musca domestica*. *Biochemical and Biofiscal Acta*. Num. 263. Pág. 573-588.
- Klug W., Cummings M., Epencer C. 2006. Concepts of genetics. Prentice Hall. E.U.A.
- Krull C., Zeilmaker M., Schothorst R., Havenaar R. 2003. Intra gastric formation and modulation of N-nitrosodimethylamine in a dynamic in vitro gastrointestinal model under human physiological conditions. *Food and Chemical Toxicology* Num. 42. Pág. 51-63.
- Ledezma P. A. 2006. Actividad genotóxica de afloramientos externos del confinamiento de residuos de Cromo de Cromatos de Mexico en Lecheria Edo. de México. Tesis de licenciatura. UNAM.
- Madigan M., Martinko J., Parker J. 2001. Brock: Biología de los microorganismos. Prentice Hall. España.
- Mukhopadhyay I., Krishna D., Kar Chowdhuri D. 2003. Hazardous effects of effluent from the Chrome plating industry: 70 kDa heat shock protein expression

- as a marker of cellular damage in transgenic *Drosophila melanogaster* (*hsp70-lacZ*). Environmental Health Perspectives. Vol. 111. Num. 16. Pág. 1926-1932.
- Muñoz L. B. 2007. Genotoxicidad de una muestra ambiental externa a Cromatos de México en células somáticas de *D. melanogaster*. Tesis de Licenciatura. UNAM.
  - Muñoz Moya A. 1998. Comparación de la genotoxicidad de la resina obtenida de la raíz de tres especies del genero *Ipomoea*, *I. orizabensis*, *I. jalapa* e *I. purga*, mediante la prueba de mutación y recombinación somáticas de *D. melanogaster*. Tesis de Licenciatura. UNAM.
  - Nagao M. 1999. A new approach to risk estimation of food-borne carcinogens heterocyclic amines based on molecular information. Mutation Research. Num. 431. Pág. 3-12.
  - Newman M., Unger M. 2003. Fundamentals of ecotoxicology. Lewis Publisher. E.U.A.
  - Peña C. E., Dean E. C., Ayala-Fierro F. 2001. Toxicología ambiental. Universidad de Arizona. E.U.A.
  - Ramos P., Abundis, Gaytán, Ordaz, Orozco, Maldonado, Hernández, González Reyes, Galicia, Muñoz. 1993. Manual de laboratorio de genética para *Drosophila melanogaster*. McGRaw Hill. México.
  - Ramos P., Muñoz A. 2006. Memorias del 37º congreso “Environmental and Molecular mutagenesis” Vol. 47. Num. 6, Pág. 450.
  - Rivas H. 1999. Participación de la reparación en el daño inducido por mutágenos con diferente actividad química: N-nitrosodimetilamina (DMN), metilmetano-sulfato (MMS), colchicina, azida de sodio y cloruro de plomo. Tesis de Licenciatura. UNAM.
  - Roberts D.B. 1986. *Drosophila* a practical approach. ILR press. Inglaterra.
  - Smith J., Wishnok J., Deen W. 1994. Metabolism and excretion of methylamines in rats. Toxicology and Applied Pharmacology. Num. 125. Pág. 675-680.
  - Snustad P., Simmons M. 2006. Principles of genetics. John Wiley and sons Inc. E.U.A.
  - Tamarin R. 1996. Principles of genetics. Wm. C. Brown publishers. E.U.A.
  - Tardiff G., Lohman P., Wogan G. 1994. Methods to assess DNA damage and repair: interspecies comparisons. John Wiley & Sons Ltd.. E.U.A. Pag. 9-18
  - Tennant R. 1991. The genetic toxicity database of the national toxicology program: evaluation of relationships between genetics toxicity and carcinogenicity. Environmental Health Perspectives. Vol. 96. Num. 3. Pág. 231-250.
  - Valle Vega P. 1986. Toxicología de los alimentos. UACH. México.
  - Vogel E.W., Zijlstra J.A. 1987. Mechanistic and methodological aspects of chemically-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. Mutant Research. Vol 182. Num. 5. Pág. 243-264.
  - Walker C., Hopkin R., Sibly D. 1996. Principles of ecotoxicology. Taylor and Francis. Gran Bretaña.
  - Wakimoto B., Lindsley D., Herrera C. 2004. Toward a comprehensive genetic analysis of male fertility in *Drosophila melanogaster*. Genetics. Num. 167. Pág. 207-216.
  - Weaver R., Hedrick P. 1997. Genetics. Wm. C. Brown publishers. E.U.A.
  - Yurchenko S. 2006. Determination of some carcinogenic contaminants in food. Tartu University Press. Estonia.

- Yoo J.S., Guengerich P., Yang C. 1988. Metabolism of A-Nitrosodialkylamines by human liver microsomes. *Cancer research*. Vol. 88. Num. 88. Pág. 1499-1504.
- Zeisel S., DaCosta K. 1986. Increase in human exposure to methylamine precursors of 7V-Nitrosamines after eating fish. *Cancer research*. Num. 46. Pág. 6136-6138.