



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Pérdida de cromosomas sexuales y no
disyunción inducidas por agua residual y
tratada de la peletera “Curtidos Toluca” en
Drosophila melanogaster

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A:
ARIADNA BERENICE MORALES JIMÉNEZ



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. PATRICIA RAMOS MORALES**

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

1. Datos del alumno

Morales

Jiménez

Ariadna Berenice

56 85 07 23

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

300172551

2. Datos del tutor

Dra.

Patricia

Ramos

Morales

3. Datos sinodal 1

Dra.

Nathalie

Cabirol

4. Datos sinodal 2

Dr.

Rodolfo Omar

Arellano

Aguilar

5. Datos sinodal 3

Dr.

Frank Raúl

Gío

Argáes

6. Datos sinodal 4

Bióloga

Blanca Rosa

Hernández

Bernal

7. Datos del trabajo escrito

Pérdida de cromosomas sexuales y no disyunción inducidas por agua residual y tratada de la peletera "Curtidos Toluca" en

Drosophila melanogaster

60 p.

2009



Esta tesis esta dedicada a mis papás:

Lic. Gilberto Morales Frías y Angelina Jiménez Pérez

Y a mi hermano

Jorge Enrique Morales Jiménez

Gracias por todo su amor y comprensión, gracias por que siempre estuvieron a mi lado y por apoyarme desde el primer momento en el que quise ser bióloga.

Dedicatoria especial a:

Luis Alberto García Balderas

Amor muchas gracias por estar a mi lado y sobre todo por que nunca dejaste que me rindiera.

Agradecimientos:

A la Dra. Patricia Ramos Morales, muchas gracias por que me enseñaste muchísimas cosas, por que eres una excelente profesionista, maestra y amiga. Y muchas gracias por que siempre confiaste en mí.

A todos mis maestros del laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental, Adriana Muñoz, Armando Muñoz, Blanca Hernández, Omar Arellano, por enseñarme muchas cosas y por tenerme paciencia.

A mi maestro Biol. Hugo Rivas, por ser un excelente maestro, por toda tu ayuda e interés en enseñarme y también por ser un buen amigo.

A Yaneli, Linda, Ana Leticia y Martha, gracias por su amistad, por todo su apoyo y ayuda en todos los momentos que lo necesite, por darme la mano cuando estaba atorada en varias cosas de la tesis y de la carrera jajaja, por todos los cafés que nos tomamos, por todos esos momentos tan divertidos que hemos pasado dentro y fuera del laboratorio y espero que esos momentos sigan como hasta hoy.

A mis compañeros del laboratorio: Romina, Gabriela, Kahorik, Tulio, Hugo, Rosalba, por todos esos momentos tan divertidos en el laboratorio, en experimenta y en las practicas de campo.

A las familia Morales Martínez y García Balderas, por todo su cariño, apoyo y por que siempre me ayudaron en todo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, gracias a que me abriste tus puertas pude aprender muchas cosas, conocí mucha gente importante en mi vida y muchos lugares que nunca imagine, pero sobre todo gracias a ti me forme como profesionista y como una mejor persona...

ÍNDICE

Resumen	1
I. Introducción	2
1.1 “Curtidos Toluca”.....	2
1.2 Proceso de curtido	5
1.3 Curtido al cromo.....	5
1.4 Cromo y su toxicidad.....	9
1.5 Monitoreo ambiental.....	13
1.6 Bioindicadores y biomarcadores.....	13
1.7 <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo biológico.....	15
1.8 Determinación del sexo.....	16
1.8.1 Genes de determinación.....	17
1.8.2 Mosaicos en <i>Drosophila</i>	19
1.9 Prueba de integridad cromosómica en <i>Drosophila melanogaster</i>	21
II. Justificación	22
III. Objetivo	23
3.1 Objetivos particulares.....	23
IV. Hipótesis	23
V. Materiales y métodos	24
5.1 Muestra ambiental.....	24
5.2 Marcadores genéticos.....	24
5.2.1 línea de machos y marcadores.....	25
5.2.2 línea de hembras y marcadores.....	25
5.3 Diseño experimental.....	26
5.4 Índice de sobrevivencia y Proporción de sexos.....	27
5.5 Análisis de la prueba de integridad cromosómica.....	28

VI. Resultados	31
6.1 Índice se sobrevivencia.....	32
6.2 Proporción sexual.....	36
6.3 Prueba de integridad cromosómica.....	40
VII. Discusión	51
VIII. Conclusiones	55
IX. Bibliografía	56

RESUMEN

Los efectos más graves de la contaminación ocurren cuando la entrada de sustancias al ambiente rebasa la capacidad de los ecosistemas para asimilarlas y/o degradarlas; éstos interfieren con la salud de los organismos, dañan los recursos naturales y alteran el equilibrio ecológico. Con la finalidad de reducir el impacto al ambiente, la empresa "Curtidos Toluca S.A. de CV." ha desarrollado una metodología para recuperar gran parte del cromo contenido en el agua utilizada durante el proceso de curtido. El monitoreo ambiental hace uso de organismos cuya organización biológica es conocida para establecer cambios en los parámetros que los caracterizan como indicadores de perturbación. *Drosophila melanogaster* es un organismo ideal para programas de monitoreo concernientes a la detección de actividad genotóxica de compuestos químicos y particularmente de mezclas complejas. En este trabajo el objetivo fue determinar si *Drosophila melanogaster* puede discriminar entre muestras complejas de agua derivadas de la actividad industrial, las cuales presentan diferente grado de contaminación, mediante la evaluación de diversos biomarcadores. Se utilizaron muestras de agua residual no tratada y tratada para recuperación de cromo de la peletera "Curtidos Toluca". Se prepararon diluciones sucesivas y se administraron por alimentación a larvas de 72 ± 4 hrs, provenientes de moscas portadoras de marcadores genéticos y de moscas silvestres, para una exposición semicrónica. Se realizaron dos experimentos. Como biomarcadores de toxicidad se utilizaron el Índice de sobrevivencia y la Proporción Sexual. Para evaluar la genotoxicidad de las muestras, machos tratados se cruzaron con hembras vírgenes no tratadas y mediante marcadores fenotípicos se clasificó a la progenie como regular o excepcional. Ambas muestras indujeron pérdida total y no disyunción de cromosoma X, pero la frecuencia de eventos fue mayor con la muestra residual no tratada. En ambos experimentos la toxicidad de la muestra tratada fue menor. Las dos muestras mostraron actividad clastogénica que fue detectada por la sensibilidad de *Drosophila*. Este organismo es un biomonitor confiable en la evaluación de toxicidad y genotoxicidad, recomendable en el seguimiento de programas de recuperación ambiental.

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental siempre ha existido, pues en parte es inherente a las actividades humanas. En México como en otros países, gran parte del crecimiento industrial se desarrolló en tiempos donde no se consideraban, y muchas veces tampoco se conocían, los efectos que los residuos peligrosos podrían tener en la salud humana y en el medio ambiente.

Se considera que existe contaminación cuando la entrada de sustancias (naturales o sintéticas) al ambiente rebasa la capacidad de los ecosistemas para asimilarlas y/o degradarlas (Albert, 2004). Como consecuencia de ello, su manejo y disposición deben estar sujetos a la regulación gubernamental, promoviendo que cada vez más, empresas generadoras de residuos que contaminan los suelos cercanos a sus instalaciones, implementen metodologías para la reducción de contaminantes y dispongan de herramientas experimentales que evalúen el efecto de la reducción de contaminantes y de su actividad genotóxica. Por lo que es necesario implementar metodologías calibradas para determinar la factibilidad técnica de sus procesos de recuperación. Este trabajo propone a *Drosophila melanogaster* como un modelo efectivo para ser involucrado en metodologías para medir la calidad del ambiente.

1.1 Curtidos Toluca

Los directivos de la empresa “Curtidos Toluca S.A. de C.V.” ubicada en el parque industrial Lerma, preocupados por el impacto que genera la liberación de sustancias tóxicas empleadas en el proceso de curtido de pieles dentro de la misma empresa y al ambiente, han implementado metodologías para reducir el impacto de los residuos: se cambió el uso de anilinas y solventes por lacas, que son solubles en agua y menos tóxicas y al usarlas el impacto es menor; también ha incorporado a su proceso una metodología para recuperar parte del cromo que no es absorbido por el cuero, para posteriormente ser reutilizado.



Fig.1: Interior de la peletera "Curtidos Toluca".



Fig.2: Piel que ha sido curtida al cromo denominada "cuero azul"

Debido a que las descargas y derrames de aguas provenientes de la industria del curtido provocan efectos adversos en los ecosistemas, se han establecido límites máximos permisibles que deberán satisfacer las descargas de esta industria en nuestro país.

La Norma Oficial Mexicana NOM-CCA-O21-ECOL/1993, establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas a cuerpos receptores de aguas residuales, provenientes de la industria del curtido y acabado en pieles. En dicha norma se establece (cuadro 1) como límite máximo permisible promedio diario e instantáneo, los valores, rangos y concentraciones de los parámetros de la descarga, en función del análisis de muestras compuestas de las aguas residuales provenientes de esta industria.

Cuadro 1. Límites permisibles de contaminantes en la industria de curtido y acabado de pieles en México. Norma Oficial Mexicana. Diario Oficial de la Federación, 1993.

<i>Parámetros(mg/ L)</i>	<i>Límites máximos permisibles</i>	
	Promedio diario	Instantáneo
Demanda química de oxígeno	200	240
Sólidos sedimentarios	50	80
Sólidos suspendidos totales	200	240
Grasas y aceites	30	40
Cromo total	1.0	1.5
Cromo hexavalente	0.1	0.2
Sulfuros	1.0	1.5
pH	6-9	6-9

En el caso de que la concentración de contaminantes en cualquiera de los parámetros básicos, rebasen los límites máximos permisibles señalados en la Norma Oficial Mexicana, multiplicados por cinco, para cuerpos receptores tipo B (ríos, uso público urbano), los responsables de éstas quedan obligados a presentar un programa de las acciones u obras a realizar para el control de la calidad del agua de sus descargas a la Comisión Nacional del Agua, en un plazo no mayor de 180 días naturales.

1.2 Proceso de curtido

El proceso completo puede ser clasificado, básicamente en cuatro etapas; la primera se denomina “**Ribera**”, en esta etapa son eliminados todos los componentes de la piel que no son transformables a cuero, como sales de sodio, pelo y material proteínico; la segunda etapa del proceso es el “**Curtido**”. Mediante el cual se logra impartir estabilidad química y física a la piel evitando su putrefacción y haciéndola resistente a cambios de temperatura y humedad, la tercera etapa se conoce como **Recurtido, Teñido y Engrase “RTE”**, y en ella el cuero adquiere suavidad, color y otras características que son necesarias para fabricar artículos comerciales.

Finalmente, en la cuarta etapa denominada “**Acabado**” se imparte al cuero las características específicas que el mercado impone a cada tipo de producto, como puede ser el grabado, color y tacto, entre otros (Gutiérrez, 1999).

1.3 Curtido al Cromo

El curtido al cromo, es la reacción de la piel con las sales de cromo, las cuales dan alta estabilidad a la estructura fibrosa. En este estado, el cuero es muy resistente al ataque bacteriano y a altas temperaturas. El cromo se clasifica como sal inorgánica y para que una sal inorgánica tenga capacidad curtiente es necesario que su solución acuosa se hidrolice y que las sales básicas formadas, ya sea

directamente o por enmascaramiento, se mantengan en solución para que puedan penetrar en la piel y reaccionar con ella para aumentar su temperatura de contracción o encogimiento (Gutiérrez, 1999).

Una vez que la piel es depurada, los residuos de cal que se encuentran alojadas en los espacios interfibrilares, sin afectar al calcio unido al colágeno, son eliminados. El siguiente paso del proceso o *pickle*, es la interrupción definitiva de un efecto enzimático para preparar la piel para el proceso de curtido en donde se adicionan ácidos orgánicos e inorgánicos (generalmente sulfúrico), que disminuyen el pH hasta un valor entre 3.5 y 1.8, con lo cual se libera el calcio restante que se combinó con el colágeno permitiendo la difusión del curtiente hacia el interior de la piel sin que se fije en las capas externas del colágeno.

Los curtientes inorgánicos son sales que liberan metales solubles que se hidrolizan (rompen los enlaces del agua) y se mantienen en solución (Cuadro 2). Cuando éstos se introducen en la piel, reaccionan con las proteínas formando compuestos de coordinación muy estables y la temperatura de contracción de la piel aumenta.

Cuadro 2: Porcentaje aproximado de productos químicos utilizados en el curtido al cromo (porcentaje sobre peso de piel), Gutiérrez, 1999.

<i>Producto</i>	<i>Cantidad (%)</i>
Sulfato básico de cromo* (2Cr(OH)SO ₄)	6.00–8.00
Carbonato de sodio* (NaCO ₃)	0.80-1.20
Bicarbonato de sodio* (NaHCO ₃)	1.50-1.80
Óxido de magnesio* (MgO)	0.30-0.50
Fungicidas**	0.15-0.25

* Estos productos se utilizan indistintamente y el uso de unos excluye a otros.
** Solo se utilizan cuando el cuero curtido se va almacenar.

Aunque el cromo es el metal más utilizado, también se usan aluminio o hierro; aunque en forma más limitada ya que las propiedades curtientes de estos elementos son más débiles. Las sales de hierro generan pieles que se hinchan al lavarlas, inclusive cuando se utiliza cloruro de hierro al 75% de basicidad.

Algunas sales de aluminio se usan como curtientes para obtener cuero blanco, por ejemplo alumbre potásico (sulfato hidratado de aluminio y potasio) utilizado desde la antigüedad; o sulfato de aluminio mezclado con óxidos de aluminio, o sales de aluminio básicas (Gutiérrez, 1999).

El proceso se realiza en menos de 24 horas, en tambores que son cilindros de madera rotatorios, equipados con estacas que levantan y dejan caer las pieles a medida que giran. En ocasiones, se llevan a cabo el curtido con cromo y vegetal, en la cual se curte a la piel con sales y sustancias orgánicas, en forma combinada con el objeto de impartir a la piel características específicas. (Figura 3).

“PROCESO DE CURTIDO”
Segunda etapa: CURTIDO AL CROMO

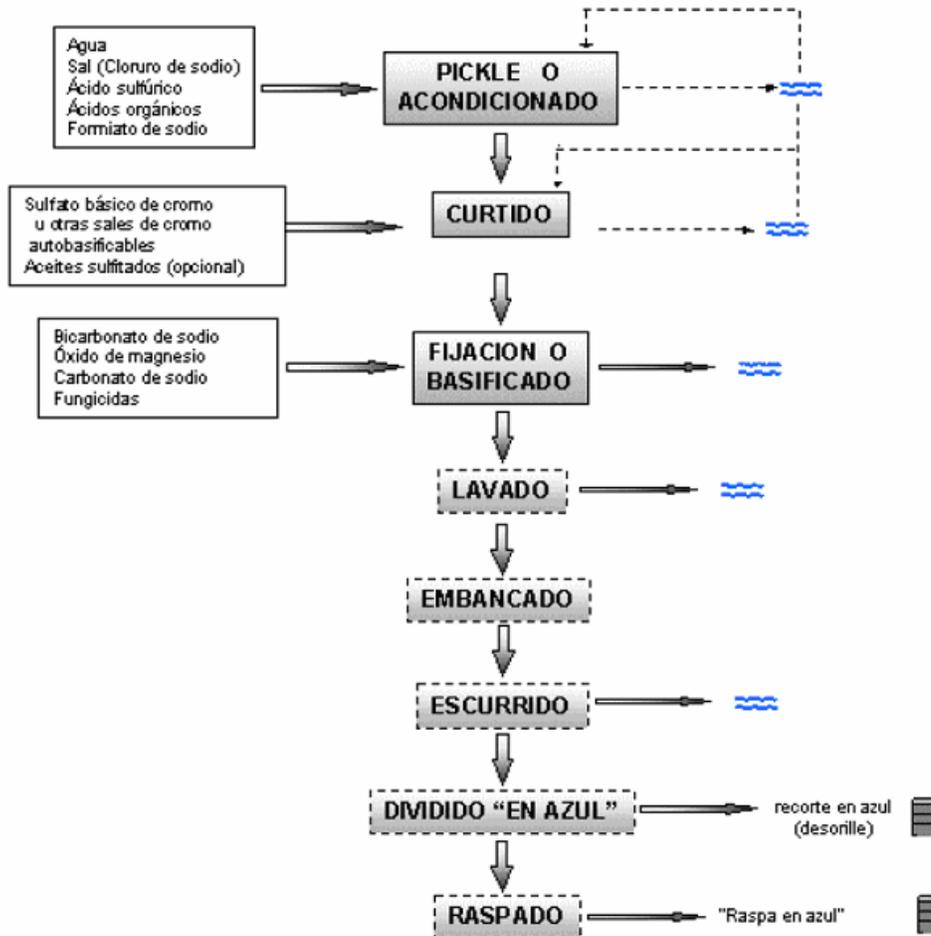
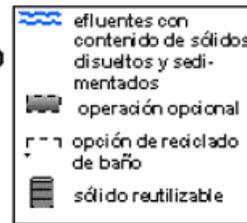


Fig. 3: Esquema del proceso de curtido. Manual de procedimientos para el manejo adecuado de los residuos de la curtiduría (Gutiérrez, 1999).

La cantidad y composición de los residuos que se generan dependen, principalmente de la técnica de curtido utilizada, pero también del número y tipo de operaciones realizadas, ya que algunas son opcionales; así como de la secuencia de las mismas, de la dosificación de productos químicos y, en general, del control de proceso.

Las variaciones en el proceso se ven influenciadas no solamente por factores técnicos, sino también por las condiciones económicas y sociales que imperan en este sector industrial, a nivel regional y nacional así como por una variedad de prejuicios.

A nivel particular, cada empresa debe integrar un programa específico de manejo de sus residuos en el cual queden claramente expresados, la estrategia técnica seleccionada y sus compromisos, señalando actividades y tiempos de cumplimiento (Gutiérrez, 1999).

1.4 Cromo y su toxicidad

Es un elemento que se encuentra en plantas, suelos, animales y gases volcánicos, además es el sexto elemento en abundancia en la corteza terrestre, donde se encuentra como óxido (Cr_2O_3).

Es un metal pesado de la primera serie de metales de transición, a lo que se deben sus principales propiedades fisicoquímicas y bioquímicas. Entre estas destacan sus estados de oxidación, los cuales son: -2, 0, +2, +3 y +6. Los derivados de Cr de importancia biológica se han asociado con los estados de oxidación +3 y +6; al primer grupo pertenecen el óxido crómico (Cr_2O_3) y el cloruro crómico (CrCl_3) y al segundo, los cromatos (CrO_4)²⁻ y los dicromatos (Cr_2O_7)²⁻ (Albert, 2004).

1.4.1 Usos

El cromo es utilizado en industrias como: metalurgia, química y de materiales refractarios, pinturas, esmaltes para la protección de madera y para el proceso de curtido en las peleteras.

Los usos del cromo en materiales refractarios incluye la fabricación de ladrillos a base de magnesita y cromo, para hornos metalúrgicos y el empleo de cromita para que los materiales expuestos resistan altas temperaturas (Albert 2004., Bagchi et al., 1997; De Flora et al., 2006).

1.4.2 Fuentes de exposición

Para los seres vivos, las principales fuentes de exposición ambiental al cromo son el aire, el agua y los alimentos que contienen este metal.

*** Aire**

Las concentraciones de cromo en el aire son provocadas principalmente por emisiones de plantas industriales que utilizan o producen compuestos de cromo. Otras fuentes de exposición son el confinamiento inadecuado de residuos peligrosos y de incineradores (Albert, 2004). Las emisiones de cromo pueden provocar cáncer de pulmón por la exposición laboral (De Flora et al., 2006).

*** Agua**

Los efluentes de industrias que utilizan cromo, como las cromadoras, curtido de pieles o protección de madera, aportan cantidades relativamente altas de cromo a las aguas residuales.

Los residuos sólidos industriales mal confinados pueden ser fuentes importantes de contaminación para los mantos freáticos, esta contaminación puede mantenerse durante mucho tiempo (Albert, 2004).

* Alimentos

El cromo se encuentra de manera natural en algunos vegetales frescos, frutas, granos y carne. Además, se puede encontrar en suplementos alimenticios (Mulyani et al., 2003; Stallings et al., 2006).

Algunos métodos para procesar, almacenar y preparar alimentos pueden modificar su contenido de cromo. Por ejemplo, los alimentos ácidos que entran en contacto con latas o utensilios de acero inoxidable (contiene de 14 a 18% de Cr), pueden contener altas concentraciones de cromo (Albert, 2004).

1.4.3 Efectos tóxicos del cromo

Los efectos tóxicos que puede provocar el cromo, están relacionados con el estado de oxidación. Las valencias del cromo de importancia toxicológica son el cromo trivalente [III] y cromo hexavalente [VI].

Cromo trivalente [III]

Es un elemento traza esencial para los humanos, actúa en la actividad de la insulina y en el metabolismo de azúcares y grasa. La deficiencia de cromo en la dieta puede estar relacionada con personas desnutridas o diabéticas. La exposición prolongada a Cr [III] puede causar enrojecimiento y lesiones en la piel, además de irritación en la nariz y boca (Albert, 2004; De Flora et al., 2006). Contrariamente al Cr [VI] el Cr [III] no penetra fácilmente a la célula. En estudios recientes se ha reportado que el Cr [III] induce daño clastogénico en células de ovario en hámster chino, además de daño oxidativo en ADN de ratas y aberraciones en cromosomas politénicos en *Drosophila* (Stallings et al., 2006).

Cromo hexavalente [VI]

La exposición a derivados de cromo [VI] puede provocar conjuntivitis, lagrimeo y dolor en ojos. Además sus sales son corrosivas para la piel y las membranas mucosas, provocando lesiones como úlceras que pueden ser profundas, también enrojecimiento severo de la piel y edema.

Cuando este compuesto es inhalado puede causar irritación del epitelio de la nariz y sangrado, úlceras y perforación del tabique nasal. La ingesta accidental de pequeñas cantidades de cromo [VI] puede causar vómito sanguinolento, diarrea, sangre en las heces y puede acarrear colapso cardiovascular, convulsiones y muerte (Albert, 2004).

Los aniones de cromo penetran fácilmente a la membrana celular vía canales de aniones, los cuales también transportan aniones de sulfato y fosfato. Una vez que entra a la célula, el Cr [VI] tiende a ser reducido mediante reacciones enzimáticas catalizadas por agentes como el glutatión, el ácido ascórbico, la cisteína y la histidina (De Flora et al., 2006). Una vez en la célula el cromo es reducido y se obtienen productos reactivos como: Cr [V] reactivo, Cr [IV], Cr [III] así como formas reactivas de oxígeno (1O_2) y radicales libres hidroxilo (OH). Éstos pueden interactuar con macromoléculas celulares incluyendo al ADN provocando lesiones como rompimiento de hebras, entrecruzamiento y daño oxidativo al ADN (De Flora et al., 1990; De Flora et al., 2006). El Cr [VI] es carcinógeno probado para humanos por la EPA (U.S. Environmental Protection Agency).

1.5 Monitoreo ambiental

El monitoreo del ambiente es esencial para la identificación de sustancias dañinas para la salud. Utiliza metodologías con el fin de identificar agentes externos que amenazan el ambiente. El monitoreo se ha basado principalmente en la observación y la detección química de los contaminantes, pero la problemática va más allá de estos aspectos (Butterwort et al., 2001).

En la evaluación de la calidad del ambiente deben ser consideradas variables múltiples, en concordancia con la diversidad de elementos que participan en éste, por ejemplo el uso de indicadores de toxicidad se ha tomado como base para la identificación de factores que amenazan la vida de los organismos (Ramos et al., 1998).

1.6 Bioindicadores y biomarcadores

El monitoreo ambiental ha involucrado sistemas biológicos de prueba que implican el uso de organismos indicadores de perturbación así como el análisis de la diversidad de especies en zonas altamente contaminadas y el uso de especies centinelas, tanto de invertebrados como de vertebrados (Butterwort et al., 2001; Arellano-Aguilar, 2002).

La mayor razón para la identificación de especies bioindicadoras es encontrar organismos sensibles a cambios en el ambiente. Así, en el biomonitoreo se usan herramientas como biomarcadores que permiten obtener datos relevantes de la condición del ambiente. El riesgo se establece en función de la exposición y la toxicidad.

El papel de estos indicadores del ambiente es proporcionar información para determinar en un ambiente específico, si los organismos son fisiológicamente normales o no (Jamil, 2001).

Un biomarcador es definido como una respuesta biológica que puede estar relacionada con una exposición, o efecto tóxico producido por un contaminante ambiental. A menudo los biomarcadores son referidos como respuestas secundarias del organismo (Burger et al., 2007).

En un contexto más amplio se pueden incluir los niveles de organización biológica, desde las respuestas moleculares o bioquímicas, hasta cambios en el comportamiento de la población (Wu et al., 2005). Entre los criterios para la selección de biomarcadores en el biomonitoreo ambiental se considera que la respuesta de genotoxicidad:

- 1) sea cuantitativa en relación (dosis-respuesta) con los niveles de contaminación (o estrés) en el ambiente.
- 2) no se confunda con factores que prevalecen mucho en el ambiente (estación, temperatura, salinidad, sexo, tamaño y dirección, inter e intraindividual).
- 3) sea sensible y específica al contaminante en cuestión.
- 4) sea reproducible.
- 5) sea económica.

Los biomonitores facilitan la detección del impacto de contaminantes ambientales individuales o en mezclas complejas, ya que son sensibles a niveles bajos y exposiciones prolongadas de contaminantes que con frecuencia no son detectados con métodos basados en análisis químicos (Knudsen et al., 1992).

1.7 *Drosophila melanogaster* como modelo biológico

Drosophila melanogaster, la mosca del vinagre, ha sido utilizada como una herramienta básica en la genética ya que puede detectar mutágenos y carcinógenos (Kilbey et al., 1981; Lynch et al., 1991; Graf et al., 1992; Arellano-Aguilar, 2002). Dadas las características del modelo pueden ser explorados diferentes eventos genéticos, con metodologías particulares como: mutaciones letales recesivas ligadas al sexo (SLRLT), translocación de cromosomas y alteración en la integridad cromosómica en células germinales; pero también mutación, deleción, recombinación y no-disyunción en células somáticas (Kilbey et al., 1981; Graf et al., 1984; Guzmán-Rincon et al., 1998; Ramos et al., 1998; Arellano-Aguilar, 2002; Muñoz y Mazar, 1998).

Es un organismo ideal para el monitoreo ambiental, por ser un sistema *in vivo* que proporciona múltiples variables que pueden mostrar un cambio particular en relación con un factor causal (Ramos et al., 1998).

1.7.1 Características del modelo

Al ser un eucarionte la organización biológica de la mosca y de humanos comparten algunas características (Kilbey et al., 1981). Posee una alta capacidad de activación-desintoxicación, por lo que se sugiere que podría ser prácticamente útil para detectar metabolitos de vida corta (Vogel et al., 1975; Kilbey et al., 1981), además de contar con enzimas dependientes del citocromos P450 cuya actividad es similar a la fracción S9 del hígado de los mamíferos (Vogel et al., 1975; Muñoz-Martínez, 2007).

Su mantenimiento es económico, requiere poco espacio, su ciclo de vida es corto (10 días aproximadamente) y en cada generación produce numerosa progenie, en comparación con los roedores (Ramos et al., 1998).

Drosophila es sensible a la actividad genotóxica de diferentes tipos de químicos, mezclas complejas y otros factores ambientales. Los compuestos pueden ser administrados por contacto-alimentación (probablemente el más común), pero

también por inhalación e inyección (Ramos et al., 1998). La duración de la exposición puede ser aguda (<8 hrs.), semicrónica, crónica (todo el ciclo de vida) y también pueden utilizarse protocolos combinados (Ramos et al., 1998; Graf et al., 1998).

1.8 Determinación del sexo en *Drosophila*

Ya que los machos y las hembras de *Drosophila* tienen la misma composición de cromosomas sexuales que los humanos, podríamos suponer que el cromosoma Y determina el sexo masculino en las moscas. Sin embargo, el trabajo de Bridges en 1919 propuso que tanto cromosoma X como los autosomas juegan un papel decisivo en la determinación del sexo (Crew, 1965; Klug et al., 2006).

Bridges (1919) constató que el factor crítico en la determinación del sexo es la proporción de cromosomas X respecto al número de dotaciones autosómicas haploides, de modo que cuando existe un sólo cromosoma X y un número diploide de autosomas, se producen individuos del sexo masculino (XY:2A), mientras que cuando son dos cromosomas X los asociados a un número diploide de autosomas se originan hembras (2X: 2A). Los resultados de Bridges (1919) indican que en *Drosophila*, los factores que dan lugar a que una mosca se desarrolle como macho se encuentran en los autosomas. Sin embargo, algunos factores que determinan a la hembra están localizados en el cromosoma X (cuadro 3).

Cuadro 3. Dotaciones cromosómicas, proporción de cromosomas X con respecto a dotaciones autosómicas y la morfología sexual resultante en *Drosophila melanogaster* (Klug et al., 2006)

Cromosomas X	Autosomas	Formula Cromosómica	Proporción Cromosomas X/ Autosomas	Morfología sexual
3	2	3X/2A	1.5	Metahembra
3	3	3X/3A	1.0	Hembra
2	2	2X/2A	1.0	Hembra
3	4	3X/4A	0.75	Intersexo
2	3	2X/3A	0.67	Intersexo
1	2	X/2A	0.50	Macho
1	2	XY/2A	0.50	Macho
1	3	XY/3A	0.33	Metamacho

1.8.1 Genes de determinación

El dimorfismo sexual que presenta *Drosophila* es determinado por la misma cascada de genes que da origen o a una hembra o a un macho. La proporción de cromosomas X y autosomas especifican el sexo de cada célula ya sea activando (hembra) o reprimiendo (macho) el gen sex lethal (*sxl*) (figura 4). Para la activación del gen *sxl* es importante la presencia de promotores que son producto del transcrito del cromosoma X denominados promotores NUM. En los autosomas se produce el transcrito de otro tipo de promotores denominados DEM. Sólo los dímeros formados por los promotores NUM-NUM formarán un factor activo transcripcional promotor del gen *sxl*. Si el radio (proporción de cromosomas X y autosomas) es 1.0 hay mayor posibilidad de formar dímeros funcionales. Si en cambio el radio es 0.5, la mayoría de las subunidades NUM se unirán a subunidades DEM, formando heterodímeros NUM-DEM que no son funcionales como factores de transcripción para activar al gen *sxl*.

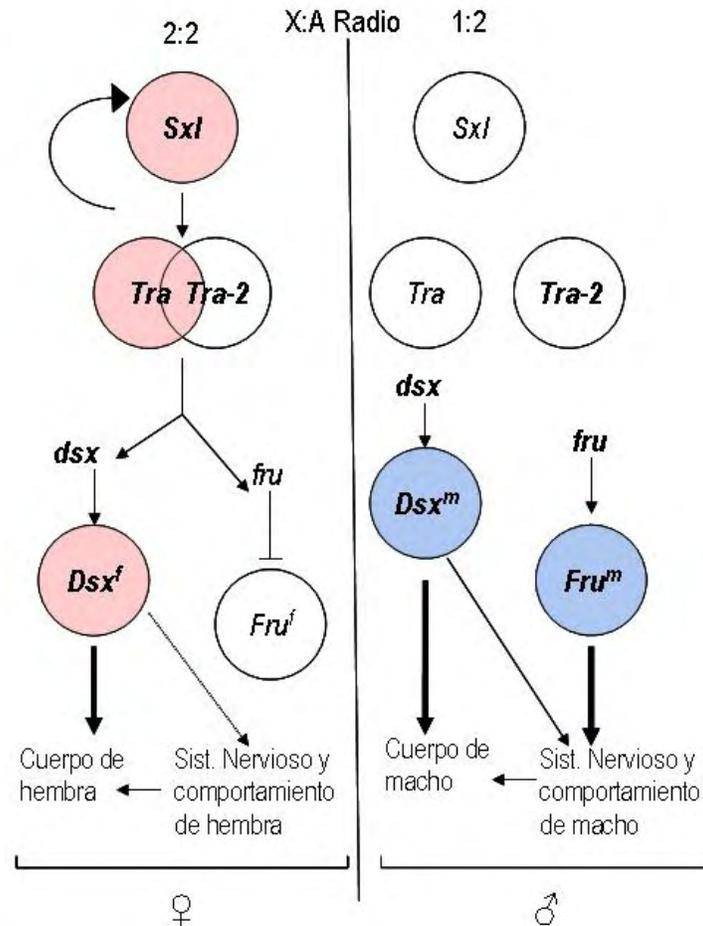


Figura 4. Cascada de genes que determinan el sexo en *Drosophila melanogaster*, las líneas negras y los colores rosa y azul indican una forma activa, mientras que las líneas y color gris indican no-funcional Ratio; proporción de cromosomas sexuales y autosomas del organismo; Sxl; proteína reguladora; Tra y Tra 2: proteínas que controlan la regulación de los genes dsx y fru; Dsx^f: proteína que determina estructuras de hembra; Fru^f: proteína que determina sistema nervioso y comportamiento de hembra; Dsx^m: proteína que determina estructuras de macho; Fru^m: proteína que determina sistema nervioso y comportamiento de macho (modificado de Billeter et al., 2006).

En las hembras de *Drosophila* la proteína Sxl regula la maduración post-transcripcional o “splicing” del pre-ARNm. En presencia de la proteína Sxl el transcripto tra activa al gen transformer (tra) que activa la proteína Tra que en combinación de Transformer-2 (Tra-2) controla la presencia de los reguladores transcripcionales doublesex (dsx) y fruitless (fru), los cuales determinan la mayoría de los aspectos “femeninos” y “masculinos”. En las hembras Dsx^F determina las estructuras somáticas y morfología de la hembra, así como el sistema nervioso y el comportamiento de hembra (Barmina et al., 2005; Billeter et al., 2006).

En los machos de *Drosophila* el gen *tra* no es expresado. En ausencia de *tra*, los reguladores *dsx* y *fru* se convierten en proteínas funcionales de macho, *Dsx^M* determinan las estructuras somáticas y morfología externa del macho, mientras que *Fru^M* es requerido para formar sistema nervioso y comportamiento de macho (Billeter et al., 2006).

1.8.2 Mosaicos en *Drosophila*

El mosaicismo sexual o ginandromorfismo es el estado o condición de los individuos que pertenecen a una especie con sexos separados y distintos en cuanto aspecto, que en ciertas regiones o partes del cuerpo exhiben los caracteres masculinos, mientras que en las complementarias se muestran los del sexo femenino.

Con base en el mecanismo de la determinación del sexo de *Drosophila*, la presencia de un individuo con dos sexos se puede explicar de la siguiente manera. Si un cigoto femenino perdiera uno de sus cromosomas X en la primera división mitótica, las dos células resultantes tendrían la constitución XX y XO respectivamente. Así, una célula sería femenina y la otra masculina; cada una de estas células es responsable de la producción de todas las células hijas que constituirán bien el lado derecho o izquierdo del organismo durante la embriogénesis.

Así, un ginandromorfo bilateral muestra características masculinas en una de las mitades del cuerpo y características femeninas en la otra mitad, con una línea de unión de las dos partes tajantemente marcadas (Crew, 1965; Klug et al., 2006).

Si el evento que conduce a la pérdida de uno de los cromosomas X ocurre en una etapa posterior, el mosaico afectará regiones del cuerpo más pequeñas. Los mosaicos de menor tamaño están formados por sólo una célula.



Fig. 5: Ginandro bilateral en *Drosophila melanogaster*, lado izquierdo presenta estructuras de macho, lado derecho presenta estructuras de hembra (Tomado de Klug et al., 2006)

1.9 Prueba de integridad cromosómica en *Drosophila melanogaster*.

El uso de marcadores morfológicos en *Drosophila* es una herramienta con la cual se puede detectar si un compuesto tiene la capacidad de alterar tanto la integridad numérica (no disyunción y pérdida total), así como estructural (pérdida parcial) de los cromosomas. Debido a que la constitución genética de las moscas utilizadas es conocida, el seguimiento en las generaciones permite detectar los eventos de pérdida parcial de los marcadores, principalmente aquellos sobre el cromosoma Y y la pérdida total, sea del cromosoma X o Y.

El evento genético terminal es la pérdida parcial o total de cromosomas, básicamente por efectos clastógenicos y aneuploidias provocadas por pérdida o no disyunción de los cromosomas (Ramos, 1994). La pérdida de una parte del cromosoma Y es detectada por la ausencia de la expresión de un marcador (Zimmering, 1975).

La prueba de Integridad Cromosómica es informativa de posibles mecanismos de la acción de los mutágenos sobre la integridad cromosómica y el aparato mitótico (Ramos, 1994).

II. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, las empresas manufactureras han implementado metodologías para la regulación y gestión en manejo de residuos industriales peligrosos, buscando su reducción, minimización y reuso.

Lo anterior implica que debe promoverse la investigación, el desarrollo de metodologías y la realización de estudios que permitan determinar la factibilidad técnica y económica de las distintas opciones de manejo de los residuos peligrosos.

Es necesario validar metodologías que involucren sistemas biológicos, que sean sensibles y capaces de detectar cambios en el ambiente así como contar con biomarcadores en los que se reflejen los efectos de los contaminantes.

La mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* es un organismo cosmopolita, cuenta con diferentes mutantes con marcadores específicos que ayudan a evaluar diferente tipo de daño a nivel del ADN, presenta dimorfismo sexual, un ciclo de vida corto. Entre otras ventajas, es fácil de manejar y su costo de mantenimiento es bajo, lo que la hace un biomonitor efectivo, además de un organismo ideal para ser involucrado en programas de monitoreo ambiental, como los concernientes a la detección de la actividad genotóxica de compuestos químicos y mezclas complejas derivadas de las industrias.

Es por ello que la implementación de biomonitores es una alternativa necesaria para la determinación del riesgo ambiental que implica la exposición a compuestos químicos, mezclas complejas o una fuente de emisión particular (Dorantes, 2000), como el agua residual de diversas industrias manufactureras, una vez que se han implementado métodos de recuperación de contaminantes.

III. OBJETIVO GENERAL

Determinar si *Drosophila melanogaster* puede discriminar entre muestras complejas de agua, con diferente grado de contaminación, mediante la evaluación de diversos biomarcadores.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la cantidad de cromo total y cromo hexavalente contenida en el agua residual no tratada y tratada para recuperación de cromo de la curtidora “Curtidos Toluca S.A de C.V.”.
- Determinar la toxicidad de las muestras de agua a través del índice de sobrevivencia y de la proporción de sexos.
- Evaluar la genotoxicidad mediante la pérdida total o parcial de cromosomas sexuales inducida en moscas expuestas a dos muestras de agua de la curtidora “Curtidos Toluca S.A. de C.V.”.
- Evaluar la genotoxicidad mediante el número de hijos promedio de machos tratados.

IV. HIPÓTESIS

Debido a que la concentración de contaminantes, en las muestras de agua residuales es diferente, los biomarcadores evaluados mostraran diferencias con respecto a los del grupo testigo.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Muestra ambiental

En recipientes de un litro y medio de capacidad se colectaron muestras de agua residual de la peletera “Curtidos Toluca S.A de C.V.” antes y después del proceso de recuperación de cromo, las cuales fueron denominadas: 1) No tratada y 2) tratada, respectivamente. De cada tipo de agua residual se obtuvieron dos muestras, una para ser analizada mediante espectrofotometría de absorción atómica NMX – 051 y así determinar la concentración de cromo y otros metales pesados presentes y la otra como objeto de análisis biológico.

Las muestras fueron obtenidas en diferentes fechas, la primera se obtuvo cuando la peletera estaba en activo; la segunda, cuando la unidad se encontraba suspendida en sus labores.

5.2 Marcadores genéticos utilizados

Bar of Stone: B^s; X (1-57.0). Es un ojo limitado en forma de barra vertical, aproximadamente 90 omatidias en los machos y 70 en las hembras. Un ojo silvestre está formado por 740 omatidias en machos y 780 en hembras. Es un alelo dominante sobre el alelo silvestre (B^{s+}), la relación de dominancia de los alelos es $B^s > B^{s+}$ (Lindsley y Zimm, 1992).

forket: f; X (1-56.7). Las macroseñas y microseñas son afectados dependiendo del alelo presente, modificando la forma normal, a una forma de horquilla. La relación de dominancia es: $f^t > f$ (Lindsley y Zimm, 1992).

white apricot: w^a; X (1-1.5). Provoca una coloración rosa-durazno al ojo de la mosca. La dominancia alélica es: $w^+ > w^a$ (Lindsley y Zimm, 1992).

Fenotipo silvestre: y^+ . El color del cuerpo de la mosca adulta es gris-pardo con patrones de áreas claras y oscuras, éste es visiblemente más oscuro que el alelo y .

yellow² alelo alternativo de y . El cuerpo del adulto es color amarillo y con sedas negras (Lindsley y Zimm, 1992).

yellow: y ; X (1-0.0). El locus controla el pigmento melanótico de la cutícula de la mosca adulta y de ciertas piezas bucales. Esta mutación da al cuerpo una coloración amarilla, sedas pardas, venas y tricomas de las alas amarillas. La relación de dominancia es: $y^+ > y^2 > y$ (Lindsley y Zimm, 1992).

En el análisis biológico, se utilizó un sistema de cruza individuales, los progenitores cuentan con marcadores genéticos en los cromosomas sexuales, por lo que la presencia o ausencia de uno de los marcadores, expresados en la progenie esperada, permite inferir si hubo daño estructural o un error en la segregación de los cromosomas.

5.2.1 Línea de machos

Los machos tienen un cromosoma X en forma de anillo (X^{c2}), que contiene los alelos *yellow* y *forket* y un cromosoma Y compuesto ($B^s Y y^+$), que contiene dos translocaciones con marcadores del cromosoma X. En el brazo largo se encuentra el alelo *Bar of Stone*, y en el brazo corto está el alelo silvestre de *yellow⁺*. El genotipo de los machos es $X^{c2}, yf / B^s Y y^+$. Debido a la relación entre los alelos involucrados su fenotipo será cuerpo silvestre color gris-pardo, tricomas en horquilla y ojos en forma de barra de color rojo (Zimmering et al., 1986).

5.2.2 Línea de hembras

Las hembras tienen cromosomas libres y en varilla, son homocigóticas ($y^2 w^a / y^2 w^a$), por lo que el fenotipo es, cuerpo amarillo, sedas negras y ojo color rosadurazno (Zimmering et al., 1986).

5.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Obtención de larvas

La línea portadora de marcadores genéticos para la cruce y una línea silvestre Canton-s como testigo, fueron sincronizadas por un periodo de 8 horas en medio fresco, con el fin de homogenizar la edad de las larvas que serian sometidas al tratamiento con las muestras de agua.

Se obtuvieron larvas de 72 ± 4 hrs, mediante un gradiente de densidad con sacarosa al 20% (Nöthinger, 1970) lo cual hizo que las larvas, por tener menor densidad, se separaran del medio de cultivo y flotaran.

A partir de las muestras colectadas de agua residual, no tratada (100%) y tratada (100%) para recuperación de cromo, se realizaron diluciones sucesivas hasta obtener una concentración de 1.56% de cada una de las muestras. Como diluyente y lote testigo negativo se utilizó agua destilada.

Grupos de 70 a 100 larvas fueron colocadas en tubos de vidrio de ± 2 cm de diámetro, 10 cm de alto y fondo plano, conteniendo 1gr. de medio instantáneo para *Drosophila* (Carolina Biological supply), adicionado con 4.5 mililitros de la disolución de la muestra ambiental. Solo se aplicó el tratamiento a la línea de machos y a la línea silvestre. Para cada concentración de cada una de las muestras, no tratada y tratada, se utilizaron tres series (3 tubos). Se realizaron dos experimentos independientes.

Las larvas permanecieron en tratamiento subcrónico 72 x 48 hrs, hasta recuperar organismos adultos, posteriormente se obtuvo el índice de sobrevivencia (IS) (Arellano-Aguilar, 2002) como indicador preliminar de toxicidad y la Proporción de Sexos (PSx) como indicador preliminar de toxicidad dirigida a un sexo.

Para el desarrollo de la prueba de integridad cromosómica (Ramos, 1994), machos $X^{c2}, yf / B^s Y y^+$ recuperados del tratamiento subcrónico, fueron cruzados

con hembras con genotipo y^2w^a / y^2w^a vírgenes, no tratadas. El sistema de cruce fue individual y en proporción 2:1 (dos hembras con un macho) por tubo de vidrio en medio líquido estándar y para cada concentración y muestra, se utilizaron 15 cruces. Los progenitores fueron retirados a los 5 días para homogenizar el número de prole y los tubos fueron conservados hasta obtener organismos adultos.

5.4 Índice de sobrevivencia (IS) y Proporción de sexos (PSx)

Para obtener el (IS) se registró el número de hembras y machos por muestra / concentración / serie, para las líneas con marcadores genéticos y silvestre. El índice de sobrevivencia se estimó a partir de las moscas recuperadas de ambas muestras, a partir de la siguiente fórmula:

$\# \text{ Moscas del lote experimental} / \# \text{ moscas en el lote testigo} = \text{IS}$ (Arellano-Aguilar, 2002).

Una vez obtenido el IS para cada concentración de cada una de las tres series, se determinó el IS promedio por concentración.

La proporción de sexos (PSx) se obtuvo a partir de la siguiente fórmula:

$\# \text{ Total de machos} / \# \text{ total de machos y hembras por concentración} = \text{PSx}$

Con base en la proporción sexual de cada concentración de cada una de las tres series, se determinó la PSx promedio de cada una de las concentraciones.

Para establecer diferencias significativas en el IS y PSx entre grupos experimentales- testigo, se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA $\alpha=0.05$). En el caso de encontrar diferencias significativas, estas se identificaron mediante la prueba Tukey.

5.5 Análisis de la prueba de integridad cromosómica

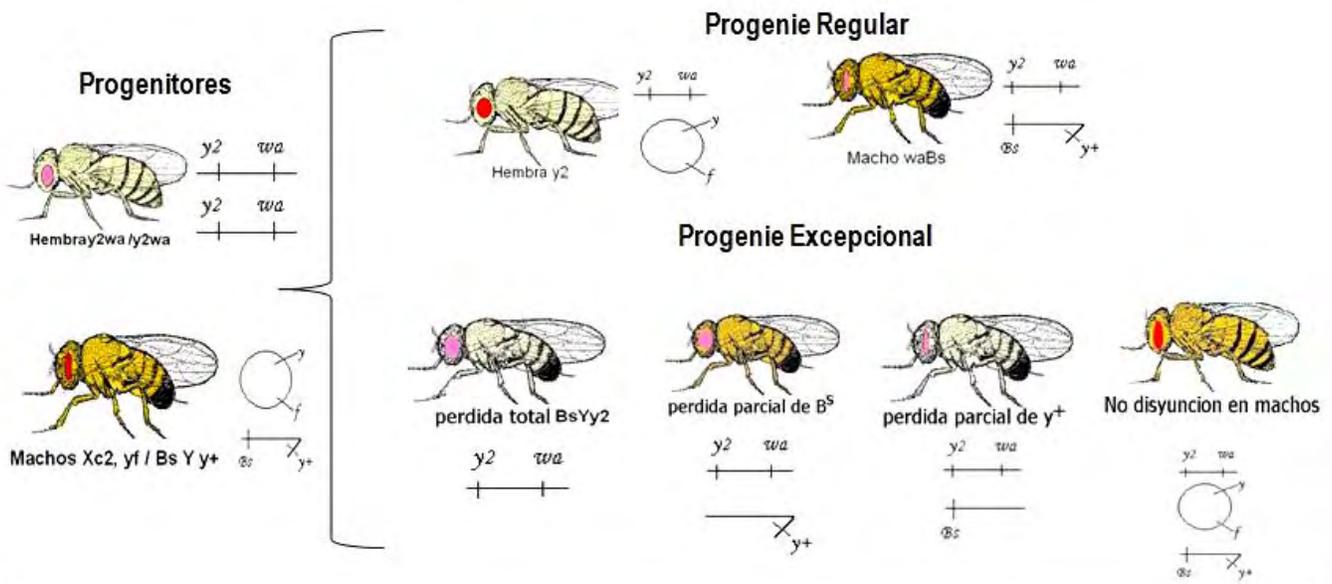
La progenie resultante de la cruce fue clasificada por sexo y con base al fenotipo en progenie regular y excepcional, así como por las alteraciones morfológicas en los organismos.

La progenie regular es aquella en la que no existe pérdida total o parcial y no disyunción de cromosomas sexuales, por lo que un macho (XY) presenta un genotipo $y^2w^a / B^s Y y^+$ y su fenotipo es color de cuerpo silvestre, ojos en barra color rosa-durazno; una hembra presenta un genotipo $y^2w^a / X^{c2}, yf$ y su fenotipo es cuerpo amarillo, sedas negras y ojos silvestres (Zimmering et al., 1986).

La progenie excepcional está formada por organismos que presentan alguno de los siguientes eventos. La pérdida total o la no disyunción del cromosoma Y en el que se encuentran los alelos $B^s Y y^+$, resulta un genotipo $y^2w^a / 0$ que producirá un macho (X0) con cuerpo amarillo y sedas negras, y ojos redondos color rosa-durazno (Ledezma, 2006).

Otro evento relacionado con un error de segregación en la meiosis del macho, da origen a un genotipo $y^2w^a / X^{c2} yf / B^s Y y^+$ que será una hembra (XX[^]Y) con fenotipo cuerpo silvestre y ojo en barra, rojo (Zimmering et al., 1986).

Cuando ocurre un evento como la pérdida parcial del cromosoma Y, pueden afectarse cualquiera de los alelos; si se afecta el alelo B^s , el genotipo es $y^2w^a / Y y^+$ que produciría un macho (XY), con fenotipo cuerpo silvestre, ojos redondos color rosa-durazno. En caso de pérdida del alelo y^+ , el genotipo es $y^2w^a / B^s Y$ que produce un macho (XY), con fenotipo cuerpo amarillo, sedas negras, ojo en barra, color rosa-durazno (Figura 6).



Relaciones alélicas

froked: $f^+ > f$. *yellow:* $y^+ > y^2 > y$. *Bar of stone:* $B^+ > B^s$ *white apricot:* $w^{a+} > w^a$

Fig. 6. Cruza de macho tratado con hembra no tratada con su progenie regular y excepcional, mostrando su genotipo y fenotipo (A partir de Ramos, 1994 y Ledezma 2006).

Los eventos genéticos, como pérdida parcial o total de cromosomas sexuales, resultan básicamente por efectos clastogénicos y la no disyunción por errores en la segregación de los cromosomas sexuales, los cuales ocurren durante una interferencia en el centrómero y/o las fibras del huso en la meiosis (Cuadro 4), donde una distribución anormal de los cromosomas, da como resultado gametos que tienen asimismo una distribución anormal de los cromosomas (Crew, 1965).

Cuadro 4. Fenotipos resultantes de la no disyunción en la primera división meiotica, segunda división meiotica y en ambas divisiones (a partir de Zimmering et al, 1986).

Meiosis en Machos	Gameto	♀ unión X	Fenotipo de la prueba SCLT
Gametos normales en una meiosis normal.	X	XX	Hembra y^2
	Y	XY	Macho w^aB^s
Gametos excepcionales en una No disyunción en la 1ra división meiotica.	XY	XXY	Hembra B^s
	0	XO	Macho y^2w^a
Gametos excepcionales de una No disyunción en la 2da división meiotica.	XX	XXX	Meta hembra con baja viabilidad
	YY	XYY	Macho w^aB^s
	0	XO	Macho y^2w^a

Además de la progenie resultante de la prueba de integridad cromosómica, se registraron organismos con alteraciones morfológicas, cuyo origen puede estar relacionado con la pérdida de cromosomas sexuales durante las primeras divisiones mitóticas, por lo que las dos células resultantes tendrán una constitución diferente. Estos organismos expresan caracteres morfológicos tanto masculinos como femeninos. Por lo que son denominados ginandromorfos o mosaicos sexuales (Crew, 1965; Klug et al., 2006).

VI. RESULTADOS

Análisis fisicoquímicos de la muestra residual no tratada y tratada.

Las dos muestras de la peletera fueron enviadas al laboratorio, Estudios y Análisis ambientales S.A. de C.V., donde fueron procesadas por espectrofotometría de absorbancia atómica para determinar la cantidad de cromo total y cromo hexavalente (Tabla I).

Tabla I. Determinación de la cantidad (promedio \pm desviación estándar en mg/L) de Cr total y hexavalente de las dos muestras mediante espectrofotometría de absorbancia atómica.

<i>Muestra</i>	<i>Muestra 1</i>		<i>Muestra 2</i>	
	Cr total (mg/L) \pm D.e	Cr (VI) (mg/L) \pm D.e	Cr total (mg/L) \pm D.e	Cr (VI) (mg/L) \pm D.e
Residual no tratada	57.5 \pm 10.5	0.05 \pm 0.01	270 \pm 70	0.14 \pm 0.04
Tratada	7.7 \pm 0.00	0.04 \pm 0.00	11.5 \pm 0.005	0.03 \pm 0.00

Los límites máximos permisibles (NOM-CCA-021-ECOL/1993) de cromo total y hexavalente en descargas de aguas de la industria de la curtiduría se muestran en la tabla II. En la muestra 1 las concentraciones de cromo total y hexavalente fueron mayores. En la muestra 2 las concentraciones de cromo total fueron mayores en comparación con la muestra 1 y los LMP.

Tabla II. NOM-CCA-021-ECOL/1993. Límites máximos permisibles (LMP) de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la industria del curtido y acabado en pieles.

Parámetros	<i>Límites Máximos Permisibles</i>	
	Promedio diario* (mg/L)	Instantáneo** (mg/L)
Cr total	1.0	1.5
Cr (VI)	0.1	0.2

*Promedio diario= rango y concentraciones de los parámetros que debe cumplir, en función del análisis de muestras compuestas de las aguas residuales provenientes de esta industria.

**Instantáneo= rangos y concentraciones de los parámetros que debe cumplir, en función del análisis de muestras instantáneas de las aguas residuales provenientes de esta industria.

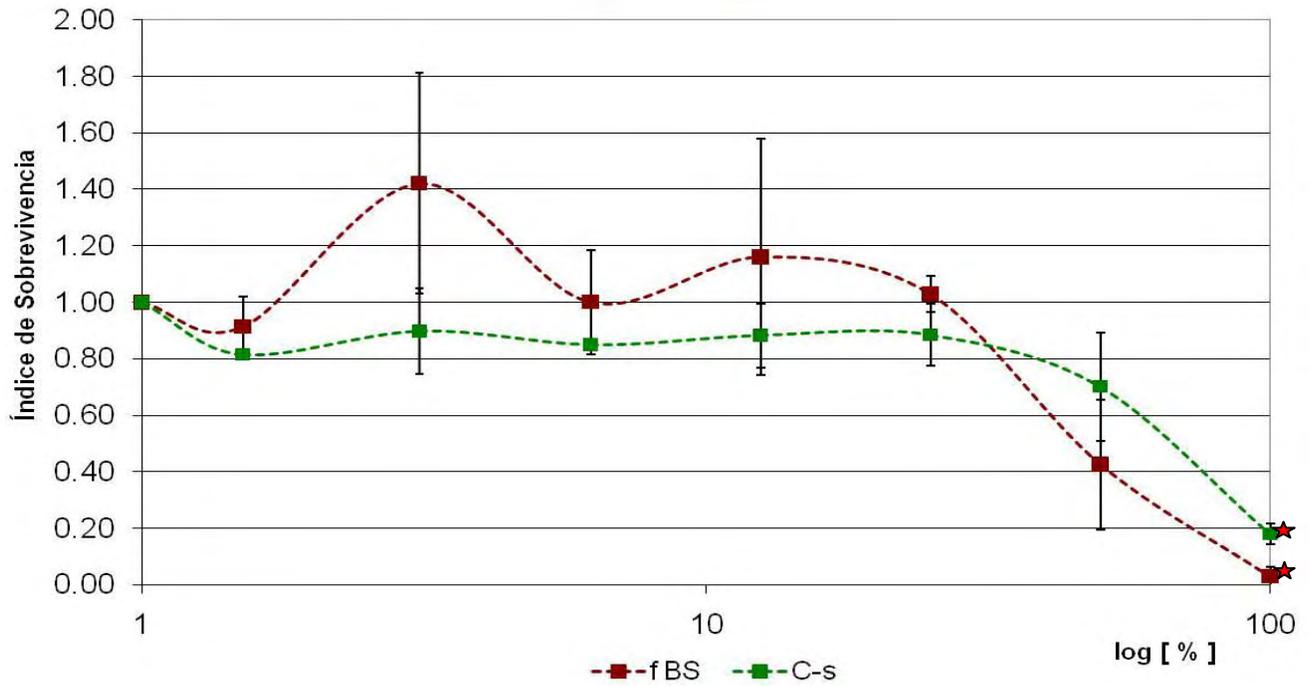
6.1 Índice de sobrevivencia

Como primer biomarcador para evaluar la toxicidad de las muestras en *Drosophila melanogaster* se obtuvo el índice de sobrevivencia (Tabla III y IV).

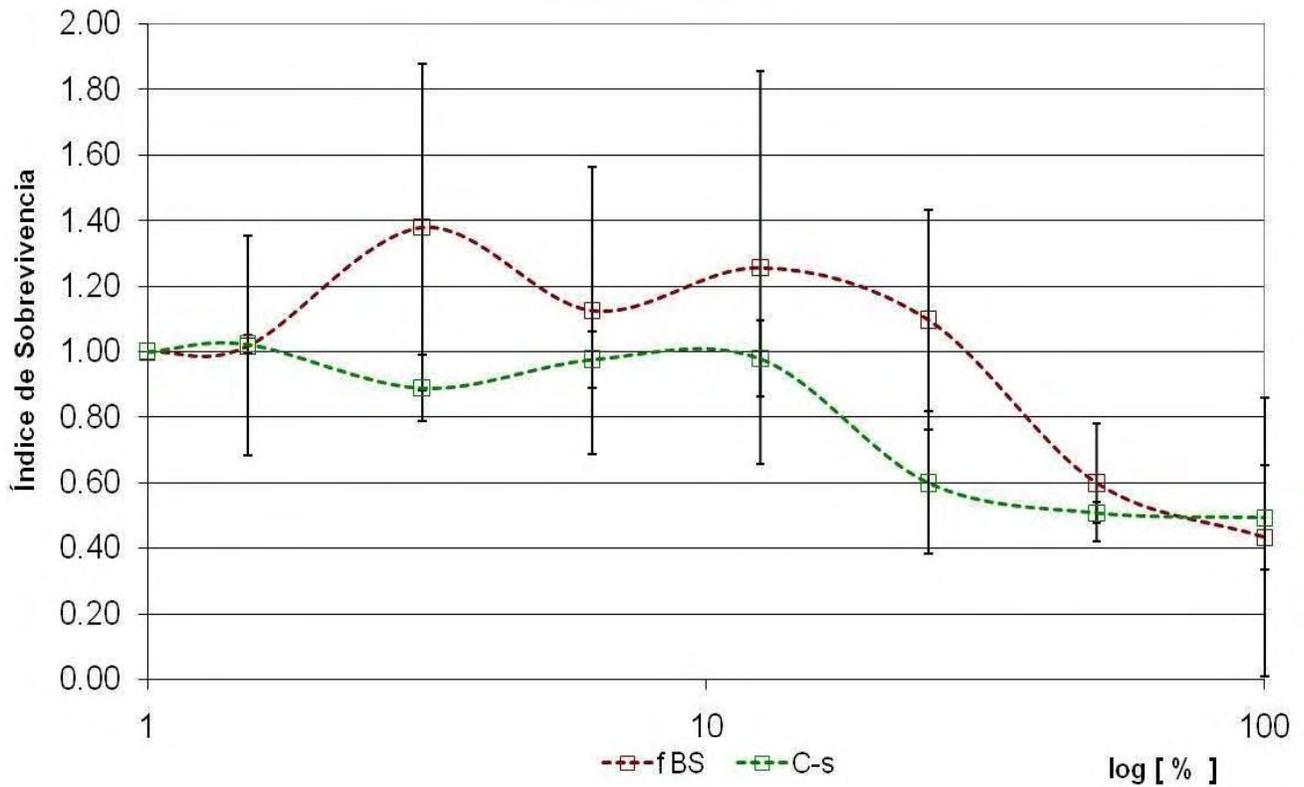
Tabla III. Índice de Sobrevivencia (IS) y Proporción Sexual (PSx) de las moscas silvestres y portadoras de marcadores genéticos expuestas a la muestra 1 residual no tratada y tratada para recuperación de cromosoma (promedio \pm error estándar).

[%]	Residual no tratada						Residual tratada					
	C-s			fBs			C-s			fBs		
	n	IS	Psex	n	IS	Psex	n	IS	Psex	n	IS	Psex
0	102	1.00 \pm 0.00	0.52 \pm 0.05	66	1.00 \pm 0.00	0.58 \pm 0.11	100	1.00 \pm 0.00	0.53 \pm 0.04	86	1.00 \pm 0.00	0.68 \pm 0.08
1.51	83	0.82 \pm 0.02	0.54 \pm 0.11	60	0.91 \pm 0.11	0.61 \pm 0.06	102	1.02 \pm 0.03	0.53 \pm 0.05	74	1.02 \pm 0.34	0.61 \pm 0.08
3.1	90	0.9 \pm 0.15	0.58 \pm 0.05	92	1.42 \pm 0.39	0.62 \pm 0.10	88	0.89 \pm 0.10	0.42 \pm 0.03	95	1.38 \pm 0.50	0.62 \pm 0.07
6.25	87	0.85 \pm 0.01	0.55 \pm 0.06	67	1.00 \pm 0.19	0.59 \pm 0.08	98	0.98 \pm 0.08	0.47 \pm 0.04	73	1.13 \pm 0.44	0.62 \pm 0.11
12.5	91	0.88 \pm 0.11	0.46 \pm 0.14	78	1.16 \pm 0.42	0.79 \pm 0.05	97	0.98 \pm 0.12	0.41 \pm 0.03	82	1.26 \pm 0.60	0.58 \pm 0.06
25	90	0.89 \pm 0.11	0.43 \pm 0.08	68	1.03 \pm 0.06	0.75 \pm 0.07	59	0.6 \pm 0.22	0.39 \pm 0.07	76	1.1 \pm 0.34	0.56 \pm 0.03
50	70	0.7 \pm 0.19	0.43 \pm 0.02	27	0.43 \pm 0.23	0.79 \pm 0.12	51	0.51 \pm 0.03	0.52 \pm 0.08	43	0.6 \pm 0.18	0.61 \pm 0.12
100	18	0.18 \pm 0.04	0.57 \pm 0.09	2	0.03 \pm 0.04	0.17 \pm 0.20	49	0.49 \pm 0.16	0.51 \pm 0.15	22	0.43 \pm 0.42	0.96 \pm 0.05

La tabla III muestra el IS de las moscas (promedio \pm ee) expuestas a la muestra residual no tratada y tratada para recuperación de cromosoma. Se encontraron diferencias significativas en el IS en las concentraciones 50 y 100% de moscas silvestre (C-s) y moscas portadoras de marcadores (*fB^s*) en la muestra residual no tratada con respecto a su testigo (ANOVA; $p < 0.05$). Las moscas con marcadores genéticos (*fB^s*) fueron más afectadas que las moscas silvestres (C-s). El IS mostró diferencias entre la muestra residual no tratada y tratada donde el número de organismos recuperados fue mayor incluso en las concentraciones que mostraron mayor toxicidad (Gráficas 1 y 2).



Gráfica 1. Índice de Supervivencia (promedio \pm ee) de la muestra 1 residual no tratada. ★ ($p < 0.05$, con respecto a su testigo).

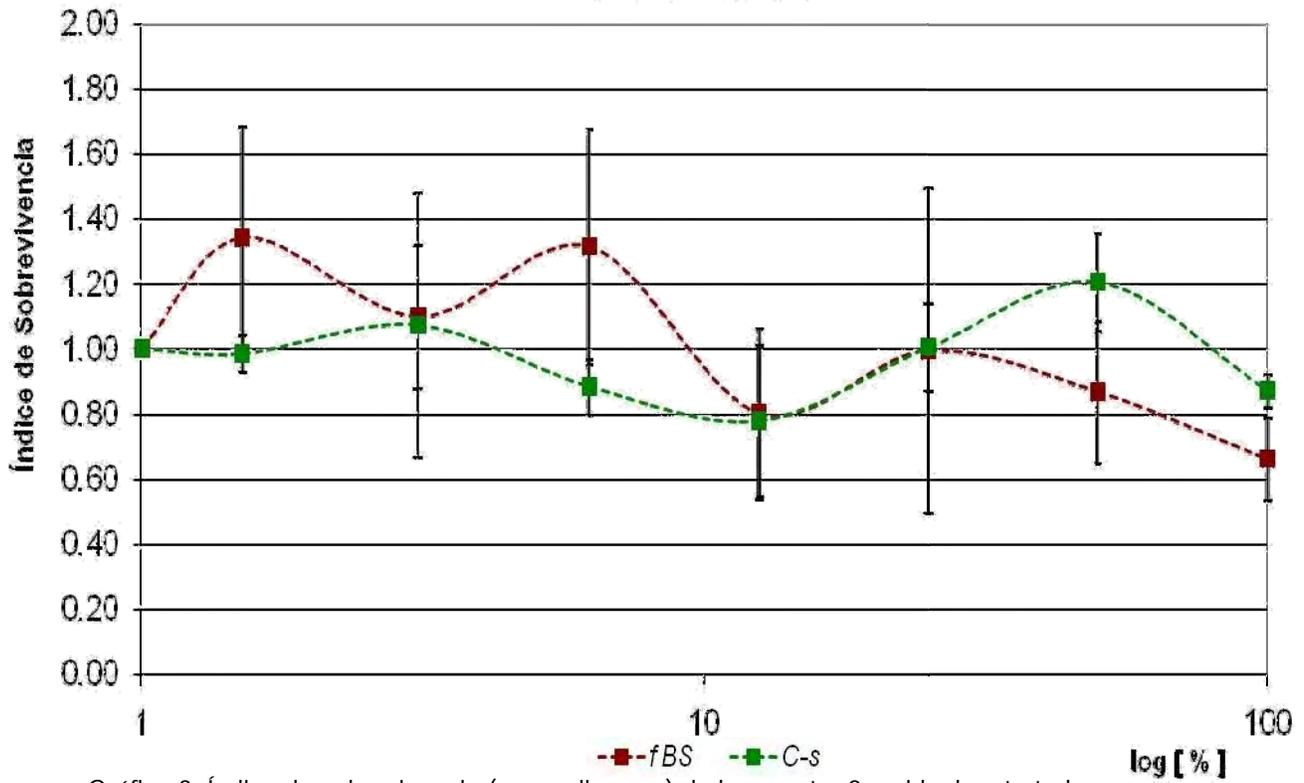


Gráfica 2. Índice de Supervivencia (promedio \pm ee) de la muestra 1 residual tratada.

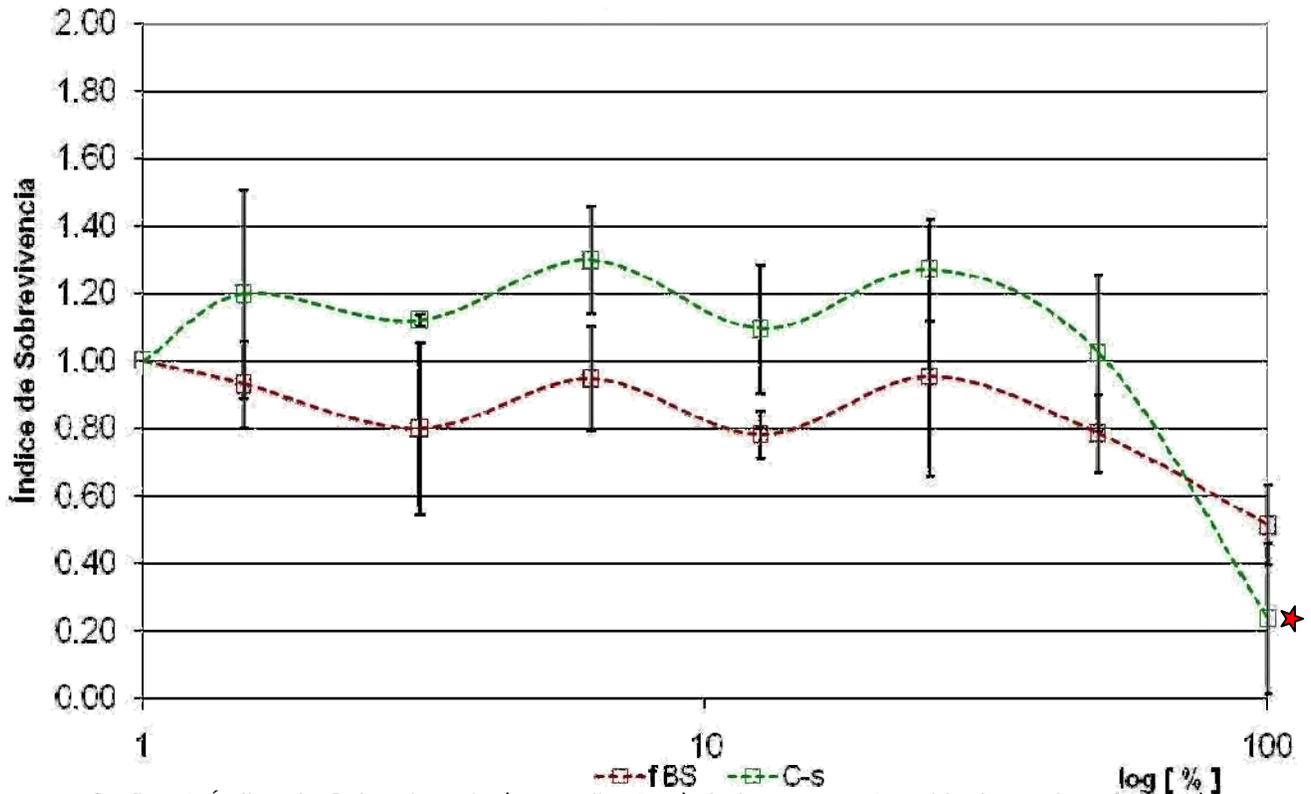
Para la muestra 2, no se registró pérdida significativa de moscas en la muestra residual no tratada (ANOVA; $p > 0.05$). En la tabla IV se muestra que la exposición al agua residual tratada tiene un efecto tóxico en las moscas silvestres (C-s) en la concentración 100%. El IS mostró que en el agua tratada se recuperaron más organismos en comparación con la muestra no tratada (Graficas 3 y 4).

Tabla IV. Índice de Sobrevivencia (IS) y Proporción Sexual (PSx) de las moscas silvestres y portadoras de marcadores genéticos expuestas a la muestra 2 residual no tratada y tratada para recuperación de cromo (promedio \pm error estándar).

[%]	Residual no tratada						Residual tratada					
	C-s			f Bs			C-s			f Bs		
	n	IS	Psex	n	IS	Psex	n	IS	Psex	n	IS	Psex
0	76	1.00 \pm 0.00	0.43 \pm 0.08	130	1.00 \pm 0.00	0.51 \pm 0.10	76	1.00 \pm 0.00	0.37 \pm 0.12	137	1.00 \pm 0.00	0.52 \pm 0.04
1.51	74	0.98 \pm 0.06	0.47 \pm 0.11	164	1.34 \pm 0.34	0.49 \pm 0.05	87	1.2 \pm 0.31	0.44 \pm 0.02	127	0.93 \pm 0.13	0.53 \pm 0.04
3.1	75	1.07 \pm 0.41	0.39 \pm 0.07	136	1.1 \pm 0.22	0.54 \pm 0.03	85	1.12 \pm 0.02	0.48 \pm 0.03	106	0.8 \pm 0.26	0.48 \pm 0.07
6.25	67	0.88 \pm 0.09	0.47 \pm 0.02	160	1.31 \pm 0.36	0.64 \pm 0.05	97	1.3 \pm 0.16	0.44 \pm 0.03	130	0.95 \pm 0.15	0.60 \pm 0.09
12.5	56	0.78 \pm 0.23	0.37 \pm 0.03	96	0.8 \pm 0.26	0.44 \pm 0.07	81	1.1 \pm 0.19	0.41 \pm 0.03	106	0.78 \pm 0.07	0.59 \pm 0.08
25	74	1.01 \pm 0.14	0.33 \pm 0.08	114	1.00 \pm 0.50	0.53 \pm 0.05	95	1.27 \pm 0.15	0.46 \pm 0.10	125	0.96 \pm 0.30	0.54 \pm 0.08
50	89	1.21 \pm 0.15	0.50 \pm 0.03	106	0.87 \pm 0.22	0.61 \pm 0.03	75	1.02 \pm 0.23	0.57 \pm 0.13	106	0.79 \pm 0.12	0.59 \pm 0.08
100	66	0.87 \pm 0.05	0.52 \pm 0.03	82	0.66 \pm 0.13	0.64 \pm 0.12	15	0.24 \pm 0.22	0.67 \pm 0.20	69	0.51 \pm 0.12	0.62 \pm 0.09



Gráfica 3. Índice de sobrevivencia (promedio \pm ee) de la muestra 2 residual no tratada.



Gráfica 4. Índice de Sobrevivencia (promedio \pm ee) de la muestra 2 residual tratada. ★ ($p < 0.05$) con respecto al testigo.

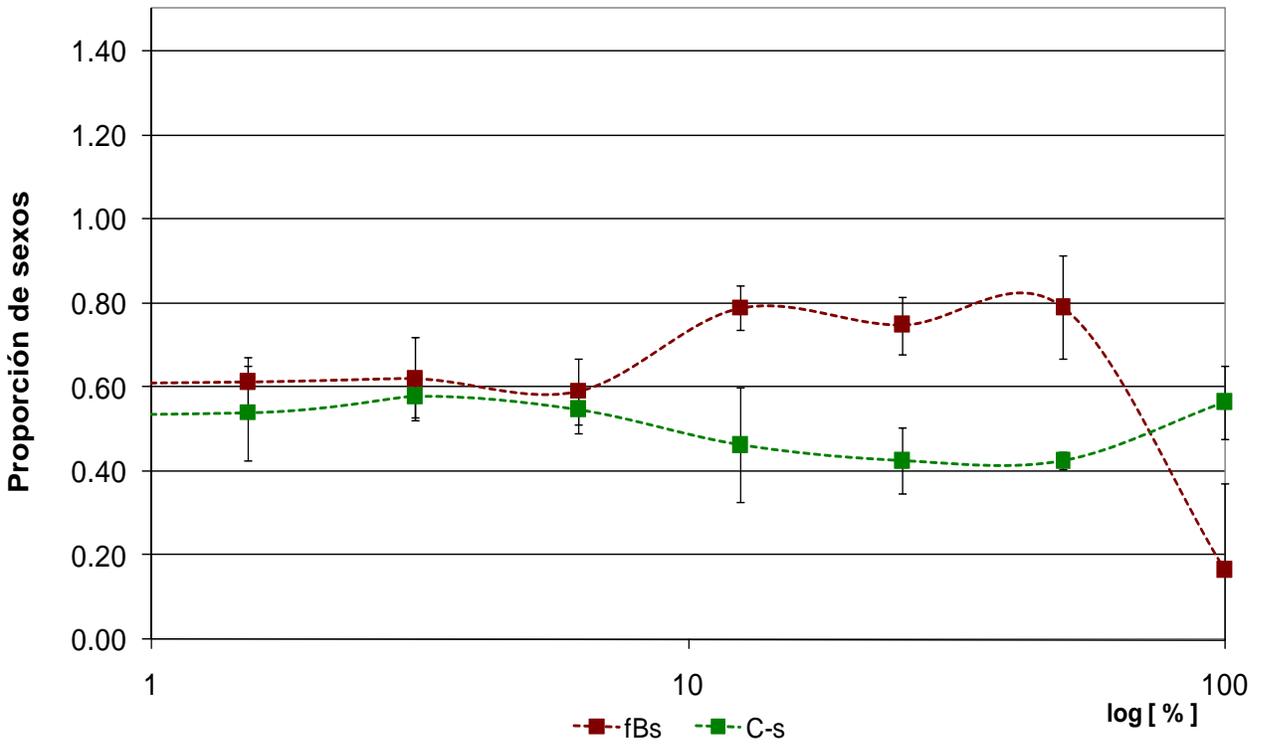
6.2 Proporción de sexos (PSx)

Se evaluó si se presentaba efecto del tratamiento en un sexo en específico comparando la proporción de machos recuperados con el total de moscas recuperadas en cada concentración. Esto se determinó como: total machos / total machos y hembras por concentración = PSx (Tablas V y VI).

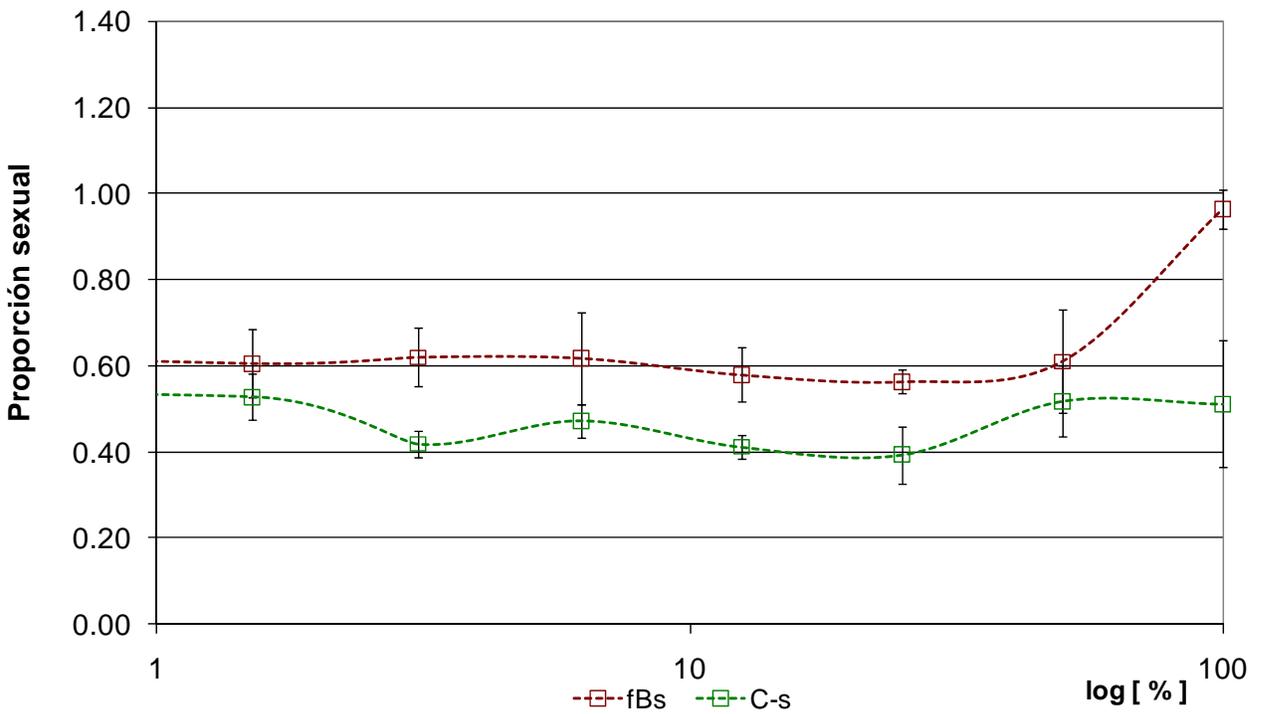
En la muestra 1, no se encontraron diferencias significativas entre el número de machos recuperados en las diferentes concentraciones con respecto a su testigo (ANOVA; $p > 0.05$) (Gráfica 5 y 6). Sin embargo, en la muestra residual no tratada se observa que en las concentraciones 12.5, 25 y 50% se recuperó un número menor de machos silvestres mientras que se recuperaron mayor número de machos con marcadores genéticos en las mismas concentraciones. En cuanto a la muestra tratada, la cantidad de machos silvestres recuperados en el intervalo de concentraciones 3.1 a 100% fue menor al número de machos con marcadores genéticos recuperados (Tabla V).

Tabla V. Proporción de sexos \pm error estándar, en los machos silvestres y portadores de marcadores genéticos, para la muestra 1 residual no tratada y tratada para recuperación de cromo.

[%]	Residual no tratada				Residual tratada			
	C-s		f Bs		C-s		f Bs	
	n	Psx	n	Psx	n	Psx	n	Psx
0	102	0.52 \pm 0.05	66	0.58 \pm 0.11	100	0.53 \pm 0.04	86	0.68 \pm 0.08
1.51	83	0.54 \pm 0.11	60	0.61 \pm 0.06	102	0.53 \pm 0.05	74	0.61 \pm 0.08
3.1	90	0.58 \pm 0.05	92	0.62 \pm 0.10	88	0.42 \pm 0.03	95	0.62 \pm 0.07
6.25	87	0.55 \pm 0.06	67	0.59 \pm 0.08	98	0.47 \pm 0.04	73	0.62 \pm 0.11
12.5	91	0.46 \pm 0.14	78	0.79 \pm 0.05	97	0.41 \pm 0.03	82	0.58 \pm 0.06
25	90	0.43 \pm 0.08	68	0.75 \pm 0.07	59	0.39 \pm 0.07	76	0.56 \pm 0.03
50	70	0.43 \pm 0.02	27	0.79 \pm 0.12	51	0.52 \pm 0.08	43	0.61 \pm 0.12
100	18	0.57 \pm 0.09	2	0.17 \pm 0.20	49	0.51 \pm 0.15	22	0.96 \pm 0.05



Gráfica 5. Proporción sexual (promedio ± ee) de la muestra 1 residual tratada.

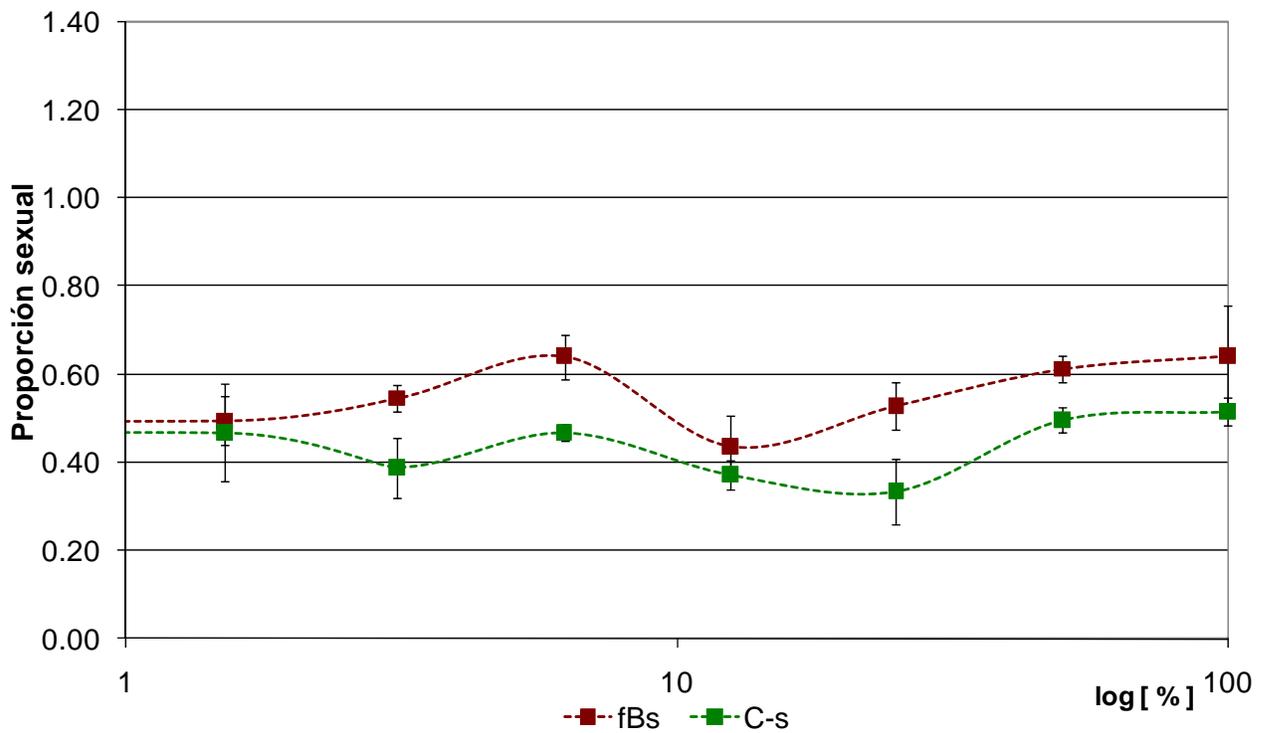


Gráfica 6. Proporción sexual (promedio ± ee) de la muestra 1 residual tratada.

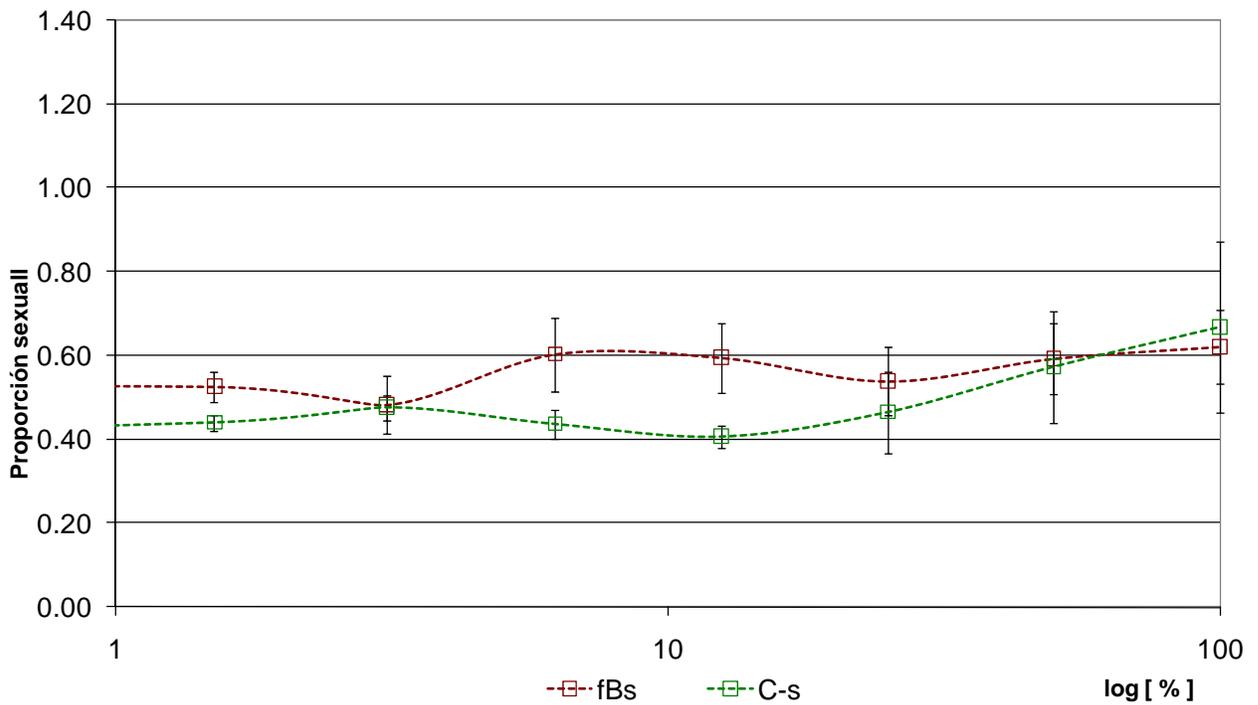
En cuanto a la muestra 2 no se encontraron diferencias significativas en la proporción de sexos de las moscas expuestas (ANOVA $p > 0.05$) (Gráficas 7 y 8). En la muestra residual no tratada en la concentración 25% se recuperó un número menor de machos silvestres en comparación con los machos portadores de marcadores genéticos. En cuanto a la muestra residual tratada, en el lote testigo y en la concentración 6.25%, se recuperó un número menor de machos en comparación con los machos portadores de marcadores genéticos (Tabla VI).

Tabla VI. Proporción de sexos \pm error estándar, en los machos silvestres y portadores de marcadores genéticos, para la muestra 2 residual no tratada y tratada para recuperación de cromosomas.

[%]	Residual no tratada				Residual tratada			
	C-s		f Bs		C-s		f Bs	
	n	Psx	n	Psx	n	Psx	n	Psx
0	76	0.43 \pm 0.08	130	0.51 \pm 0.10	76	0.37 \pm 0.12	137	0.52 \pm 0.04
1.51	74	0.47 \pm 0.11	164	0.49 \pm 0.05	87	0.44 \pm 0.02	127	0.53 \pm 0.04
3.1	75	0.39 \pm 0.07	136	0.54 \pm 0.03	85	0.48 \pm 0.03	106	0.48 \pm 0.07
6.25	67	0.47 \pm 0.02	160	0.64 \pm 0.05	97	0.44 \pm 0.03	130	0.60 \pm 0.09
12.5	56	0.37 \pm 0.03	96	0.44 \pm 0.07	81	0.41 \pm 0.03	106	0.59 \pm 0.08
25	74	0.33 \pm 0.08	114	0.53 \pm 0.05	95	0.46 \pm 0.10	125	0.54 \pm 0.08
50	89	0.50 \pm 0.03	106	0.61 \pm 0.03	75	0.57 \pm 0.13	106	0.59 \pm 0.08
100	66	0.52 \pm 0.03	82	0.64 \pm 0.12	15	0.67 \pm 0.20	69	0.62 \pm 0.09



Gráfica 7. Proporción sexual (promedio \pm ee) de la muestra 2 residual tratada.



Gráfica 8. Proporción sexual (promedio \pm ee) de la muestra 2 residual tratada.

6.3 Prueba de integridad cromosómica

Con base en los marcadores utilizados se registró la progenie regular y la excepcional producida por errores en la segregación durante la meiosis de los organismos tratados o por rompimiento de los cromosomas sexuales.

Para la muestra 1, la progenie total (n) recobrada en el tratamiento con agua residual no tratada, fue menor conforme la concentración está menos diluida (Tabla VII). En la progenie excepcional recuperada, se presentó pérdida total del cromosoma Y, principalmente. También se registraron organismos ginandromorfos bilaterales. El mayor número de alteraciones se encuentra en las concentraciones 12.5 y 25%.

La fertilidad de los machos tratados fue similar entre las concentraciones, mostrando una ligera disminución en la progenie recuperada en las concentraciones 3.1, 6.25, 12.5, 25 y 50 %. Sin embargo, sólo en la concentración 100% el único macho recuperado del tratamiento generó un mayor número de progenie.

Tabla VII. Progenie recobrada de la cruce de 15 machos tratados con Muestra1 Residual no tratada, con hembras vírgenes no tratadas. TL: pérdida total de un cromosoma; ND: no disyunción en machos progenitores; Otros eventos: son organismos producto de un error en segregación.

[%]	n♂	n	Prog.prom	P. regular		P. excepcional		Otros		Total alt.	Frec
			prom±ee	♀y2	♂waBs	TL (♂y2wa)	♂ND (♀Bs)	Gin y2/y2wa	Otro		
0	13	435	29.00± 3.57	237	187	8	0	0	3	11	0.025
1.51	15	382	25.40± 2.16	197	176	6	0	0	3	9	0.024
3.1	11	333	22.20± 3.84	189	136	6	0	2	0	8	0.024
6.25	12	345	23.00± 3.36	178	157	6	0	0	4	10	0.029
12.5	12	407	27.86± 2.50	206	187	7	0	3	4	14	0.034
25	13	363	24.20± 1.69	206	146	7	1	0	3	11	0.030
50	15	346	22.33± 4.35	192	145	5	0	0	4	9	0.026
100	1*	60	60	33	26	1	0	0	0	1	0.017
Total		2671		1438	1160	46	1	5	21	73	

*Este valor solo corresponde a un dato.

La progenie total (n) recobrada de la muestra 1 tratada se muestra en la tabla VIII. En las concentraciones 3.1 a la concentración 100%, el número de progenie promedio aumentó con respecto al testigo. La progenie excepcional recobrada fue en su mayoría producida por pérdida total del cromosoma Y, también registrándose organismos ginandromorfos, así como organismos que podrían ser producto de la pérdida de cromosomas sexuales durante las primeras divisiones mitóticas. En las concentraciones 50 y 100%, se ubicó el mayor número de alteraciones.

Tabla VIII. Progenie recobrada de la cruce de machos tratados con Muestra 1 Tratada, con hembras vírgenes no tratadas. TL: pérdida total de un cromosoma; ND: no disyunción en machos progenitores.

[%]	n♂	n	Prog.prom	P. regular		P. excepcional		Otros		Total alt.	Frec
			prom±ee	♀y2	♂waBs	TL (♂y2wa)	♂ND (♀Bs)	Gin y2/y2wa	Otro		
0	15	496	33.06± 3.85	276	209	8	1	1	1	11	0.022
1.51	10	509	33.93± 6.7	279	221	7	0	1	1	9	0.018
3.1	15	644	43.00± 3.2	358	271	11	1	1	2	15	0.023
6.25	14	630	42.00± 4.47	345	264	18	1	1	1	21	0.033
12.5	15	580	38.73± 3.74	321	246	9	0	0	4	13	0.022
25	13	644	43.06± 6.09	380	243	16	1	0	4	21	0.033
50	15	958	63.86± 3.06	538	391	16	1	5	7	29	0.030
100	14	936	62.46 ± 6.40	527	383	20	0	3	3	26	0.028
Total		5397		3024	2228	105	5	12	23	145	

Fecundidad de los machos tratados con la muestra 1

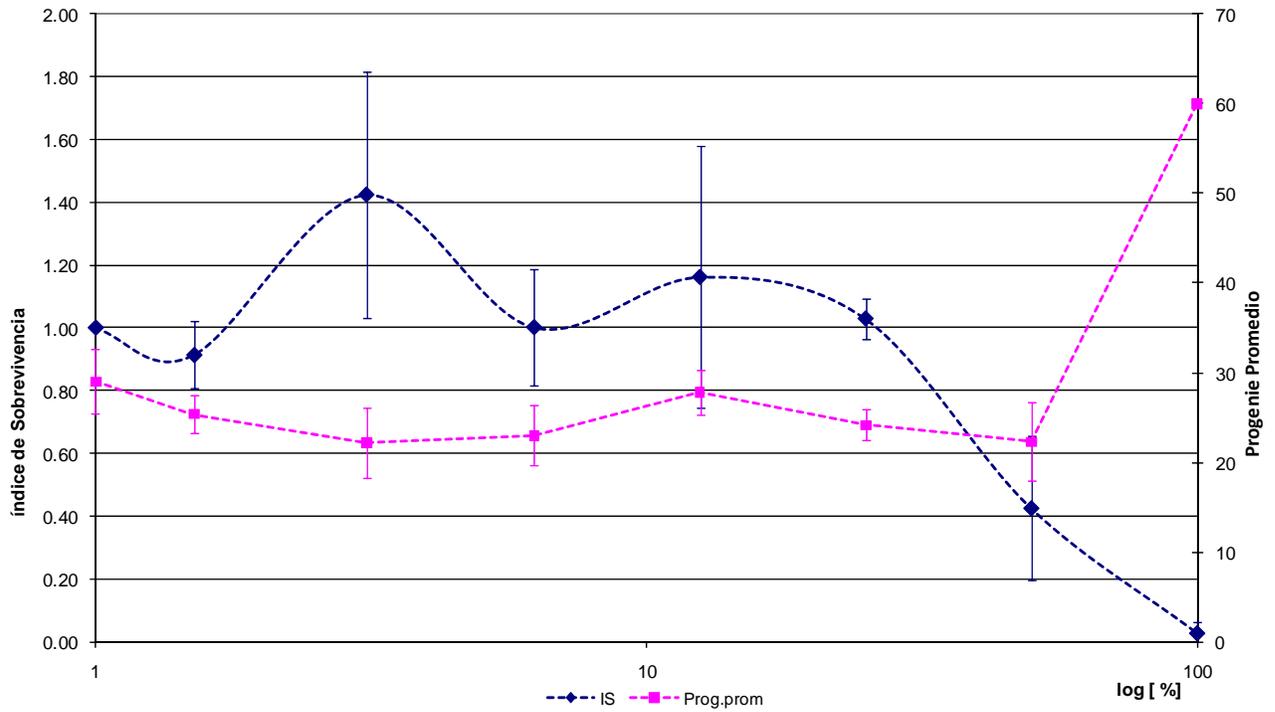
El uso de cruzas individuales permite visualizar la fertilidad y la progenie de cada uno de los machos independientemente para evaluar si los tratamientos están evidenciando la susceptibilidad individual.

La progenie promedio por macho, tiende a disminuir conforme la concentración está menos diluida en la muestra residual no tratada (Tabla IX); en contraste, la progenie promedio por macho de la muestra tratada tiende a aumentar con la concentración más completa, en comparación con su grupo testigo. La fertilidad de los machos fue afectada con la muestra residual no tratada ya que la progenie promedio disminuyó, no así para la concentración 100% donde se registró el mayor número de progenie. La muestra tratada afectó de manera diferente a la fertilidad, ya que la progenie promedio aumentó con respecto a su testigo; en las concentraciones 50 y 100% se registró el mayor número de progenie por macho. Se encontraron diferencias significativas entre ambas muestras en la concentración 50% (ANOVA, $p < 0.05$) Gráficas 9 y 10.

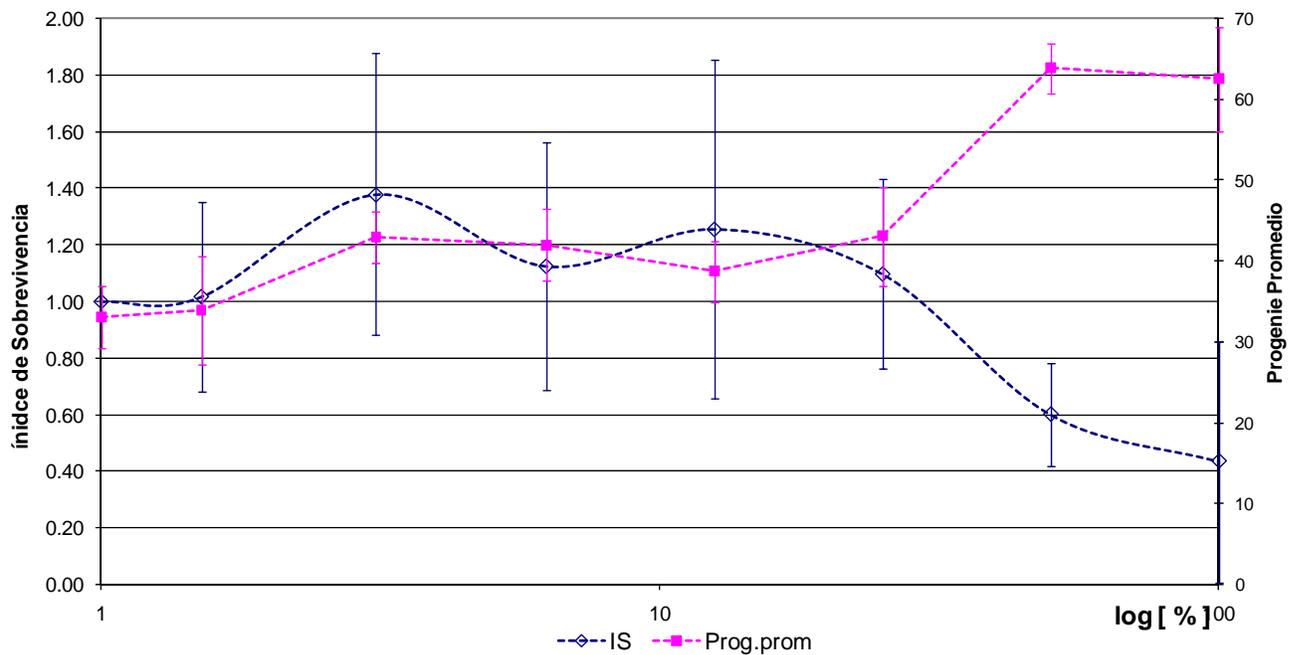
Tabla IX: Progenie promedio por macho tratado (prom \pm ee) diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.05$) en negritas.

[]	Residual no tratada			Residual tratada		
	♂	n	Prog. Prom	♂	n	Prog. Prom
0	13	435	29.00 \pm 3.57	15	496	33.06 \pm 3.85
1.51	15	382	25.40 \pm 2.16	10	509	33.93 \pm 6.7
3.1	11	333	22.20 \pm 3.84	15	645	43.00 \pm 3.2
6.25	12	345	23.00 \pm 3.36	14	582	42.00 \pm 4.47
12.5	15	418	27.86 \pm 2.50	15	581	38.73 \pm 3.74
25	13	363	24.20 \pm 1.69	13	646	43.06 \pm 6.09
50	15	336	22.33\pm 4.35	15	959	63.86\pm 3.06
100	1*	60	60	14	933	62.46 \pm 6.40

*Este valor corresponde solo a un dato.



Gráfica 9. Muestra 1 Residual no tratada. Índice de sobrevivencia y progenie promedio por macho



Gráfica 10. Muestra 1 Tratada. Índice de sobrevivencia y progenie promedio por macho.

En cuanto a la Muestra 2 residual no tratada, la progenie total (n) recobrada, fue mayor que la progenie total (n) recobrada en el grupo testigo (Tabla X). La progenie excepcional recuperada fue en su mayoría producida por pérdida total del cromosoma Y. Además, también fueron registrados organismos ginandromorfos y organismos que podrían ser producto de la pérdida de cromosomas sexuales durante las primeras divisiones mitóticas. En las concentraciones 12.5, 25 y 100% se registró el mayor número de alteraciones.

Tabla X. Progenie recobrada de la cruce de machos tratados con Muestra 2 Residual no tratada con hembras vírgenes no tratadas. TL: pérdida total de un cromosoma; PLBs: pérdida parcial del marcador Bs; ND: no disyunción del macho progenitor.

[%]	n♂	n	Prog.prom	P. regular		P. excepcional			Otros		Total alt	Frec
			prom±ee	♀y2	♂waBs	TL (♂y2wa)	PLBs (♂wa)	♂ND (♀Bs)	Gin y2/y2wa	Otro		
0	11	295	21.00± 4.47	170	116	5	0	3	0	1	9	0.031
1.51	13	449	29.93± 4.67	250	190	8	0	0	1	0	9	0.020
3.1	12	335	22.33± 3.77	190	137	5	0	0	2	1	8	0.024
6.25	13	444	29.73± 4.32	249	183	4	0	1	4	3	12	0.027
12.5	15	546	36.4± 3.54	282	247	10	0	3	2	2	17	0.031
25	14	437	29.93± 3.55	220	202	10	0	1	3	1	15	0.034
50	13	507	33.8± 5.08	270	225	8	1	1	1	1	12	0.024
100	14	443	29.53± 3.28	263	165	13	0	0	0	2	15	0.034
Total		3456		1894	1465	63	1	9	13	11	97	

En la progenie total (n) registrada en la Muestra 2 tratada se observó que en las concentraciones 12.5 y 25% fue mayor el número de progenie recuperada con respecto a las demás concentraciones (Tabla XI). El evento de pérdida total del cromosoma Y en la progenie excepcional fue mayormente registrado así como organismos ginandromorfos y organismos que pudieron haber sido producto de la pérdida de cromosomas sexuales durante las primeras divisiones mitóticas. En las concentraciones 12.5 y 25% se encontró el mayor número de alteraciones registradas.

Tabla XI. Progenie recobrada de la crusa de machos tratados con Muestra 2 Tratada con hembras vírgenes no tratadas. TL: pérdida total de un cromosoma; PLBs: pérdida parcial del marcador Bs; ND: no disyunción del macho progenitor.

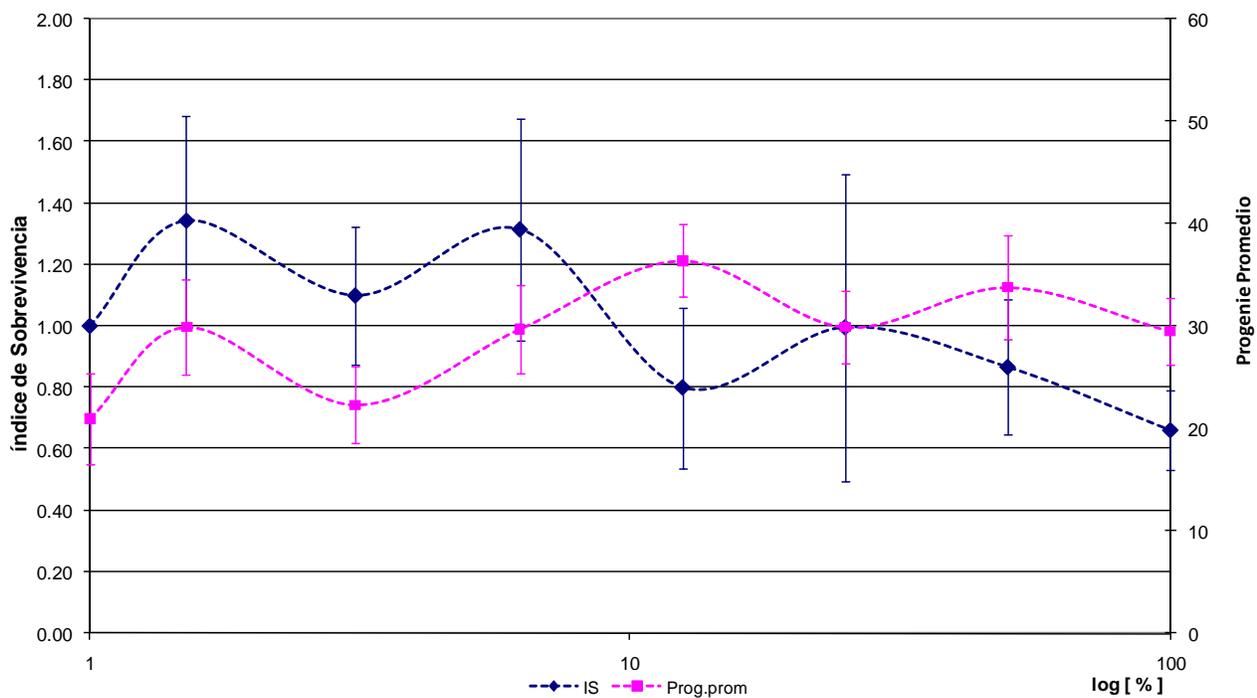
[%]	n♂	n	Prog.prom	P. regular		P. excepcional			Otros		Total alt	Frec
			prom±ee	♀y2	♂waBs	TL (♂y2wa)	PLBs (♂wa)	♂ND (♀ Bs)	Gin y2/y2wa	Otro		
0	14	522	34.86± 4.19	295	218	7	0	1	0	1	9	0.017
1.51	14	500	33.33± 3.94	281	209	10	0	0	0	0	10	0.020
3.1	15	478	31.60± 2.84	274	201	1	0	1	0	1	3	0.006
6.25	14	558	37.2± 3.78	296	247	12	0	0	1	2	15	0.027
12.5	15	722	48.2± 2.76	387	315	12	1	1	1	5	20	0.028
25	15	615	42.8± 3.13	296	302	12	0	2	1	2	17	0.028
50	12	432	29.86± 4.53	252	166	10	0	1	1	2	14	0.032
100	15	595	39.6± 3.57	346	240	8	0	1	0	0	9	0.015
Total		4422		2427	1898	72	1	7	4	13	97	

Fecundidad de los machos tratados con la muestra 2

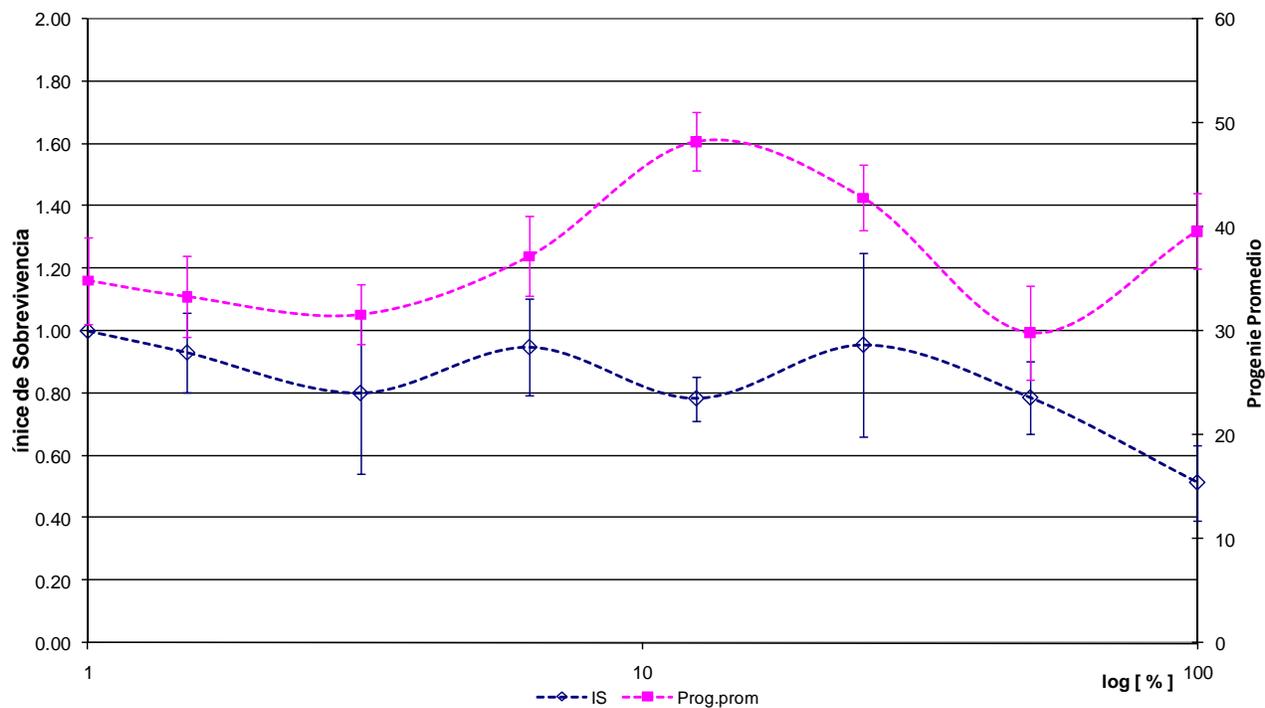
La progenie promedio por macho en las series experimentales fue mayor con respecto a su testigo, con excepción de la concentración 3.1% en la muestra residual no tratada (Tabla XII). En la muestra tratada la progenie promedio por macho en las concentraciones 6.25, 12.5, 25 y 100% fue mayor con respecto al testigo. La fertilidad de los machos pudo haber sido afectada debido a que la progenie promedio en ambos casos fue mayor que en sus respectivos testigos. No hay diferencias significativas entre las concentraciones al igual que entre las muestras residual no tratada y tratada (ANOVA, $p > 0.05$) (Gráficas 11 y 12).

Tabla XII: Progenie promedio (prom \pm ee) por macho tratado de la muestra 2.

[]	Residual no tratada			Residual tratada		
	♂	n	Prog. Prom	♂	n	Prog. Prom
0	11	295	21.00 \pm 4.47	14	523	34.86 \pm 4.19
1.51	13	449	29.93 \pm 4.67	14	500	33.33 \pm 3.94
3.1	12	335	22.33 \pm 3.77	15	478	31.60 \pm 2.84
6.25	13	443	29.73 \pm 4.32	14	558	37.2 \pm 3.78
12.5	15	545	36.4 \pm 3.54	15	721	48.2 \pm 2.76
25	14	436	29.93 \pm 3.55	15	615	42.8 \pm 3.13
50	13	507	33.8 \pm 5.08	12	432	29.86 \pm 4.53
100	14	443	29.53 \pm 3.28	15	595	39.6 \pm 3.57



Gráfica 11: Muestra 2 Residual no tratada. Índice de sobrevivencia y progenie promedio por macho.



Gráfica 12: Muestra 2 Tratada. Índice de sobrevivencia y progenie promedio por macho.

En la figura 7 se muestra un organismo masculino que presenta sólo el cromosoma X materno y pérdida total de un cromosoma paterno.



Figura 7. Macho con fenotipo cuerpo amarillo cedas negras, ojos color rosa-durazno.

En la figura 8 se presenta un organismo femenino producto de un error de segregación en el macho progenitor.



Figura 8. Fenotipo de hembra con color del cuerpo silvestre y ojos en barra color rojo.

En la figura 9 se muestra un ginandromorfo bilateral, presenta en la mitad del cuerpo características de macho, mientras que en la otra parte características de hembra.

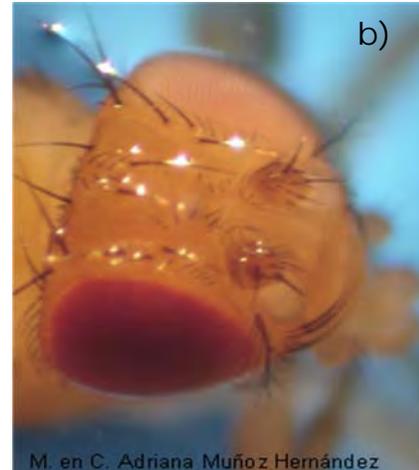


Figura 9. Ginandromorfo bilateral: a) en la parte izquierda presenta características de macho, ojos color rosa-durazno y peines sexuales. b) los ojos de color rojo son de una hembra y el ojo de color rosa-durazno es de un macho.

Finalmente los organismos que fueron registrados como otros eventos (Figura 10), presentan malformaciones en el cuerpo como sedas dobladas en ángulo de 45° (sedas tipo *bent*). Así como organismos que presentan placa genital de hembra y peines sexuales de machos. Estos organismos están relacionados con un error de segregación mitótica, por lo que las líneas celulares presentan diferente carga genética donde se presentan estas características (Figura 11).



Figura 10. Hembra con seda tipo *bent*.



Figura 11. Organismo que presenta peines sexuales de macho (flecha negra) y placa genital de hembra (flecha roja).

VII. DISCUSIÓN

En los últimos años se ha sugerido el uso de animales invertebrados como primeros indicadores en las metodologías para el monitoreo ambiental (Guilhermino et al., 2000; Ferreira et al., 2008). *Drosophila melanogaster* y el uso de biomarcadores Índice de sobrevivencia (IS), Proporción sexual (PSx) e Integridad cromosómica son propuestos en este trabajo como un modelo alternativo de biomonitoreo para evaluar la toxicidad y genotoxicidad de muestras provenientes de aguas residuales de la actividad industrial de la peletera “Curtidos Toluca S.A. de C.V”.

Para determinar la cantidad de cromo en las muestras de agua residual realizamos un análisis por espectrofotometría (ver métodos). Los resultados del análisis mostraron que el contenido de Cr total y Cr [VI] entre las muestras 1 y 2 fue diferente; la concentración de Cr en la muestra 1 fue menor que en la muestra 2 (Tabla1). Esto se debió probablemente a que las muestras fueron colectadas en dos condiciones, la primera cuando la curtidora operaba normalmente y la segunda cuando la curtidora no tenía actividad. De acuerdo con los resultados del IS en *D. melanogaster*, este biomarcador detectó actividad tóxica en ambos tipos de muestras. Sin embargo, sólo la muestra 1 no tratada fue tóxica para ambos tipos de mosca a la concentración 100%, mientras que en la muestra 2 sólo la tratada al 100% fue tóxica para la línea C-s (Gráficas 1 y 4). Además, el IS mostró diferencias en la respuesta entre los tipos de mosca, la línea fB^S presentó valores de IS por arriba de la línea silvestre (Gráficas 1 y 2). Lo anterior podría ser resultado de la constitución genética de la mosca, ya que la fB^S tiene un cromosoma X en anillo y un cromosoma Y compuesto por dos translocaciones (Lindsley y Zimm, 1992). En general, el modelo permitió establecer una gradiente de toxicidad entre las muestras residuales 1 y 2 de la siguiente manera: Residual no tratada1>Tratada1>Residual no tratada2=Residual tratada2.

La capacidad de *D. melanogaster* para detectar diferencias entre muestras y establecer relaciones de toxicidad a través del IS en el presente trabajo coincide

con resultados obtenidos por Dorantes (2001) y Arellano-Aguilar (2002) quienes utilizaron el modelo para evaluar diferentes tipos de muestras de agua ambiental. En comparación con modelos como *Daphnia magna* que ha sido usada de manera rutinaria para evaluar la toxicidad de muestras de agua industriales tratadas (Barata et al., 2008), *D. melanogaster* mostró de igual manera sensibilidad para detectar las diferencias entre las aguas residuales que fueron sometidas a tratamientos de recuperación de contaminantes. Es por ello que el Índice de sobrevivencia de *D. melanogaster* es un biomarcador efectivo para la evaluación de toxicidad de muestras complejas.

La proporción sexual es un biomarcador importante debido a que las aguas residuales provenientes de la industria manufacturera son mezclas complejas de productos químicos que pueden contener compuestos que alteren la función endocrina, interviniendo en la disminución del éxito reproductivo o produciendo cambios en las características sexuales y disminución de la fecundidad. Por ejemplo, Werner et al. (2008) reportaron que al exponer a carpas *Pimephales promelas* (carpa cabezona) a muestras de agua residual provenientes de una fábrica papelera se producen cambios morfológicos (efecto de feminización en los machos), disminución en las concentraciones de esteroides sexuales y disminución en el éxito reproductivo. En nuestros resultados, la PSx en *D. melanogaster* mostró que el número de hembras y machos recuperados de los tratamientos fue similar tanto para moscas silvestres como para moscas portadoras de marcadores genéticos. La toxicidad de las muestras residuales afectó de la misma manera ambos sexos, por lo que las muestras no tuvieron efecto dirigido a un sexo. En la literatura se establece una posible diferencia entre géneros debido a que la línea celular germinal de los machos es más sensible que la de hembras en la inducción de aberraciones cromosomales y en la mutación de genes (Alder et al., 2007). Además, se ha relacionado la edad como un factor determinante en el daño dirigido a un sexo (Dahlström et al. 2008). Se han reportado diferentes compuestos que tienen un efecto dirigido hacia un sexo, por ejemplo la hidroquinona (Leopardi et al., 1990). Con base en nuestros resultados,

podemos suponer que las muestras de agua residuales de la curtidora no presentaron compuestos que pudieran afectar la determinación sexual de la mosca.

Mediante la prueba de integridad cromosómica en *D. melanogaster* se puede identificar la actividad genotóxica originada por rompimientos cromosómicos. Los resultados mostraron que las muestras indujeron pérdida total del cromosoma Y, así como errores en la segregación tanto meiotica como mitótica. Esto puede ser debido a que las muestras tienen un efecto clastogénico. También, se pudo establecer que en las muestras residuales tratadas se recuperó mayor número de organismos y menor número de organismos excepcionales. Lo anterior significa que se presentaron pocos organismos con pérdida parcial o total de cromosomas. En cuanto a las muestras residuales no tratadas se recuperó un menor número menor de organismos y mayor número de organismos excepcionales. Esto puede deberse a que las muestra no tratadas contienen mayor concentración de cromo y de otros compuestos que las hacen más genotóxicas en comparación con las muestras que fueron sometidas a un tratamiento de recuperación de cromo. Se ha reportado que la frecuencia de mutación y recombinación somática en *D. melanogaster* incrementa significativamente en muestras complejas que contienen mayor concentración de cromo (Muñoz-Martínez, 2007).

El uso de sistemas de biomonitorio como *Drosophila melanogaster* es una alternativa valiosa porque además de ser un modelo *in vivo* ha mostrado sensibilidad a cambios en los niveles ambientales de contaminación.

En este trabajo se observaron diferencias entre los tipos de agua residuales y entre los dos experimentos realizados, reflejado en la cantidad de organismos recobrados de cada concentración, tipo de muestra y el número de progenie excepcional.

Drosophila mostró ser capaz de detectar el grado de contaminación de las muestras de agua de la peletera, encontrando diferencias principalmente entre las muestras residual no tratada y tratada siendo la muestra no tratada la más tóxica.

El modelo mostró diferencias en cuanto a los biomarcadores evaluados IS, PSx y en la prueba de integridad cromosómica con un número mayor de eventos genéticos en la muestra 1.

Finalmente el IS mostró ser un biomarcador efectivo para medir la toxicidad de muestras de agua residual derivada de actividad industrial, en el caso particular de la peletera “Curtidos Toluca” que implementa una metodología para la recuperación de cromo y debido a ésta las muestras tienen un grado de contaminación diferente. La prueba de integridad cromosómica mostró ser una metodología efectiva, debido a que se utilizó un modelo *in vivo* que permitió establecer el potencial genotóxico inducido en el macho tratado al ser expuesto a aguas residuales no tratadas y tratadas. El efecto genotóxico de las muestras fue clastógeno debido a que la progenie recobrada de las cruza mostró pérdida parcial y total de cromosomas sexuales.

La evaluación de los biomarcadores propuestos IS, Psx y la prueba de Integridad Cromosómica, mostraron ser pruebas que se complementan ya que se puede hacer una relación entre concentración/IS/Psx/Integridad cromosómica. Debido a que los humanos se encuentran en constante exposición a contaminación ambiental y laboral, un indicador sensible de daño a nivel genético como *Drosophila melanogaster* es un modelo potencial indicador de toxicidad y genotoxicidad, además de ser una herramienta para medir la factibilidad de procesos de recuperación de aguas residuales provenientes de la industria.

VIII. CONCLUSIONES

- ❖ *Drosophila melanogaster* mostró sensibilidad diferenciada entre las muestras residuales no tratadas y tratadas.
- ❖ El IS mostró ser un biomarcador efectivo para medir la toxicidad de muestras complejas.
- ❖ La prueba de integridad cromosómica mostró ser una metodología efectiva para evaluar daño genotóxico de muestras complejas.
- ❖ *Drosophila melanogaster* es un modelo potencial para ser usado como un biomonitor confiable.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Albert A. L. 2004. Toxicología Ambiental. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. México. 453 p.
- Alder I., Carere A., Eichenlaub U. and Pacchierotti F. 2007. Gender differences in the induction of chromosomal aberrations and gene mutations in rodent germ cells. *Environmental Research*, 104: 37-45 pp.
- Arellano-Aguilar R. O. 2002. *Drosophila* como modelo *in vivo* para evaluar el potencial genotóxico de muestras ambientales. Los Azufres, Mich. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 61 p.
- Bagchi D., Vuchetich P., Bagchi M., Hassoun E., Tran M., Tang L. and Stohs S. 1997. Induction of oxidative stress by chronic administration of sodium dichromate [chromium VI] and cadmium chloride [cadmium II] to rats. *Free Radical Biology & Medicine*. Vol 22. No. 3. 471-478 pp.
- Barata C., Aloñon P., Gutierrez-Alonso S., Riva M., Fernandez C. and Tarazona J. 2008. A *Daphnia magna* feeding bioassay as a cost effective and ecological relevant sublethal toxicity test for environmental risk assessment of toxic effluents. *Science of the Total Environment*. 405: 78-85 pp.
- Barmina O., Gonzalo M., McIntyre L. and Kopp A. 2005. Sex and segment-specific modulation of gene expression profiles in *Drosophila*. *Developmental Biology*. 288: 528-544 pp.
- Billeter J., Rideout J., Dornan A. and Goodwin S. 2006. Control of male sexual behavior in *Drosophila* by the sex determination pathway. *Current Biology*. 16: 766-776 pp.
- Bridges C., Stortevant A. and Morgan T. 1919. The spatial relations of genes. *Proc. Natl. Academy Science*. 5: 168-173 pp.
- Burger J., Fossi C., McClellan-Green P. y Orlando E. F. 2007. Methodologies, bioindicators, and biomarkers for assessing gender-related differences in wildlife exposed to environmental chemicals. *Environmental Research*. 104: 135-152 pp.

- Butterworth M. F., Corkum L. A. y Guzmán-Rincón J. (Eds). 1995. *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change: a Handbook*. Vol. 50 Plenum Press New York. *Rev. Int. Contaminación Ambiental*. 17: 47-52 pp.
- Butterworth M. F., Gunatilaka A. y Gonsebatt M. E. (Eds). 2000. *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change 2*. Environmental Science Research, Vol 56. New York. 508 p
- Casini S., Marsili L., Fossi M. C., Mori G., Bucalossi D., et al. 2006. Use of biomarkers to investigate toxicological effects of produced water treated with conventional and innovative methods. *Marine Environmental Research*, 62: 347-351pp.
- Crew F. A. 1965. *Determinación del sexo*. Editorial Alhambra, S.A. Madrid, España. 191 p.
- Dahlström V., Moraes V., Peres A., Gomez de Macedo L. and Bogo J. 2008. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by micronucleus test and comet assay in mice peripheral blood cells. *Cell Biology International*. 32: 1223-1229 pp.
- De Flora S., Ilcheva M. and Balansky R. 2006. Oral chromium (VI) does not affect the frequency of micronuclei in hematopoietic cells of adult mice and transplacentally exposed fetuses. *Mutation Research*. 610: 38-47pp.
- De Flora S., Bagnasco M., Serra D. y Zancchi P. 1990. Genotoxicity of chromium compound. A review. *Mutation Research* 238: 99-172 pp.
- Dorantes A.Y. 2000. *Aplicación de *Drosophila melanogaster* como biomonitor indicador de contaminación acuática*. Tesis de Licenciatura. ENEP Iztacala. UNAM. México. 65 p.
- Ferreira A., Loureiro S. and Soares A. 2008. Toxicity prediction of binary combinations of cadmium, carbendazim and low dissolved oxygen on *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*. 89: 28-39 pp.
- Graf U., Abraham S., Guzmán J. y Würzler F. 1998. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*. 402: 203-209 pp.

- Graf U., Heo O. y Olvera O. 1992. The genotoxicity of chromium (VI) oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is over 90% due to mitotic recombination. *Mutation Research*. 266: 197-203 pp.
- Graf U., Würzler F., Katz A., Frei H., Juon H., Hall C. and Kale P. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*. 6: 153-188 pp.
- Grevatt P. 1998. Toxicological review of hexavalent chromium. In support of summary information integrated risk information system (IRIS). U.S. Environmental Protection Agency. Washington DC. 70 p.
- Guilhermino L., Diamantino T., Silva M. and Soares A.M. 2000. Acute toxicity test with *Daphnia magna*: an alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity?. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 46: 357-362 pp.
- Gutiérrez M. 1999. Manual de procedimientos para el manejo adecuado de los residuos de la curtiduría. Instituto Nacional de Ecología/ Dirección General de Materiales, Residuos y Actividades Riesgosas. México. 66 p.
- Guzmán-Rincon J., Ramirez P. and Benites L. 1998. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila* used for monitoring of environmental pollutants. En *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change 2: a Handbook*. Environmental Science Research. Butterworth F. y Gonsebatt M. (Eds). 221-237 pp.
- Jamil K. 2001. Bioindicators and Biomarkers of Environmental Pollution and Risk Assessment. Science Publishers, Inc., E.U. 204 p.
- Kilbey B., MacDonald D., Auerbach C. Sobels F. and Vogel E. 1981. The use of *Drosophila melanogaster* in tests for environmental mutagens. *Mutation Research*. 85: 141-146 pp.
- Klug W., Cummings M. and Spencer C. 2006. *Conceptos de Genética*. Pearson Prentice Hall. España. 920 p.
- Knudsen L., Boisen T., Molin J., Jelnes J., Jensen G., Jensen J., Lundgren K., Lundsteen C., Petersen B., Wassermann K., Wilhardt P., Wulf H. and Zebitz U. 1992. Biomonitoring of genotoxic exposure among stainless welders. *Mutation Research*. 279: 129-143 pp.

- Ledezma P.A. 2006. Actividad Genotóxica de afloramientos externos del confinamiento de residuos de cromo de “Cromatos de México” en Lechería Edo. México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 82 p.
- Leopardi P., Zijno A., Bassani B. Tiveron C., Marchetti F. and Pacchierotti F. 1990. Aneuploidy studies in somatic and male and female germ cells of mice treated with hydroquinone. *Mutation Research, Environmental Mutagenesis and Related Subjects* Vol 234, 421 p.
- Lindsley, D.L. y G.G. Zimm. 1992. *The genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press Inc. 1132 p.
- Lynch D., Schuler R., Hood R. and Davis G. 1991. Evaluation of *Drosophila* for screening developmental toxicants: Test result with eighteen chemicals and presentation of new *Drosophila* Bioassay. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* 11: 147-173pp.
- Mulyani I., Levina A. y A Lay P. 2003. Chromium [III] Complex used as Nutritional supplements: structures and reactivities. *Journal of Inorganic Biochemistry*. Australia 96: 196 p.
- Muñoz-Martínez L.B. 2007. Comparación de una muestra ambiental externa A “Cromatos de México” en células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 68 p.
- Muñoz E. and Mazar B. 1998. Evaluation of the genotoxicity of aniline HCL in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*. 413: 15-22 pp.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-CCA-O21-ECOL/1993. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la industria del curtido y acabado de pieles, publicado en el Diario Oficial de la Federación 28 de junio de 1993.
- Nöthinger 1970. Sucrose density separation: A method for collecting large number of *Drosophila* larvae. *DIS* 45:177.

- Ramos P. 1994. Efectos genotóxicos de algunas sales de arsénico en *Drosophila melanogaster*. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias, UNAM. 142 p.
- Ramos P. Ordaz G., Dorantes A., Rivas H., Campos P., Martínez M. and Hernández B. 1998. *Drosophila* is reliable biomonitor of water pollution. En *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change 2: a Handbook*. Environmental Science Research. Butterworth F. y Gensebatt M. (Eds). 257-299 pp.
- Stallings D.M., Hepburn D., Hannah M., Vicent J.B., y O'Donnell J. 2006. Nutritional supplement chromium picolinate generates chromosomal aberrations and impedes progeny development in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*. 610: 101-113pp.
- Vogel E. 1975. Mutations in *Drosophila*. Some aspects of the detection of potential mutagenic agents in *Drosophila*. *Mutation Research*. 29: 241-250 pp.
- Werner J., Ouellet J. and Law R. 2008. Expresión del mRNA en peces expuestos al efluente de una papelera canadiense. Lakehead University, Thunder Bay, Ontario, Canadá. Presentado en III Congreso de Ecotoxicología y Química Ambiental. Abril 2008. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 30 p.
- Wu R., Siu W., y Shin P. 2005. Induction, adaptation and recovery of biological responses: Implications for environmental monitoring. *Marine Pollution Bulletin*. 12 p.
- Zimmering S. 1975. Utility of *Drosophila* for detection of potential environmental chemical mutagens. *Mutation Research* 269: 26-33 pp.
- Zimmering S., Mason J. and Osgood C. 1986. Current status of aneuploidy testing in *Drosophila*. *Mutation Research* 167: 71-87pp.