



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Comparación del efecto teratogénico de la
Griseofulvina y el Etanol en el desarrollo
larvario de *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:
DONAJÍ AGUILAR HERNÁNDEZ

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. PATRICIA RAMOS MORALES



2009



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**Comparación del efecto teratogénico de la griseofulvina y del etanol en el desarrollo larvario de
*Drosophila melanogaster***

realizado por **Aguilar Hernández Donají** con número de cuenta **0-7101466-3** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz

Propietario Dra. Patricia Guevara Fefer

Propietario Dra. Patricia Ramos Morales

Tutora

Suplente M. en C. Adriana Muñoz Hernández

Suplente Biól. Blanca Rosa Hernández Bernal

Blanca Rosa Hernández Bernal

Atentamente,

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Ciudad Universitaria, D. F., a 23 de marzo de 2009

EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DR. PEDRO GARCÍA BARRERA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Datos:

1. Datos del alumno

Aguilar

Hernández

Donají

01773-73 2 19 30

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

0-7101466-3

2. Datos del Tutor

Dra.

Patricia

Ramos

Morales

3. Datos sinodal 1

Dra.

Maricela

Villagrán

Santa Cruz

4. Datos sinodal 2

Dra.

Patricia

Guevara

Fefer

5. Datos sinodal 3

M. en C.

Adriana

Muñoz

Hernández

6. Datos sinodal 4

Biól.

Blanca Rosa

Hernández

Bernal

7. Datos del trabajo escrito

Comparación del efecto teratogénico de la griseofulvina y del etanol en el desarrollo larvario de *Drosophila melanogaster*.

52 p

2009

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico con todo cariño

A mis padres

María Hernández Ortíz por su apoyo incondicional por el gran cariño que me brinda, por su paciencia y solidaridad.

Miguel Aguilar Aguilar † por los principios inculcados, porque sin el amor al estudio que despertó en mi desde niña, no hubiera hecho una carrera y persistido en concluirla.

Gracias a los dos por darme la vida, y por enseñarme a amarla.

A mis hijos

Melisa, Guillermo y Rodrigo, la luz de mi vida.

A mi esposo

Guillermo Cabrera Díaz, compañero de la mayor parte de mi vida.

A mis hermanos

Xicoténcatl, Cuauhtémoc, y Miguel Ángel, con todo mi cariño, porque son una parte muy importante para mí.

A mi hermana **Citlali** por su calidez, cariño, interés y apoyo incondicional.

¡Por fin cumplí!

A mis nietos

Emilio, Valeria y Sofía mis grandes amores.

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a la **Doctora Patricia Ramos Morales**, mi directora de tesis, por su amable guía e invaluable apoyo, por compartir sus conocimientos y su tiempo, por su comprensión y paciencia.

Al Biólogo Hugo Rivas; Maestro en C. José Armando Muñoz Moya; Bióloga Blanca R. Hernández Bernal, Maestra en Ciencias Adriana Muñoz Hernández, Maestra en C. Adriana Ramírez, Biólogo José Herrera Bazán

Gracias por compartir su tiempo sus conocimientos, por su amable disposición y ayuda en la realización de este trabajo.

A mis compañeras y compañeros de Laboratorio de Toxicología Genética y Ambiental de la Facultad de Ciencias.

Por el compañerismo y apoyo brindado, en todos los momentos de duda.

Agradecimientos Técnicos

M en C. Adriana Muñoz Hernández por la toma de fotografías.

Esta tesis se realizó con el apoyo de PAPIIME En 206803, UNAM. El material biológico utilizado en este trabajo fue proporcionado por el Banco de Moscas de la Facultad de Ciencias UNAM.

Índice

Resumen	2
I. INTRODUCCIÓN	3
I.1 Teratógenos	3
I.2 Teratogénesis y Expresión génica	11
I.3 Biología del desarrollo de <i>Drosophila melanogaster</i> .	11
I.4 Desarrollo del ojo.	15
I.5 Eventos cronológicos de la formación de las alas	16
I.6 Control genético del desarrollo de <i>D. melanogaster</i>	17
I.7 <i>D. melanogaster</i> como sistema de prueba	18
I. 8Justificación	19
I.9 Objetivo	20
I.10 Hipótesis.	20
II. MATERIAL Y MÉTODO	20
II.1 Compuestos químicos	20
II.2 Material biológico	21
II.3 Tratamiento	22
II.4 Revisión morfológica de las moscas tratadas	23
III. RESULTADOS	25
III.1 Griseofulvina	25
III.2 Etanol	34
IV. DISCUSIÓN	43
IV.1. Perspectivas	48
V. CONCLUSIONES	48
VI. REFERENCIAS	49

I: RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo principal determinar el efecto de griseofulvina (GF) y etanol (EtOH), dos compuestos probados que afectan el desarrollo en el modelo de la prueba de teratogénesis *Drosophila melanogaster*.

Basados en las concentraciones propuestas para este modelo por Lynch (1991), se obtuvieron las siguientes diluciones sucesivas, a partir de una solución stock, para la GF 2.13, 1.41, 0.71, 0.35 mM y para el EtOH 3.4, 2.56, 1.70, 1.30, 0.86 mM como disolvente y testigo negativo se utilizó agua destilada y alcohol al 4% para EtOH y GF, respectivamente. El tratamiento se administró por alimentación – contacto a larvas de 72 ± 4 h de *Drosophila melanogaster* de tipo silvestre.

Como primer indicador de la toxicidad del compuesto de prueba se calculó el Índice de Supervivencia. Se encontró una relación de la toxicidad dependiente de la concentración, siendo etanol altamente tóxico, ya que prácticamente no hubo supervivencia en la concentración mayor. Y en griseofulvina, la proporción de población recuperada fue menor al 50%. No se encontró un efecto diferencial en los sexos, en los dos compuestos probados. En cuanto al efecto de daño morfológico con: griseofulvina se obtuvo como blancos principales: alas > ojos > sedas. Y con etanol: sedas > alas, obteniendo fenocopias tipo; “Notch” y “bent”.

Se concluye que la prueba de teratogénesis utilizando GF y EtOH sobre *Drosophila melanogaster* como biomonitor, es sensible, repetible y confiable

I. INTRODUCCION

Entre los problemas prioritarios de la salud humana, se encuentran aquellos causados por la contaminación ambiental que pueden afectar a grandes núcleos poblacionales o a pequeños grupos expuestos a diversos factores o agentes con actividad tóxica. Entre éstos, la actividad industrial, drogas, radiación (Roreham, et al., 2002, Newman et al., 2003), químicos de uso agrícola, medicamentos, incluso hasta los alimentos pueden interferir con el desarrollo (embrionario y fetal), con consecuencias negativas (patologías). Sin embargo, pese a la creciente preocupación sobre la salud ambiental, pocas veces se considera al producto de la gestación como sujeto de ser contaminado (Saavedra et al. 1996).

Continuamente salen al mercado productos químicos nuevos que carecen de la investigación básica suficiente y de los que no se conocen bien los posibles efectos adversos que pueden afectar la formación de un nuevo ser. Algunos agentes ambientales son capaces de cruzar la barrera placentaria e interrelacionarse con los tejidos del embrión o el feto en formación originando alteraciones estructurales, bioquímicas o funcionales, que se traducen en malformaciones congénitas y/o retraso psicomotor, a estos agentes capaces de modificar el desarrollo intrauterino se les conoce como **teratógenos** (Saavedra et al. 1996; Foster, et al., 2007).

I.1 Teratógenos

Un teratógeno es cualquier agente ambiental o químico que produce o incrementa la probabilidad de daño fetal. Tales agentes incluyen; virus, radiaciones, hipertermia, microorganismos, sustancias o condiciones materiales capaces de interrumpir o alterar el desarrollo del huevo fertilizado, embrión o feto, alterando la expresión génica y afectando, en consecuencia a procesos como: muerte celular programada, migración, proliferación celular, histogénesis, síntesis o función de proteínas y suministro de energía. Algunos teratógenos actúan directamente en el embrión (talidomida), mientras que otros lo hacen a través de intermediarios producidos por el metabolismo de la madre (ciclofosfamida, diabetes mellitus) (WHO, 1984; Klaassen y Watkins, 2001; Xiao, 2007; Foster, et al., 2007). La respuesta a un agente ambiental depende de numerosos factores que incluyen el tipo y tiempo de exposición o dosis involucrado, en qué periodo de la gestación ocurre y la

naturaleza o constitución del individuo. El último factor es de particular importancia para la investigación. Se ha demostrado que dos personas cualesquiera expuestas a la misma cantidad y forma de una sustancia similar durante un estadio comparable de embarazo, pueden presentar una amplia variación en el efecto, es decir muestran diferente susceptibilidad (Klaassen y Watkins, 2001).

Otro de los factores importantes es la relación dosis respuesta. Se requiere generalmente una cantidad específica de un teratógeno para que el embrión o feto esté en riesgo de daño. Una vez que la concentración biológicamente activa es alcanzada el riesgo de daño se incrementa con la exposición repetida. La dosis – umbral (es aquella concentración que dispara una respuesta específica) varía entre sustancias, estadios de desarrollo fetal, e individuos (Bishop et al, 1997; Polifka y Friedman, 2002).

La responsabilidad de la industria farmacéutica y de la medicina ha sido evidenciada en varias ocasiones. En la mitad de los años 50s, hasta los 60s, el medicamento dietilestilbestrol se recetó en los casos con amenaza de aborto, veinte años más tarde, los niños “salvados” presentaron malformaciones genitales y un incremento en el riesgo de anomalías funcionales primarias como desórdenes psiquiátricos en mujeres y hombres (Klaassen y Watkins, 2001).

Son de suma importancia las investigaciones que se hacen respecto a los medicamentos, en general por su uso común o por prescripción médica, la población no desconfía de esas sustancias, cabe mencionar el tristemente célebre caso de la talidomida (Klaassen y Watkins, 2001) que era prescrita a mujeres embarazadas, para controlar las náuseas, o el caso de los analgésicos comunes; como la aspirina y el paracetamol, este último causa necrosis en el hígado de animales y humanos, y muestra actividad clastogénica en células de mamífero *in vitro* (Giri, 1992). Experimentalmente se ha confirmado actividad teratogénica de la aspirina en ratones, ratas, conejos, perros y monos (Depass et al., 1979).

También está el caso de los medicamentos de control. Por ejemplo, en mujeres epilépticas que son tratadas con anticonvulsivos (ácido valproico, valproato de sodio) durante el primer trimestre de embarazo, se ha reportado que los productos presentaron malformaciones congénitas mayores y menores, y efectos adversos en el desarrollo neurocognitivo (Vinten et al., 2005). En Liverpool y Manchester se realizó un estudio para investigar los efectos en la función cognitiva en niños escolares que estuvieron expuestos a drogas antiepilépticas *in*

útero. Los resultados revelaron que los niños expuestos a valproato obtuvieron menor IQ verbal, y más daño en la memoria que los expuestos a otros anticonvulsivos como, Lamotrigine (Cunnington, et al 2005; Foster, et al., 2007).

Otro caso es el del tratamiento de cáncer renal, en el cual se utiliza interferon α -2b que es comercializado por Shering-Plough, SA, y trae la indicación de que el interferón alfa puede ser usado en la mujer gestante, siempre que los beneficios para ésta superen los riesgos que puede tener para el feto, sin indicar cuáles son esos riesgos, ni en qué período especial del embarazo afectan. En un estudio realizado en embriones de ave, para valorar los efectos adversos y la toxicidad de este medicamento, se reportó que este compuesto es embriotóxico y además produce malformaciones con especial incidencia en estadios tempranos de 10 y 14 horas; produciendo microcefalia, síndrome de regresión caudal, microsomía en el 100% de los embriones tratados en todas las concentraciones utilizadas y malformaciones notocordavertebrales (Cozar, 2002). Otro ejemplo es ciclofosfamida, considerado un anticancerígeno, pero que causa provoca alteraciones en el desarrollo del tubo neural (Xiao, et al., 2007)

Otros medicamentos pueden causar alteraciones teratógenas, aun después de dejar de tomarlos y no ingerirlos durante el período de gestación debido a que su vida media es prolongada, o a que el organismo tarda mucho tiempo en eliminarlos. Es el caso de mujeres que estuvieron medicadas con acitretin y su etiléster etritenate (metabolitos de la familia de la vitamina A) y se embarazaron meses después de terminado el tratamiento, el etritenate (puede persistir en el cuerpo por un año o dos después de terminada la terapia) afectó a los productos, que mostraron deformidades en las extremidades, en el sistema nervioso y en la región cráneo facial (De Die-Smulders et al., 1995).

Algunos contaminantes ambientales, ya sea por exposición laboral, o derivados de desechos industriales y pesticidas que contaminan los cultivos y cuerpos de agua, también han sido identificados como teratógenos. Un estudio de campo hecho en Matamoros Tamaulipas a un grupo de obreras de una maquiladora de condensadores eléctricos para radio y televisión que estuvieron expuestas durante el embarazo a los vapores que se producían al preparar el metilcelosolve y etilenglicol, mostró que los hijos presentaron un síndrome teratógeno, consistente en: facciones peculiares, alteraciones músculo- esqueléticas, alteraciones en los órganos de los sentidos y retraso mental variable (Saavedra, et al., 1996). Estas sustancias

fueron absorbidas por la piel, puesto que las trabajadoras tenían las manos constantemente sumergidas en estos solventes, y probablemente también fueron ingeridos, por falta de aseo manual.

Por otro lado en el Valle del Yaqui, una de las principales regiones agrícolas de México y zona de alta contaminación por plaguicidas, se han reportado 12 tipos distintos de insecticidas organoclorados y uno fosforado en el suero sanguíneo de mujeres embarazadas, y posteriormente en la leche materna; se considera que estas mujeres están expuestas constantemente a estas sustancias a través del ambiente y de las frutas y verduras que ingieren (Albert y Saldivar, 1996). Otro compuesto teratogénico que también se ingiere con los alimentos (principalmente pescado) es el metilmercurio, este puede pasar rápidamente a través de la placenta e inhibir el desarrollo de la misma y la diferenciación de los vasos sanguíneos. Se ha encontrado una relación dosis-respuesta entre la concentración del metilmercurio y la toxicidad en el desarrollo embrionario, asociada principalmente con anomalías en el tubo neural. Aparentemente el metilmercurio inhibe la síntesis de ADN y ARN y daña la ultraestructura celular (Gilbert, 2006; Maia et al., 2009).

Además de afectar a los humanos, algunos contaminantes ambientales afectan la vida silvestre de los ecosistemas en donde se vierten. Es el caso de los experimentos realizados con sedimentos lodosos del río Elizabeth (New Jersey, E.U.) en donde vierte sus desechos la empresa Atlantic Wood Industries se encontró que a los embriones de peces *Fundulus heteroclitus* expuestos, les inducía actividad en el citocromo (*CYP1A*) y ocasionaba deformidades como edema pericardial, elongación del corazón y colas cortas (Wassenberg y Di Giulio, 2004).

Otro caso son los estanques de Minnesota en donde se encontró una considerable disminución en las poblaciones de ranas de varias especies, además de especímenes con deformaciones en extremidades, dedos y ojos, así como defectos músculo-esqueléticos y urogenitales, por lo que la NIEHS (National Institute Environmental Health Safety) y la MPCA (Minnesota Pollution Control Agency) se han encargado de investigar las posibilidades de que cualquiera que sean las causas de las deformidades en las ranas puedan estar ligadas a la salud humana. Estas agencias han tratado de probar la relación de la contaminación ambiental y contaminantes químicos provenientes de los pesticidas empleados durante la primavera, en los cultivos de trigo, remolacha y patatas, con el

incremento que se ha presentado en la incidencia de anormalidades y aberraciones cromosómicas en niños recién nacidos. Para probar esta relación, emplearon la prueba de teratogénesis en embriones de rana *Xenopus* (FETAX) utilizando muestras de agua de los estanques afectados. Estas pruebas son usadas con frecuencia como base para decidir respecto a contaminantes ambientales y salud humana (Davidson, 2004)

En humanos uno de los teratógenos más generalizados es el **etanol** (EtOH) este compuesto es un depresor del sistema nervioso central (Yelin, et al, 2007). Es metabolizado fundamentalmente por vía hepática, con un 2 - 10% de eliminación por vía pulmonar y renal. No es mutagénico por sí solo pero sí su metabolito activo, el acetaldehído, que se puede acumular en órganos vitales (Pérez et al, 2001). El aumento de oxidación hepática del etanol eleva los niveles en sangre de acetaldehído y acetato (Lieber et al, 1987). El alcohol etílico es una sustancia ampliamente conocida por su efecto teratogénico en el desarrollo humano, conocido como síndrome fetal de alcohol (FAS), que fue descrito por primera vez por Jones y Smith (1973). Este síndrome está caracterizado por bajo peso, resultado de un retraso en el crecimiento en el período prenatal, retraso en el desarrollo físico posnatal, anomalías esquelético – faciales, tales como microcefalia, reducción en el ancho de las fisuras palpebrales e hipoplasia maxilar y lesiones, que con frecuencia resultan en deficiencia mental (Wu, et al., 2008). Actualmente se considera que los niños con FAS son parte de una población mayor, quienes expresan varias formas teratogénicas del sistema nervioso central, a esta lesión se le llama, espectro de desorden fetal de alcohol (FASD), se trata de una variabilidad relativamente amplia, en el tipo y extensión de déficit neuro-conductual, inducida por el etanol (Warren y Li, 2005).

La exposición a etanol durante el primer semestre de embarazo, se ha asociado con aumento de abortos espontáneos, nacimientos prematuros y niños que al nacer presentan espectro de desorden fetal de alcohol (FASD) cuyo fenotipo involucra cambios en el SNC, deformidades craneofaciales, órganos malformados incluidos el corazón y los ojos, así como retardo en el crecimiento, desarrollo y anormalidades cognitivas y del comportamiento.

Varias características del FAS son similares a los efectos teratogénicos causados por la exposición al ácido retinoico (RA), por lo que McCaffery et al, (2004) sugieren que el FAS puede resultar porque el etanol induce alteraciones en la síntesis de RA y que la patología

mostrada por el etanol puede ocurrir al menos en parte, a través del aumento en la producción de RA conduciendo a concentraciones anormales de este.

Wu et al, (2008), utilizaron el modelo de *Oryzias latipes* (medaka japonesa) para estudiar el mecanismo molecular de FASD, expusieron huevos fertilizados de medaka a diferentes concentraciones de etanol y analizaron el ADN, ARN, y proteínas. Concluyeron que la alteración del contenido de ácido nucleico y proteínas de los embriones, podría usarse como indicador de retardo en el crecimiento embrionario, lo cual debe ser el resultado de la interrupción de la función específica de los genes durante el desarrollo.

En otro experimento hecho con el mismo modelo, los huevos de medaka fueron expuestos (una hora después de ser fertilizados), a una solución de agua y diferentes concentraciones de etanol (0-1000 mM) por un lapso de 48 h y fue observado el desarrollo de los embriones, diariamente y hasta 10 días después de la fertilización. Los cartílagos y huesos fueron teñidos con azul alcian y calceína respectivamente. Los efectos causados consistieron en; reducida calcificación de mandíbula y de aleta caudal, retraso (o acción retardada) en la circulación sanguínea y desarrollo de coágulos (Xueqing, et al., 2006).

En investigaciones experimentales en animales (rata, ratón, cerdos de guinea) se ha mostrado que uno de los principales blancos del etanol (efecto teratogénico) en el funcionamiento neural es el hipocampo, que parece desempeñar un papel muy importante en el proceso de aprendizaje, memoria y regulación del comportamiento (Kimura et al., 2000).

Luo y Miller, (1998) obtuvieron en ratas expuestas in útero durante el desarrollo temprano menos neuronas y glía que en el grupo control. Tales resultados han sido reportados para muchas estructuras del CNS incluyendo el principal núcleo sensorial del nervio trigémino, el cerebelo, el hipocampo y la corteza cerebral. Estas alteraciones en el número celular pueden resultar de la inducción al incremento de la muerte celular o a la disminución de la proliferación celular.

En trabajos experimentales con ratones hijos de madres gestantes, expuestas a altas dosis de etanol durante el período de neurulación (período que corresponde a la 3ª y 4ª semana de gestación en los humanos), el alcohol afectó el desarrollo de la cara, que es simultáneo con el de los ojos, cerebro y oído interno, las poblaciones de células examinadas tomadas de los ratones, demostraron patogénesis (Johnson et al., 2007).

Otro teratógeno de importancia asociado con uso frecuente, es la **griseofulvina (GF)**, un antibiótico que se utiliza como agente antifúngico para el tratamiento de dermatomicosis superficial en humanos y en animales (De Carli y Larizza, 1988).

Comercialmente se produce por fermentación de especies de *Penicillium patulum*. Está formada por bloques de acetato, clorina, la cual es suministrada durante la fermentación como cloruro de potasio, en ausencia de ésta se forma clorogriseofulvina, la cual no tiene actividad fungicida (De Carli y Larizza, 1988).

Esta sustancia (GF) se acumula en las células queratinizadas de la piel, pelo y uñas e inhibe el crecimiento de los dermatofitos (hongos de diferentes especies del género *Microsporum*, *Tricofitum* y *Epidermophyllum*) (De Carli y Larizza 1988; Rebacz, et al., 2007). El mecanismo exacto por el cual inhibe el crecimiento de dermatofitos es controversial. Se proponen varias formas; por inhibición de la mitosis celular y síntesis de ácidos nucleicos de los hongos y por interrupción en la formación del huso acromático, a través de la interacción con los microtúbulos polimerizados, ocasionando aneuploidias (De Carli y Larizza, 1988; Develoux, 2001; Arida, et al., 2007). Tiene una vida media ($t_{1/2}$) 9 -21 h; los niveles de absorción en el tracto intestinal pueden aumentar si la droga se administra junto con una dieta rica en grasas (Arida et al. 2007). La griseofulvina también tiene propiedades anti-inflamatorias y efectos vasodilatadores cuando es usada en dosis altas. Es metabolizada por el sistema enzimático microsomal del hígado y excretado en la orina (Develoux, 2001). Experimentalmente se ha utilizado como estrategia de monitoreo celular (por sus cualidades para inducir la formación de husos multipolares por inhibición de coalescencia centrosomal, arresto mitótico y subsecuente muerte celular), para probar drogas utilizadas en quimioterapia, para tratar tumores cancerígenos, que tengan como blanco sólo células cancerosas y no las sanas (Rebacz, 2007).

La acción teratógena de GF fue reportada por primera vez por Gillick y Bulmer (1977), quienes administraron 35 mg/kg de la droga a una gata durante el primer trimestre de gestación y observaron en su progenie uno malformado y uno muerto de las tres crías de la camada. En otro estudio Klein y Beall (1972), administraron la droga por vía oral (1250 y 1500mg/kg) a ratas preñadas, expuestas durante la organogénesis y mostraron que la GF afectaba el desarrollo embrionario y la sobrevivencia de la progenie.

Se ha probado su acción carcinogénica y teratogénica en diferentes modelos animales, como; gatos, rata, ratón, e insectos como *Drosophila* (De Carli y Larizza, 1988).

Actualmente, se ha utilizado experimentalmente como estrategia de monitoreo celular (por sus cualidades para inducir la formación de husos multipolares por inhibición de coalescencia centrosomal, arresto mitótico y subsecuente muerte celular), para probar drogas utilizadas en quimioterapia, para tratar tumores cancerígenos, que tengan como blanco sólo las células cancerosas y no las sanas (Rebacz, 2007).

Fahmy y Hassan (1996), investigaron los efectos genotóxicos de la griseofulvina en espermatozoides primarios de ratón. Administraron la GF oralmente en dosis únicas, en un intervalo de concentraciones de 500 – 2000mg y dosis sucesivas por 3 y 5 días de 1000mg. Ambos tratamientos (el solo y el múltiple) indujeron un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de aberraciones cromosómicas, las cuales tenían una relación dependiente al tiempo de exposición y a la dosis. Las aberraciones cromosómicas tanto sexuales como autosómicas eran estructurales y numéricas

La administración prolongada de GF en ratas y ratones, durante- 12-16 meses, provoca cambios bioquímicos en el metabolismo de las porfirinas y ocasiona hepatomegalia (De Matteis y Gibbs, 1980)

Inoue et al., (1993) probaron el efecto de la GF en dos tipos de ensayos de células somáticas de *Drosophila melanogaster*, suministrada por alimentación durante el estadio larval. En los adultos emergidos la frecuencia de manchas en las alas incrementaron significativamente de acuerdo con la dosis. Los resultados demostraron claramente que la GF es genotóxica en las células somáticas de *Drosophila* y que las larvas alimentadas con GF presentaron retraso en el desarrollo. Las moscas adultas sobrevivientes tuvieron anomalías morfológicas; ojos (reducidos) y alas (con muescas).

I.2 Teratogénesis y Expresión Génica

Hoy en día, los estudios experimentales en este campo de la ciencia han evidenciado que los efectos inducidos en el desarrollo embrionario por los teratógenos se manifiestan en muchas otras formas no sólo como defectos monstruosos, sino que abarcan malformaciones, muerte prenatal, retraso en el crecimiento, déficit funcional y conductual,

mutación de células somáticas y otras alteraciones que se presentan en el estado adulto, que se asocian con el desarrollo de procesos malignos como el cáncer (Klaassen et al., 2001).

El desarrollo se caracteriza por cambios de tipo bioquímico y fisiológico, así como de forma y funcionalidad. Estos cambios están dirigidos por una cascada de factores que regulan la transcripción de genes. Los primeros de los cuales se heredan de la madre y se encuentran en el óvulo antes de la fecundación. A su vez, estos factores activan genes reguladores en el genoma embrionario, y la activación secuencial de genes continúa durante todo el desarrollo. Durante la organogénesis se produce una gran proliferación de las células, migración de las mismas, interacciones entre una y otra y remodelado de tejido morfogénico. Es durante este proceso que hay una gran susceptibilidad a malformaciones, la incidencia máxima coincide con la cronología de los fenómenos del desarrollo clave en estas estructuras, por lo que en exposición a algún agente teratogénico, éste puede afectar la expresión génica e impedir que alguna estructura se forme o lo haga erróneamente (Klaassen, 2005). Los mecanismos de la teratogénesis consisten en mutaciones, roturas cromosómicas, alteración de la mitosis, alteración de la integridad o de la función de los ácidos nucleicos, disminución del aporte energético, alteración de las características de las membranas, desequilibrios e inhibición de enzimas. Aunque no son exclusivas del período embrionario estas alteraciones a las células pueden desencadenar en el embrión respuestas patológicas como disminución de la proliferación celular, muerte celular, alteración de la biosíntesis, inhibición de los movimientos morfogénicos y anomalías mecánicas de las estructuras en desarrollo (Klaassen, 2005).

Uno de los organismos más estudiados para evaluar el efecto de agentes tóxicos en el genoma y en exposición es *Drosophila melanogaster*.

I.3 Biología del desarrollo de *Drosophila melanogaster*.

Es un insecto holometábolo, presenta un período de embriogénesis dentro del huevo y una sucesión de estadios larvales que culminan con una metamorfosis completa de la que finalmente surge un imago o adulto. El ciclo completo tiene una duración aproximada de 9.5 a 10 días a 25 °C (Fig. 1).

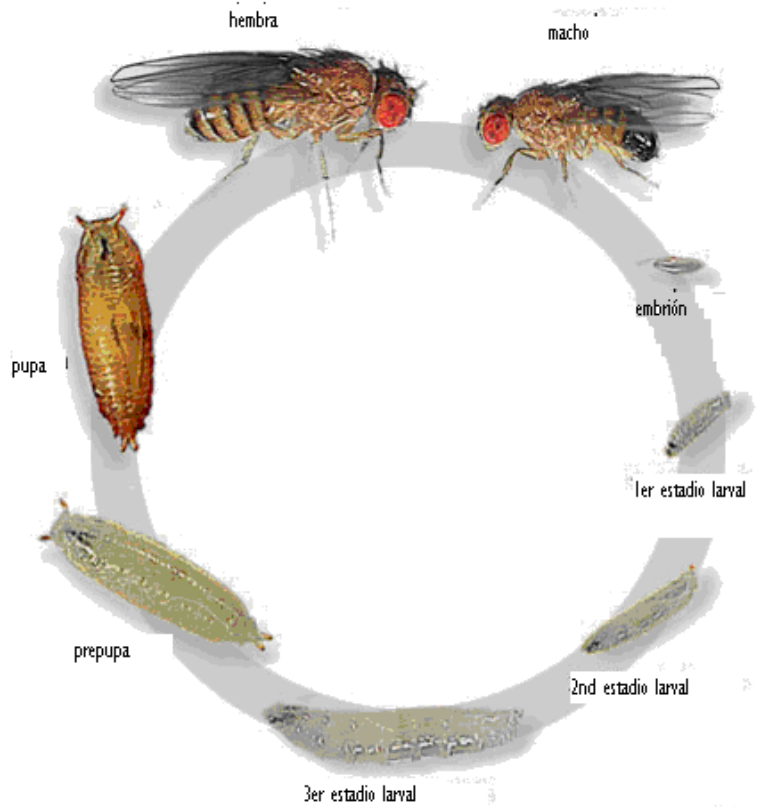


Fig. 1 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (Whittington Lab).

Después de un día de desarrollo embrionario, eclosiona del huevo una pequeña larva, su cuerpo está formado por 12 segmentos no aparentes: uno que forma la cabeza, tres segmentos torácicos, y ocho segmentos abdominales.

Durante el desarrollo embrionario se definen los dos linajes celulares que presenta la larva: las células larvarias y las imagales.

Las células imagales (no están involucradas en la formación del cuerpo de la larva) son distinguibles de las células larvales por su tamaño pequeño, constitución cromosómica diploide, retención de la capacidad de división celular y porque alcanzan su diferenciación hasta que entran a la etapa de metamorfosis. Los discos imagales aumentan de tamaño por mitosis, las cuales ocurren a determinados tiempos durante el desarrollo larvario (Fig. 2).



Fig. 2 Patrones de división celular para varios tejidos larvales e imagales durante el desarrollo de la larva de *Drosophila* (Gilbert, 1988).

Las células que forman el cuerpo de la larva, pierden su capacidad de división durante la embriogénesis en la primeras 24 horas dentro del huevo, una vez que eclosionan, solamente aumentan de tamaño, presentan cromosomas politénicos, son poliploides y están determinadas genéticamente (Demerec 1965).

Durante la metamorfosis, la hormona ecdisona desencadena una serie de cambios en el organismo, este proceso involucra la destrucción de ciertos tejidos y órganos larvales (histólisis) y la organización de las estructuras del adulto a partir de las células de los discos imagales. Los órganos que son completamente histolizados durante la metamorfosis son las glándulas salivales, el intestino, los cuerpos grasos y los músculos. Las extremidades, ojos, antenas, alas y el aparato genital se diferencian a partir de su respectivo disco que debido a una histogénesis durante el desarrollo pupal da origen a las distintas partes del cuerpo del adulto (Fig. 3).

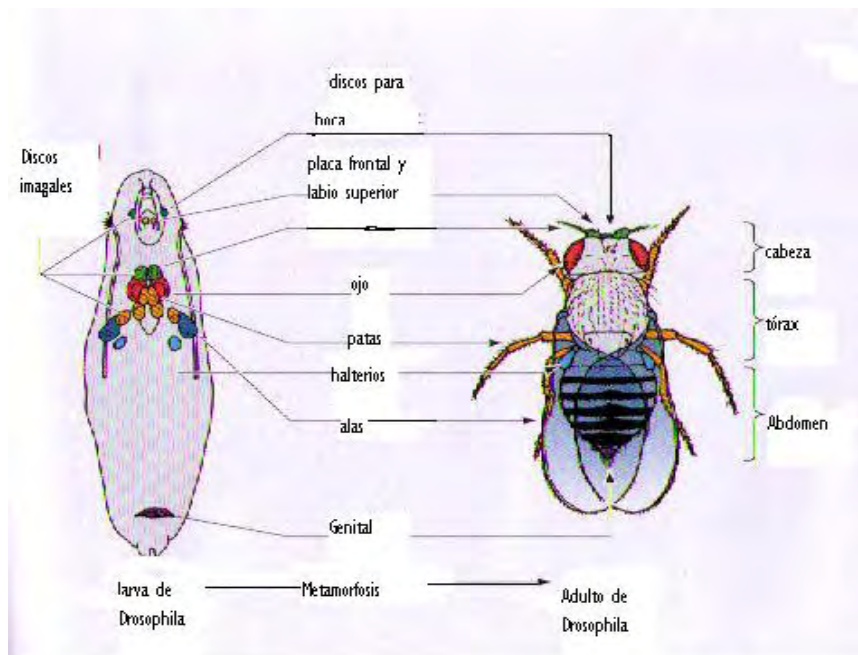


Fig. 3 Localización e identificación de los discos imagales en la larva madura. (Gilbert, 2006).

I.4 Desarrollo del ojo.

Aproximadamente a las 16 horas después de la eclosión de la larva, presenta indicios de la presencia del complejo cefálico de los discos antenal -ocular (Demerec 1965).

En la larva de 25 horas de edad, el complejo cefálico está compuesto por dos sacos frontales los cuales se originan por evaginaciones de la pared dorsal de la faringe, a las 48 horas el complejo antenal- ocular empieza a incrementar su tamaño y el pedúnculo del ojo unido al cerebro ya es evidente. Semejante a otros discos imagales, durante el periodo larval el complejo antenal-ocular crece por multiplicación celular y el tamaño de las células permanece constante. A las 51 horas, el complejo antenal - ocular adquiere una forma ovalada integrada por varias capas celulares, el tallo óptico está claramente presente a las 56 horas y la proporción anterior del complejo se ha alargado (Demerec 1965).

El complejo se incrementa en tamaño (64 horas), la porción anterior está ensanchada y la porción posterior empieza a ampliarse, la diferenciación del complejo hacia los discos de antena y ojo propiamente ha empezado.

A las 74 horas se distingue claramente la porción anterior y la posterior. Los discos de las antenas y los ojos se distinguen perfectamente y a las 80 horas están bien formados, y conectados por una delgada capa de células que incrementan su tamaño.

El disco de la antena empieza a plegarse (86 horas), probablemente en este tiempo también las células del disco del ojo inician su organización hacia unidades, éstas se observan por primera vez en larvas de 96 horas, cada una consiste de un grupo de cuatro células, solo unos pocos de estos grupos están presentes, pero se incrementan en número conforme el ojo se desarrolla. Cada grupo de células es precursor de una omatidia. La segmentación del disco de la antena continua (106 horas), hasta que a las 120 horas los discos han llegado a su tamaño máximo, las células (4) agrupadas se arreglan en hileras y termina la segmentación del disco antenal-ocular (Demerec 1965).

Vogel et al (1989) obtuvieron información experimental de la biología del desarrollo de *D. melanogaster* mediante el uso de rayos X. Proponen que el número de células precursoras de omatidias es de aproximadamente 20 en el primer estadio larval, se incrementa a 150 - 200 células durante el segundo estadio y alcanza de 780 a 800 pre-omatidias durante el tercer estadio, después de 3-4 divisiones celulares. La diferenciación de las células precursoras tiene lugar durante el tercer estadio larvario, la mayoría de las células

pigmentarias se producen en la división mitótica de la segunda ola de división. Las células primordiales del ojo compuesto se dividen continuamente durante el periodo larval y cualquier alteración genética en estas células puede ser reconocida como manchas blancas en el contexto rojo del ojo compuesto del adulto.

I.5 Eventos cronológicos de la formación de las alas.

A las 15 horas ya se han elongado y poseen un buen espacio. A las 24 horas la elongación aumenta y se diferencian el saco peripodial y el disco propiamente dicho. La pared interna del disco se engrosa y empiezan a alargarse. Hacia las 57 horas el disco ha crecido considerablemente, aparece una segunda cresta y empieza a presentarse un pliegue concéntrico. Se completa el plegamiento, una impresión superficial o marca, señala la evaginación posterior de la bolsa del ala. Durante la formación del pupario, alrededor de las 97 horas se inicia la evaginación y se forma la bolsa del ala que casi está completa a las 102 horas; se forman las venas prepupales y las alas empiezan a inflarse. A las 116 horas hay venas en la punta y en la base del ala, son muy gruesas.

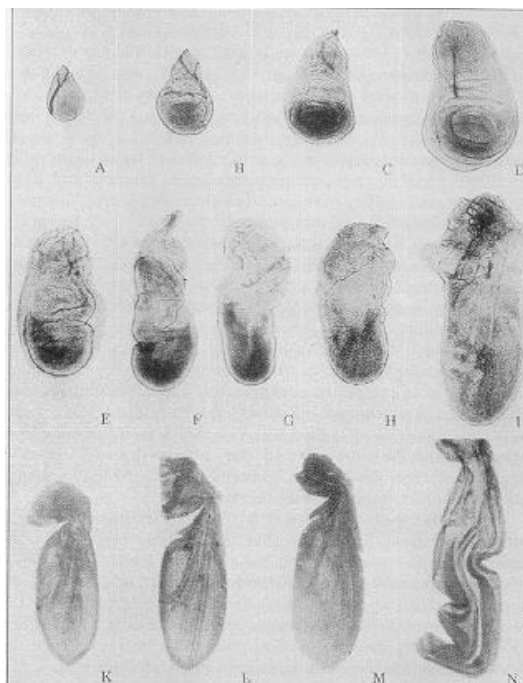


Fig. 4 los diferentes estadios en el desarrollo del ala. A-D estadios sucesivos durante el tercer estadio larval. E-I estadios sucesivos entre la formación del pupario y la pupa. K-N estadios sucesivos durante el estadio de pupa (Demerec, 1965).

Las alas en esta fase son una hoja muy delgada y empiezan a extenderse, se completa la venación alrededor de las 138 horas, el ala está completamente formada, ya se han desarrollado los tricomas, a las 140 horas las alas empiezan a plegarse, esta lista para emerger a las 192 horas (Fig. 4).

I.6 Control genético del desarrollo de *Drosophila*.

En *Drosophila*, el desarrollo está controlado por una cascada de genes reguladores que actúan en una secuencia específica para imponer distintos patrones de expresión génica en las diferentes regiones del huevo fertilizado, luego en las diferentes células de la blástula y así sucesivamente hasta obtener la compleja forma de la mosca adulta. Los diversos programas de expresión génica son encendidos por una cascada de genes reguladores diferentes que actúan en secuencias preprogramadas durante el desarrollo. Muchos de ellos ya se han identificado. Alrededor de la mitad, codifican proteínas transactivantes que regulan la transcripción de otros genes, que a menudo incluyen al o a los siguientes genes reguladores de la cascada de reguladores de la morfogénesis. El desarrollo empieza aun antes de la fertilización del huevo con gradientes moleculares estableciéndose en el huevo maduro (García, et al., 1979) continúa después de la fertilización con patrones específicos de expresión génica en las varias etapas del desarrollo embrionario. Las metamorfosis de larva a pupa y de pupa a adulto requieren cambios repentinos en los programas de expresión génica.

Los preparativos para la metamorfosis de los insectos se realizan durante las primeras etapas de la morfogénesis. Son 19 los discos imagales están destinados a originar un órgano específico. Aunque en su mayor parte estas células son no diferenciadas, sus destinos ya han sido decididos genéticamente. Por lo general estos grupos de células establecen vínculos irreversibles con patrones específicos de diferenciación, lo que se conoce como determinación, ésta ocurre en la etapa celular de blastodermo. Se ha demostrado que la determinación celular está bajo el control genético; esto lo demuestra el hecho de la existencia de mutaciones homeóticas; es decir, mutaciones que ocasionan estados alterados de la determinación de discos imagales específicos. Las mutaciones homeóticas en *Antennapedia* (ANT-C) afectan el desarrollo de las regiones de la cabeza y

el tórax de la mosca, y los de bitórax (BX-C) alteran el desarrollo de los segmentos del tórax y el abdomen del cuerpo (García, et al., 1979; Gilbert, 2006).

Lynch et al., (1991) propusieron a este organismo como bioensayo para evaluar teratogénesis. En su trabajo expusieron a *Drosophila melanogaster* en el estadio de huevo a agentes teratogénicos y cuantificaron las alteraciones morfológicas en la fase adulta. Con base en la respuesta observada sólo consideraron confiable el efecto de dos biomarcadores: la presencia de sedas humerales tipo “*bent*” (sedas dobladas en un ángulo de 45°, en contraposición a las sedas rectas de las moscas no expuestas), y alas tipo “*Notch*” (alas que muestran una muesca en el borde de la hoja del ala). La aparición de este tipo de alas recuerda mucho a las producidas por el gen *Bd^s* (*Beaded - Serrate*) (Lindley y Grell, 1972). De esta manera, las alas tipo “*Notch*” son una fenocopia del gen *Bd^s* inducida por la exposición a teratógenos (Lynch et al., 1991; Muñoz et al., 2003; Ríos, 2007).

|I.7 *Drosophila melanogaster* como Sistema de Prueba de Teratogénesis.

Para evaluar el riesgo que pueda representar para la salud humana la exposición a alguna sustancia o compuesto químico, se parte de una premisa básica: las sustancias químicas que dan lugar a tumores en los animales también pueden causarlos en los seres humanos (Klaassen, 2005).

Expertos en el campo de la teratología, han indicado que hay una gran necesidad de desarrollar sistemas de biomonitoreo que ayuden a establecer prioridades para la valoración de toxicidad en el desarrollo con organismos *in vivo*. Esta necesidad ha surgido porque aunque tradicionalmente las pruebas de valoración teratológica se han hecho en mamíferos, estas son de costo elevado, los organismos para su desarrollo requieren mucho tiempo, además de un entrenamiento técnico especializado para su manejo. Idealmente las pruebas de monitoreo deben ser simples, rápidas económicas y confiables. La mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, tiene muchas características como organismo para monitorear químicos (Schuler, et al., 1982; Lynch et al, 1991).

Este díptero es un eucarionte multicelular, con una organización cromosómica y celular similar a los mamíferos, un genoma pequeño de 4 cromosomas, lo que facilita su análisis molecular, su ciclo de vida es de 10 días, lo que permite el rápido análisis de mucha

progenie y posibilita el empleo de dosis crónicas, agudas y fraccionadas (Rubin, 1988), Las moscas *Drosophila* son capaces de absorber, distribuir, metabolizar y excretar los químicos mientras producen grandes cantidades de descendencia en un período de tiempo corto (Lynch et al, 1991). Así mismo, es un modelo de bioensayo técnicamente sencillo por su tamaño pequeño, lo que facilita su manejo así como el poco espacio que ocupa y un costo sumamente económico. Este sistema además de ser sensible permite acortar el tiempo del ensayo a una sola generación, se tiene fácil acceso al material embrionario.

I.8 JUSTIFICACIÓN

Las implicaciones de las alteraciones que ocurren durante el desarrollo de los organismos, muestran la necesidad de disponer de organismos de prueba *in vivo*, lo suficientemente sensibles que puedan emplearse en estudios preliminares de evaluación del riesgo potencial de diversos factores para la progenie. Un bioensayo que alerte oportunamente de sustancias potencialmente teratogénicas a las que cotidianamente se puede estar expuestos en el ambiente, y por diversas vías.

De esta manera se justifica la investigación de la viabilidad y confiabilidad de modelos de prueba que proporcionen datos preliminares de los efectos teratogénicos de medicamentos y químicos de uso común en la vida diaria, no sólo para evaluar el riesgo potencial para la progenie, sino también como herramienta para determinar su potencial teratogénico.

Este trabajo forma parte de una investigación de calibración metodológica, de *Drosophila melanogaster* como bioensayo para prueba de teratogénesis (Muñoz, 2003; Figueroa, 2003; Bautista, 2005; Ríos, 2007).

I.9 Objetivo.

Este trabajo establece como Objetivo General:

Determinar el efecto teratogénico de los compuestos griseofulvina y etanol en el desarrollo larvario de *Drosophila melanogaster*.

Como objetivos específicos:

1. Establecer la actividad teratogénica de estos dos compuestos mediante la prueba de teratogénesis en *Drosophila melanogaster*.
2. Determinar la factibilidad de usar a *Drosophila melanogaster* como un modelo para evaluar actividad teratogénica.

I.10 Hipótesis

La frecuencia de malformaciones de moscas adultas tratadas durante el desarrollo larvario con griseofulvina y etanol será mayor que la de moscas no tratadas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Compuestos químicos.

Las sustancias utilizadas fueron obtenidas de las siguientes casas comerciales:

a). Alcohol Etilico (EtOH) J.T. Baker hecho en México, una división de Mallinckrodt Baker, S. A. de C.V.

Fórmula: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, p.m. 46.07g CAS [64-17-5] densidad 0.785

Sin color, líquido flamable, olor agradable, sabor quemante. Absorbe rápidamente el agua del aire. Se mezcla con agua y con muchos líquidos orgánicos.

Concentraciones empleadas de EtOH disueltas con agua destilada: 0.86, 1.3, 1.7, 2.56, 3.4 mM, como testigo negativo se utilizó agua destilada.

b). Griseofulvina (GF) Sigma – Aldrich Química, S.A. de C.V.

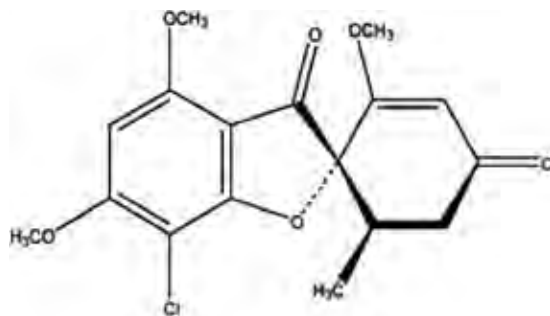
Formula: $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{ClO}_6$, PM. 352.77g CAS [126-07-8]

Polvo cristalino de color blanco. Se disuelve en dimetilformamida (DMF) a 25 °C: 12 a 14 g/100 ml, es ligeramente soluble en etanol, metanol, acetona, benceno, triclorometano (CHCl_3), etilacetato, ácido acético, prácticamente insoluble en agua.

Concentraciones empleadas de (GF): 0.35, 0.71, 1.41, 2.13 mM, el testigo negativo fue una solución de alcohol etílico al 4 %.

Para ambas sustancias las concentraciones se obtuvieron mediante diluciones sucesivas a partir de una solución stock (la concentración más alta, para cada compuesto).

Las concentraciones empleadas de cada teratógeno utilizado se basaron en el reporte de Lynch (1991) y se incluyeron algunas más bajas:



GRISEOFULVINA

II.2 Material biológico.

Se utilizó la especie *Drosophila melanogaster*: la línea de tipo silvestre, Canton – S (Fig. 5). Los cultivos se mantuvieron a $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ con una humedad relativa de 60% en un medio de cultivo estándar.

Sincronización

Se obtuvieron hembras vírgenes de no más de 72 horas de edad y se cruzaron con machos no mayores de 48 horas.



Fig.5 macho y hembra línea Canton-S

Después de tres días de realizada la cruce, los progenitores se trasvasaron a medio fresco, para que las hembras ovipositaran durante un intervalo de 8 horas, posteriormente los progenitores se retiraron de los frascos.

II.3 Tratamiento

Transcurridos 3 días se obtuvieron larvas (Canton S) de $72 \pm 4\text{ h}$ por el método de Nöthinger (1970) que utiliza un gradiente de sacarosa al 20%, el cual provoca que las larvas floten en la superficie por diferencia de densidad y se hacen pasar por un embudo de separación, para ser recolectadas en una malla de tela nylon. Con una espátula se colocaron grupos de 100 a 150 larvas en tubos homeopáticos de 15ml de capacidad, que contenían 1 g de medio instantáneo para mosca (Carolina Biological Supply, Inc., Burlington), el cual se

pulverizó previamente para favorecer la distribución del compuesto y 4.5 ml de la solución a probar GF y EtOH. Las larvas permanecieron ahí hasta que emergieron los adultos y se fijaron en alcohol al 70%, para su posterior revisión en el microscopio estereoscópico. Por cada concentración se utilizaron cuatro lotes y el experimento completo se repitió cuatro veces para determinar la repetitividad en la respuesta y aumentar el tamaño de muestra.

En el trabajo de Lynch et al., (1991), exponen a las moscas al tratamiento desde la etapa de huevo, previamente los cuentan (varias veces), para sacar los datos de sobrevivencia, la cual calculan mediante la relación (núm. de moscas cosechadas/ núm. de huevos depositados). En este trabajo se utilizaron larvas del tercer estadio para la administración de los compuestos tóxicos, primero porque el consumo de comida es muy alto durante la vida larvaria, además hay una intensa actividad metabólica del cuerpo graso en el 3er estadio y todavía la respuesta hormonal es baja lo que asegura que el organismo pueda entrar a la siguiente fase de su ciclo de vida, la pupación y esto posibilita evaluar el daño en los biomarcadores expresados en la fase adulta.

II.4 Revisión morfológica de las moscas tratadas.

Una vez recobrados los adultos, se registró el número de moscas por sexo (hembras y machos), así como el número total por tubo y se procedió al análisis morfológico de hembras y machos para identificar alteraciones externas. Cada mosca fue examinada con ayuda de un microscopio estereoscópico Nikon a un aumento de 40x, la apariencia del cuerpo por su parte dorsal, ventral y lateral. Particularmente se revisaron estructuras indicadoras en las regiones del cuerpo: En cabeza: las sedas, antenas, ojos y partes bucales. En el tórax: patas, halterios, alas. En abdomen: segmentos y placa genital. Todo el material se conserva en alcohol al 70%.

Análisis de resultados

Para cada concentración probada (x) se obtuvo el Índice de Sobrevivencia (IS) como: la proporción de moscas recobradas en las series experimentales con respecto a las recobradas en el testigo:

$$\text{Índice de Sobrevivencia (IS)} = \frac{\text{Experimental}}{\text{Testigo}}$$

El IS es un indicador de la toxicidad del tratamiento en los organismos expuestos (Arellano, 2002). Se obtuvo el IS por experimento como el promedio de las 4 repeticiones y el IS por concentración, como el promedio de los IS obtenidos en cada experimento (promedio \pm error estándar).

La proporción de sexos (machos) se obtuvo como el cociente del número de organismos de machos, entre el número total de organismos recobrados por concentración.

$$\text{Proporción Sexual (PSx)} = \frac{\text{Machos}}{\text{Hembras} + \text{Machos}}$$

La Proporción Sexual (PSx) por concentración, se obtuvo como el promedio de las cuatro series en cada experimento y posteriormente, el promedio de los cuatro experimentos independientes (promedio \pm error estándar). Este marcador indica si el compuesto tiene un efecto diferencial dependiendo del sexo del organismo expuesto.

La Frecuencia de Malformaciones se determinó como el cociente del número de malformaciones encontradas entre el total de moscas registradas por concentración:

$$\text{Frecuencia de Malformaciones (FM)} = \frac{\text{Número de Malformaciones}}{\text{Total de moscas}}$$

Para establecer si existen diferencias significativas entre las moscas testigo y las moscas expuestas, para cada compuesto probado se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para comparar el IS entre cada concentración y el testigo, utilizando un $\alpha = 0.05$. El mismo método se utilizó para determinar si existen diferencias en los resultados obtenidos en la proporción sexual (PSx).

En ambos casos, si el ANOVA detectaba diferencias significativas entre las moscas experimentales y las testigo, se procedió a realizar la prueba de Tukey, para confirmar las diferencias, también a un $\alpha < 0.05$.

Con respecto a los resultados obtenidos en la Frecuencia de Malformaciones, para determinar si mostraron diferencias significativas entre las moscas registradas de las series experimentales y las moscas testigo, se utilizaron las tablas de comparación de Kastenbaum- Bowman $\alpha= 0.01$ (tablas empleadas para la determinación de significatividad estadística, para frecuencia de mutaciones en *Drosophila*), (Kirkland, 1989).

Asimismo para establecer la asociación entre el IS, PSx y FM en una escala ordinal, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson.

III. RESULTADOS

Se espera que el posible genotóxico interfiera con la cascada de expresión génica que regula el proceso de metamorfosis del adulto, de esta manera las malformaciones recobradas en las moscas adultas no pueden asociarse con cambios en el ADN, sino con la interferencia en la expresión de los genes en un patrón relacionado con el tiempo de diferenciación de los discos imagales.

A los organismos que presentan alteraciones morfológicas sin que tengan en su genoma el genotipo correspondiente se les llama **fenocopias**. (Bautista, 2005; Ríos, 2007).

III.1 Griseofulvina

Se muestra el Índice de Supervivencia (IS) obtenido al exponer larvas de 72 ± 4 horas de edad a diferentes concentraciones de griseofulvina. Se observa como el aumento en la concentración del compuesto (GF), afectó notablemente al IS ya que a partir de la concentración 1.41 mM se recupera menos de la mitad de la población (0.48), comparada con el grupo testigo (Fig. 7, Tabla 1).

Tabla 1. Total de org. Analizados, IS y PSx (prom \pm ee) obtenidos al exponer larvas de tercer estadio larvario con GF.

[mM]	♀	♂	Total	IS prom.	Psx prom
0	872	830	1702	1.0 \pm 0	0.49 \pm 0.02
0.35	772	756	1528	0.88 \pm 0.05	0.5 \pm 0.01
0.71	669	665	1334	0.76 \pm 0.06	0.51 \pm 0.02
1.41	404	473	877	0.48 \pm 0.05	0.55 \pm 0.03
2.13	366	372	738	0.39 \pm 0.07	0.49 \pm 0.01

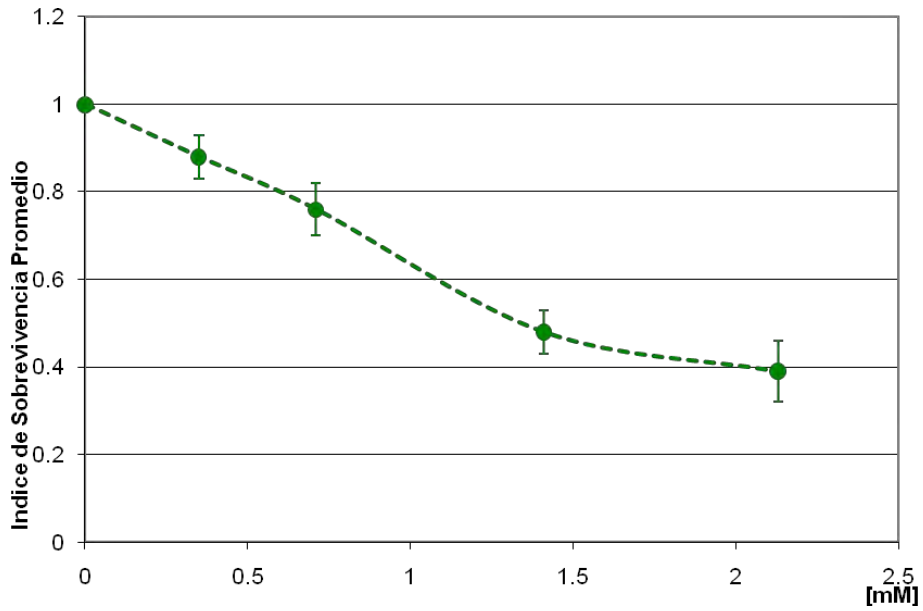


Fig.6 Índice de Supervivencia (IS $\text{prom} \pm \text{ee}$) obtenido al exponer moscas *Drosophila melanogaster*, del tipo silvestre, durante la etapa de desarrollo larvario a diferentes concentraciones de GF.

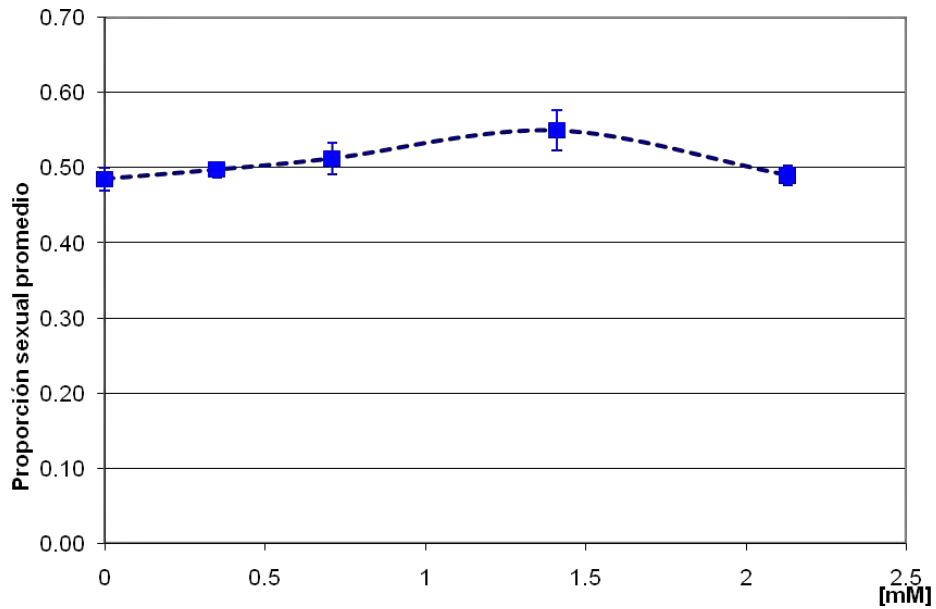


Fig. 7 Proporción Sexual (PSX) ♂ y error estándar de *D. melanogaster* expuesta a diferentes concentraciones de GF.

La proporción de sexos de las moscas tratadas con griseofulvina es muy similar en todas las concentraciones en general, aunque en la concentración 1.41 mM se recobran un poco más de machos (0.55) no es significativo (Fig. 7; Tabla 1).

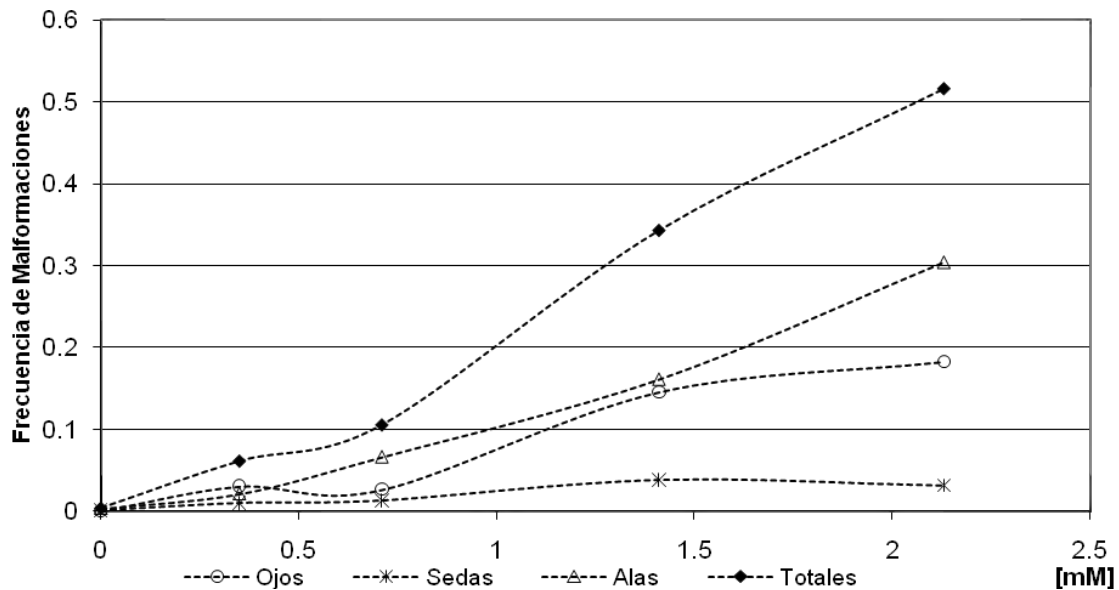


Fig. 8 Frecuencia de Malformaciones de moscas *D.melanogaster* expuestas durante el desarrollo larvario a diferentes concentraciones de (GF).

Frecuencia de Malformaciones inducidas por GF, el compuesto afectó principalmente; las alas y los ojos de las moscas expuestas, aún en las concentraciones más bajas probadas ver (Figs.6 a 8). Con la concentración 0.35 mM se obtuvo una Frecuencia de Malformaciones para ojos de 0.030, y en alas de 0.021; con 0.71 mM la frecuencia de alas alteradas fue de 0.066 y para ojos de 0.026. Aunque en sedas se obtuvo una menor proporción, el incremento en todas las concentraciones fue significativo ($p < 0.01$) todas las frecuencias resultaron significativas según las tablas de Kastenbaum-Bowman. Se observa claramente la relación a mayor concentración mayor, respuesta (Fig. 8; Tabla 2).

Tabla 2. N y Frecuencia de Malformaciones inducidas en moscas silvestre expuestas a diferentes concentraciones de GF significativo a $p < 0.01$

[mM]	N	cabeza		Tórax				Totales	Frec.
		Ojos	Frec.	Sedas	Frec.	Alas	Frec.		
0	1702	0	0	2	0.001	5	0.003	7	0.004
0.35	1528	46++	0.03	16++	0.01	32++	0.021	94	0.062
0.71	1334	35++	0.026	18++	0.013	88++	0.066	141	0.106
1.41	877	127++	0.145	33++	0.038	141++	0.161	301	0.343
2.13	738	134++	0.182	23++	0.031	224++	0.304	381	0.516

Kastenbaum - Bowman, * $P < 0.05$; ++ $P < 0.01$

El análisis de varianza (ANOVA), indicó diferencias significativas en el IS ($p < 0.05$) (tabla3) y a través de la prueba de Tukey se confirmó que éstas se asocian a los grupos de concentración 0.71, 1.41 y 2.13 mM (Tabla 5).

Tabla 3. resumen de la prueba de ANOVA GF para $\bar{I}S$ prom.($p < 0.05$)

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	p
Efecto	1.077	4	0.2693	25.16	0.0001
Error	0.1606	15	0.0107		

Sin embargo, para la Proporción Sexual, las diferencias no resultaron significativas mediante la aplicación de este mismo análisis estadístico (Tabla 4).

Tabla 4. Resumen de la prueba de ANOVA GF para PSx promedio

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	p
Efecto	0.00877	4	0.002192	1.608	0.2237
Error	0.02045	15	0.00136		

Tabla 5. Prueba de Tukey, **** ($p < 0.05$)

Concentraciones	Efecto significativo				
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
0 {1}	—	****	***	****	****
0.35 {2}	—	—	—	****	****
0.71 {3}	—	—	—	****	****
1.41 {4}	—	—	—	—	****
2.13 {5}	—	—	—	—	—

Posteriormente se realizó una correlación entre el Índice de Supervivencia (IS) y la Frecuencia de Malformaciones (FM), obteniendo un coeficiente de correlación de Pearson de, $r = 0.97$ para cabeza y de $r = - 0.98$ para tórax; es decir hay una correlación significativa (Fig. 9, Tabla 6).

Tabla 6. Prueba de correlación de Pearson

CORRELACION DE PEARSON GF para IS prom.			
IS/PSx	FM/PSx	FM/IS(Cabeza)	FM/IS(Tórax)
cr = - 0.4008	cr = - 0.4448	r = 0.9704	r = - 0.9870

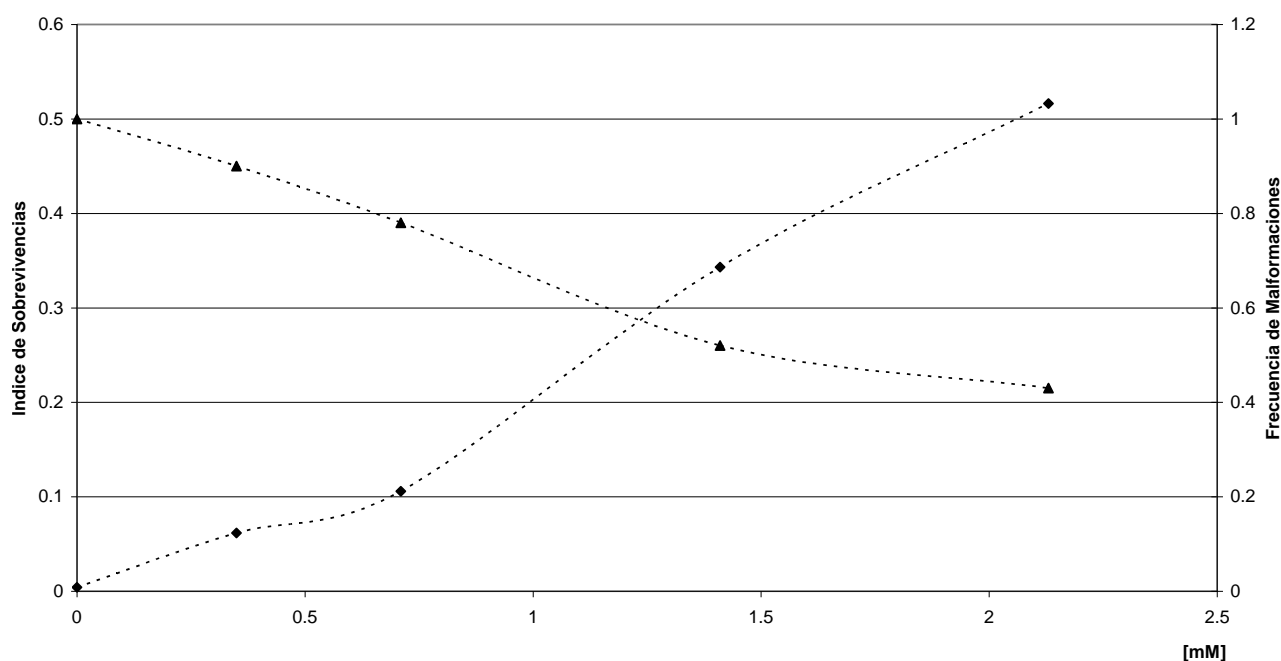


Fig. 9 Correlación de Índice de Supervivencia y Frecuencia total de Malformaciones obtenida de moscas expuestas a diferentes concentraciones de GF.

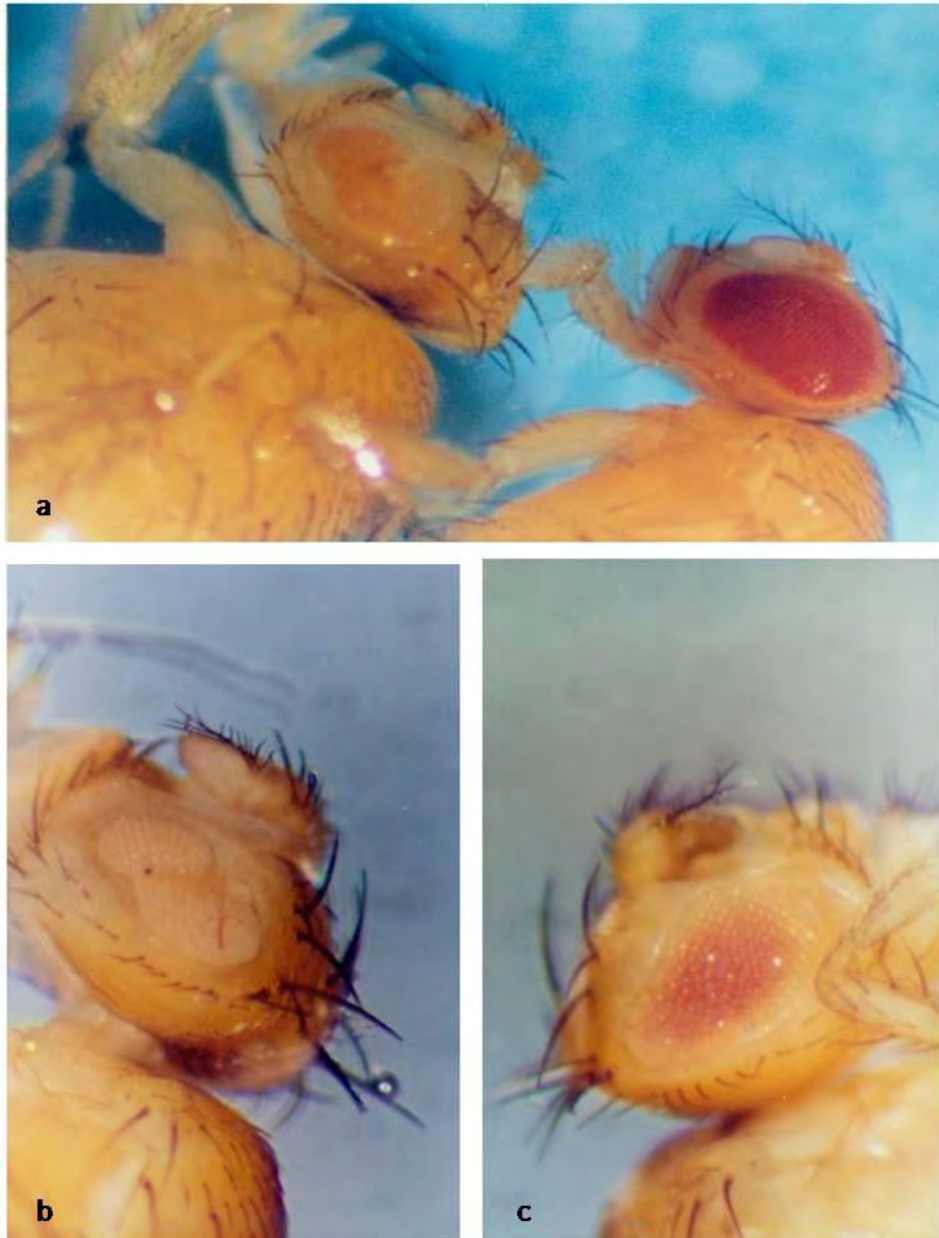


Fig. 10 (a) muestra la comparación entre un ojo silvestre un ojo tipo muesa; (b y c) malformaciones en ojo tipo muesa de organismos expuestos a diferentes concentraciones de GF.

Las (Figuras 10 a 12) muestran malformaciones en ojos tipo “muesca”, sedas humerales tipo “bent”, dobladas en un ángulo de 45 grados y alas tipo “Noch”, provocadas en las moscas expuestas a diferentes concentraciones de griseofulvina.



Fig. 11 malformaciones de *D melanogaster* en alas tipo “Notch” (a,b,c) en moscas expuestas durante el desarrollo larvario a GF; (a) hembra con las dos alas afectadas; (d) alas silvestre.



Fig. 12. Malformaciones de moscas *D. melanogaster* en sedas humerales expuestas durante el desarrollo larvario a GF; (a) silvestre; (b) seda humeral corta; (c,d), tipo “bent” ;

III.2 Etanol

Con relación a los tratamientos de larvas con diferentes concentraciones de alcohol se muestra el IS promedio obtenido. Conforme se incrementó la concentración se recobraron menos organismos, en 1.7 mM sólo se recuperó la mitad de la población, (IS 0.50) y en la siguiente concentración 2.56 mM se obtuvo un Índice de Supervivencia de 0.03 que representa prácticamente el 3% de la población total recuperada en el grupo control. La concentración más alta probada resultó letal (Fig. 15, Tabla 7).

Tabla 7 Índice de Supervivencia (IS± ee) y Proporción sexual(PSx, prom ± ee) de organismos expuestos durante tercer estadio larvario a diferentes concentraciones de EtOH.

[mM]	♀	♂	Total	IS prom ± ee	PSx ♂ prom ± ee
0	943	982	1925	1 ± 0	0.51± 0.01
0.86	876	861	1737	0.9 ± 0.02	0.5 ± 0.01
1.3	749	777	1526	0.79 ± 0.03	0.5 ± 0.02
1.7	473	497	970	0.52 ± 0.09	0.51 ± 0.02
2.56	32	28	60	0.03 ± 0.02	0.4 ± 0.14
3.4	11	1	12	0.01 ± 0	0

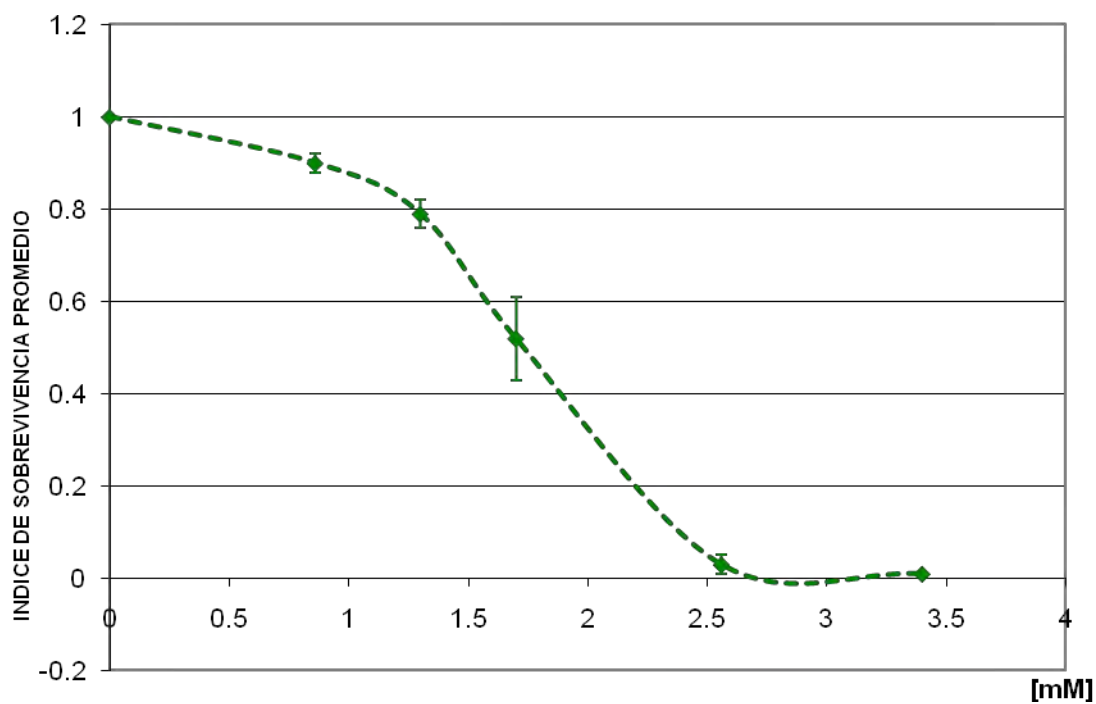


Fig. 13 Índice de Supervivencia promedio (IS ± ee) en obtenido moscas de *Drosophila melanogaster* C-S expuestas durante tercer estadio de desarrollo larvario a diferentes concentraciones de EtOH.

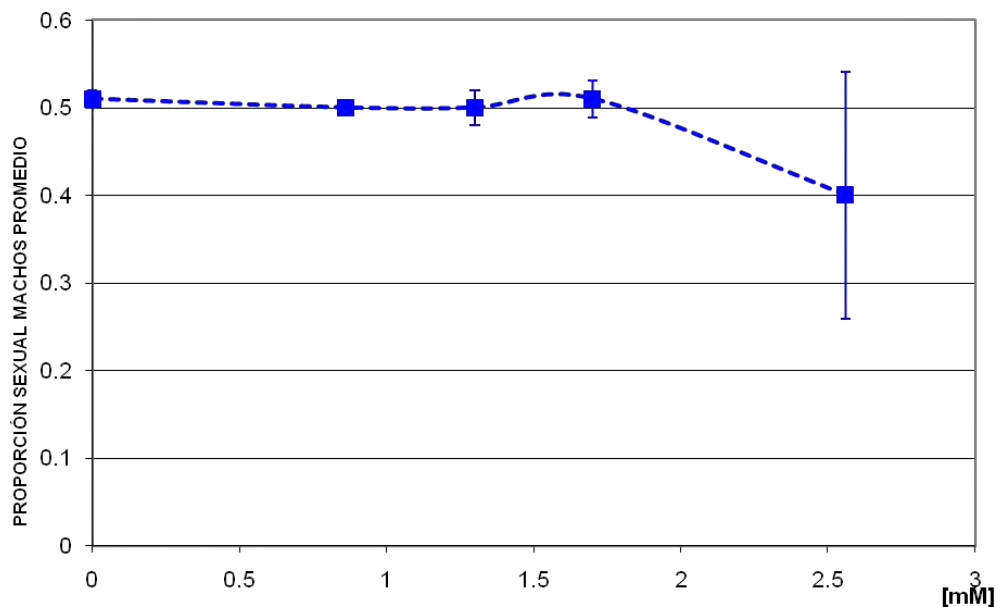


Fig. 14 Proporción Sexual promedio (PSx±ee) obtenido de moscas ♂ *Drosophila melanogaster* C-S expuestas durante el tercer estadio de desarrollo larvario a EtOH

En cuanto a la Proporción Sexual (PSx ♂) que nos indicaría si el compuesto tiene efecto diferencial dependiendo del sexo, se observan diferencias solo en la concentración 2.5 mM la proporción de machos fue menor, se obtuvo una PSx promedio de 0.40 no significativa. La concentración mayor probada 3.4mM no está indicada en la gráfica porque no fue factible calcular el promedio, ya que se recuperó solo un organismo.

Tabla 8 malformaciones inducidas en moscas C - S expuestas a EtOH FM

Tórax								
[Mm]	N	Sedas	Frec.	Alas	Frec.	Frec.	totales	Frecuencia
0	1925	2	0.001	0	0	0	2	0.001
0.86	1737	19++	0.011	8++	0.005	0.005	27	0.016
1.3	1526	20++	0.013	3-	0.002	0.002	23	0.015
1.7	970	11++	0.011	0-	0	0	11	0.011
2.56	60	3++	0.05	0-	0	0	3	0.050
3.4	12	1-	0.083	0-	0	0	1	0.083

Kastenbaum - Bowman, *p< 0.05; **p< 0.01

Con relación a las malformaciones producidas, reportadas por regiones del cuerpo, no se obtuvieron alteraciones en cabeza; sin embargo, en sedas humerales se recobraron las frecuencias más altas y mediante las tablas de comparación de Kastenbaum –Bowman resultaron significativas ($p < 0.01$). Las alteraciones provocadas en alas, resultaron significativas solo en la concentración más baja, 0.86 mM (Fig 15, tabla 8).

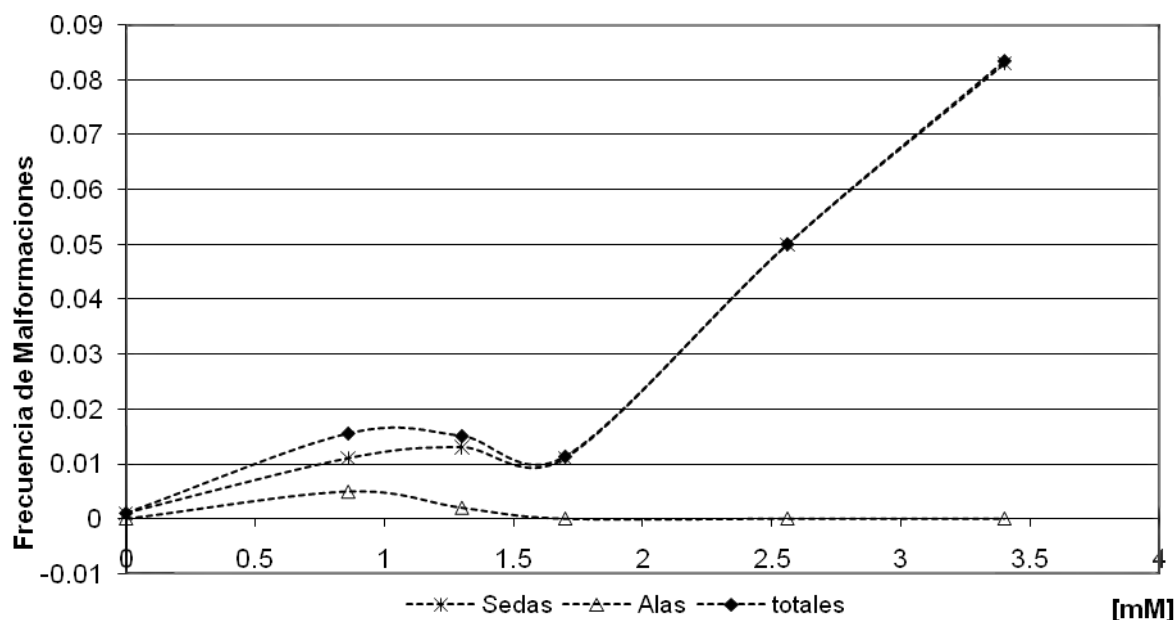


Fig. 15 Frecuencia de malformaciones obtenidas en moscas *D. melanogaster*, al exponer larvas de tercer estadio larvario a EtOH.

Los Índices de Supervivencia y la Proporción Sexual promedio obtenida en las series experimentales y testigo fueron comparados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía ($p < 0.05$), en la tabla (9) se muestra el resumen; las diferentes concentraciones de etanol modificaron significativamente el número de moscas recobradas ($p < 0.0001$).

Tabla. 9. Resumen de la prueba de ANOVA EOH ($p < 0.05$) para IS

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	p
<Efecto	3.789	5	0.7577	124.8	0.0001
Error	0.1092	18	0.00606		

$p < 0.0001$

La comparación múltiple de medias por el método de Tukey, confirmó las diferencias significativas en el IS entre las tres concentraciones más altas [1.70, 2.56 y 3.40 mM] y el grupo testigo ($p < 0.05$).

Tabla 10. Prueba de Tukey para el IS promedio vs concentración de EtOH

Efecto significativo	concentraciones					
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
0 {1}	—	—	****	****	****	****
0.86 {2}	—	—	—	****	****	****
1.3 {3}	—	—	—	****	****	****
1.7 {4}	—	—	—	—	****	****
2.56 {5}	—	—	—	—	—	—
3.4 {6}	—	—	—	—	—	—

****, $p < 0.05$

El análisis de varianza de una vía para la proporción de sexos promedio para ♂ no resultó significativo ($p = 0.5804$).

La correlación de Pearson indicó que no hay correlación significativa entre la Frecuencia de Malformaciones y el Índice de Supervivencia, tampoco con la Proporción Sexual.

Tabla.11. Resumen de la prueba de ANOVA EOH ns para PSx prom.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	p
Efecto	0.216	5	0.4324	0.7748	0.5804
Error	1.005	18	0.05581		

$\alpha < 0.05$

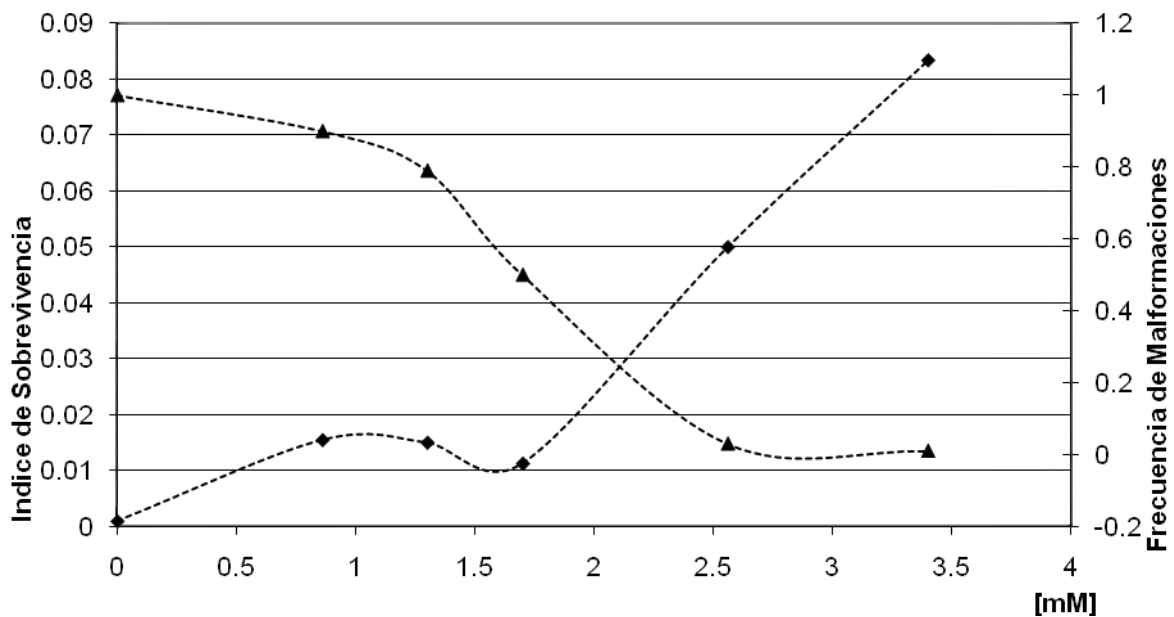


Fig. 16 Correlación entre el Índice de Supervivencia y Frecuencia de Malformaciones de moscas expuestas durante el desarrollo larvario de tercer estadio a EtOH.

Respecto a la correlación entre la Frecuencia de Malformaciones (FM) y el Índice de Supervivencia (IS) obtenida mediante la correlación de Pearson no es significativa, la relación entre estos dos biomarcadores, la Frecuencia de Malformaciones aumenta, cuando la población disminuye notablemente al aumentar la concentración del compuesto de prueba.



Fig. 17. Malformaciones obtenidas como resultado de la exposición de larvas de tercer estadio a diferentes concentraciones de EtOH. Sedas humerales tipo “bent” (a,c,d);sedas humerales silvestres; (c) sedas humerales reducidas.

Malformaciones morfológicas obtenidas en *Drosophila melanogaster* expuestas durante el desarrollo larvario de tercer estadio a diferentes concentraciones de EtOH: produce sedas humerales tipo “bent” (Fig.17; a, b, d), pero también provoca sedas muy cortas (17 c; 18, b,c) y alas tipo “Notch” (Fig.19).

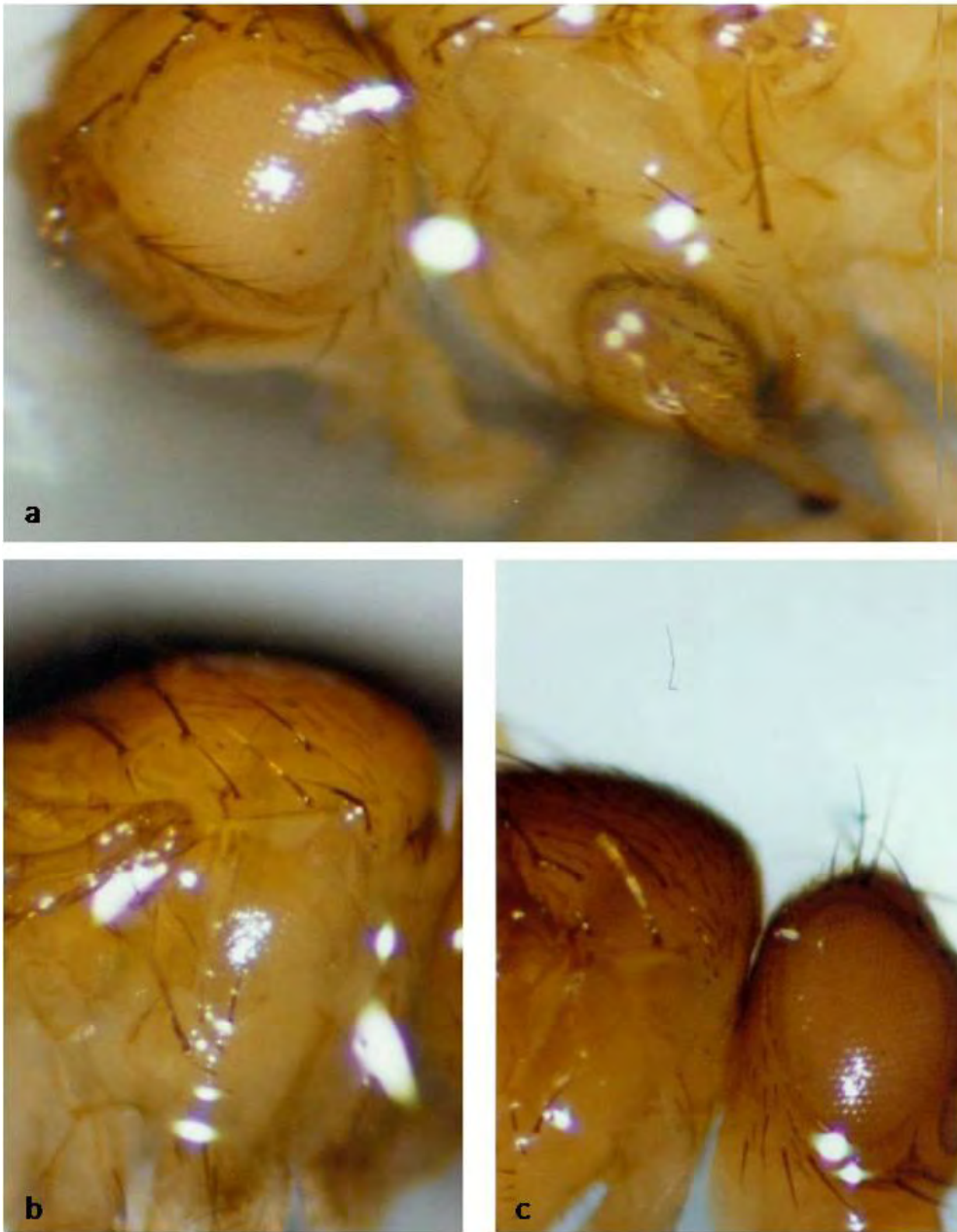


Fig. 18. Malformaciones obtenidas como resultado de la exposición de larvas de tercer estadio a diferentes concentraciones de EtOH. Sedas humerales tipo “bent” (a, b), (c) sedas humeral reducidas.



Fig. 19 Malformaciones obtenidas en moscas *Drosophila melanogaster* C-S, como resultado de la exposición de larvas de tercer estadio a diferentes concentraciones de EtOH /a,b) alas silvestre; (c) ♀ y ♂ presentan malformación en alas tipo "Notch".

IV. DISCUSIÓN

El gran desarrollo industrial genera cada día más productos contaminantes que son potencialmente teratogénicos. Por ello es una necesidad el desarrollo de metodologías experimentales que ayuden a establecer prioridades para la valoración de toxicidad en el desarrollo, con organismos vivos y calibradas en condiciones de laboratorio específicas.

Esta investigación, se enmarca en un proyecto más amplio cuyo objetivo es calibrar la respuesta de *Drosophila melanogaster* ante el efecto de diferentes teratógenos para ser utilizado como un bioensayo para la prueba de teratogénesis.

Para realizar esta etapa de validación se expuso al organismo de prueba a dos compuestos reportados como tóxicos del desarrollo embrionario/fetal; griseofulvina (Klein y Beall 1972; Gillick y Bulmer, 1977; De Carli y Larizza, 1988; Arida et al., 2007) y etanol (Yelin et al, 2007; Parnell et al, 2007; Goodlett, 2005).

Con base en los resultados obtenidos, se confirmó que los compuestos utilizados si afectaron el desarrollo de las moscas, al interferir con la expresión génica implicada en la parte final del desarrollo larvario y en la metamorfosis. La diferenciación de ojos, alas y sedas pudieron ser alteradas provocando la aparición de fenocopias; alas tipo “Notch”, ojos tipo “muesca” y sedas tipo “bent”, en los organismos expuestos a los compuestos de prueba.

Según los patrones de división celular reportados por Gilbert (1988), durante el primer estadio larval después de las 10 horas de desarrollo hay proliferación celular en los discos de ojo y ala, que se mantiene hasta aproximadamente las 100 horas de desarrollo. El disco dorsal protorácico inicia con poca actividad de división celular hacia el final del segundo estadio aproximadamente por las 50 horas de desarrollo, incrementa su actividad después de este periodo y continúa hasta las 100 horas. Esto quiere decir que al tiempo de la exposición los organismos se encontraban en un periodo de gran vulnerabilidad y los órganos indicados pudieron ser un blanco para los teratógenos utilizados.

Según Demerec (1965), la diferenciación y especialización de las células oculares, tiene lugar durante la vida pupal de la mosca.

Schuler et al., (1982) y Lynch et al., (1991) proponen a *Drosophila melanogaster* como bioensayo para teratogénesis y las concentraciones más altas utilizadas en este experimento

coinciden con algunas de las que Lynch trabajó. En este estudio se incluyeron algunas concentraciones más bajas, para obtener datos más cercanos al comportamiento del organismo en casos de exposición a estos compuestos.

Por otra parte Lynch (1991), reportó al etanol como negativo para la prueba de teratogénesis, argumentando que *D.melanogaster* está frecuentemente expuesta al etanol ya que se alimenta y permanece una parte de su ciclo de vida en la fruta fermentada y se presume que la mosca ha desarrollado tolerancia a este compuesto.

Ranganathan et al., citado en Lynch (1991) caracterizaron a etanol como débil positivo, porque utilizaron un diferente criterio de monitoreo. Ellos reportaron defectos estructurales como; alas infra- inflada.

En este trabajo se obtuvieron alteraciones principalmente en sedas y alas y se encontró que la toxicidad aumenta con la concentración. Ramos et al., (2005), mencionan que no todos los organismos responden de la misma manera, algunos pueden alcanzar un umbral de respuesta de inducción enzimática alternativa ante un estímulo, antes de que éste sea determinante para su sobrevivencia. Las alternativas de respuesta se reducen conforme la concentración aumenta, hasta que todos los organismos expuestos, lleguen a mostrar toxicidad aguda y aún la muerte.

En los dos compuestos probados se observó este comportamiento, con 1.70 mM de etanol solo se recuperó a la mitad de la población y además se obtuvo una diferencia muy grande respecto al testigo, misma que se atribuyó al efecto toxico observado.

Y el tratamiento con griseofulvina, si bien los Índices de Sobrevivencia no son tan bajos, a partir de 1.41mM se redujo a la mitad el IS. Para considerar a un compuesto como teratogénico positivo, se debe recuperar como mínimo el 80% de los organismos expuestos ya que, una vez que está muerta la mayoría de la población expuesta no resulta relevante que un compuesto sea teratogénico (Ramos, 1994). Por otra parte el utilizar concentraciones altas en un estudio de monitoreo, no permite saber como se comporta el organismo en condiciones de concentraciones, más comunes de encontrar en el medio ambiente.

Basados en los resultados obtenidos en los organismos expuestos a griseofulvina en la frecuencia de alteraciones se obtuvo una respuesta al compuesto dependiente de la

concentración en el orden de intensidad: alas > ojos > sedas, y la correlación de Pearson entre IS/FM por regiones del cuerpo resultó significativa, para cabeza y tórax.

En la metodología que Lynch (1991) empleó, se contaron los huevos iniciales y después se contaron los adultos emergidos para sacar un índice entre el número de adultos cosechados y el número de huevos depositados. En éste trabajo, las larvas en el tercer estadio de desarrollo se obtuvieron gentilmente utilizando, el método de Nöthiger (1970), este procedimiento disminuye el exceso de manipulación de los organismos y por ende el estrés, mismo que podría modificar la respuesta al compuesto de prueba, además se sabe que la exposición desde esta etapa disminuiría la viabilidad de los organismo.

Lynch (1991) propone evaluar la respuesta del bioensayo a los tóxicos del desarrollo con base en los biomarcadores; sedas “bent” y alas “Notch” únicamente.

Los dos tóxicos de desarrollo, probados, indujeron un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de sedas “bent”, alas “Noth” y ojos “muesca”.

Si bien la respuesta en los biomarcadores alterados, fue recurrente, no así la forma de la alteración, ya que en las sedas humerales, la alteración presentada no siempre fue de tipo “bent” esta variaba; desde presentar gran reducción en tamaño e incluso ausencia. Es decir el biomarcador, sí puede ser sedas humerales, pero el fenotipo no siempre es “bent”.

En alas la inducción de alteraciones provocadas por griseofulvina es claramente fenotipo parecido a “Notch”, ya que mostraban muescas en el borde y la malformación podía variar desde; 1 a 2 muescas hasta presentar las dos alas completamente alteradas.

En etanol se observa también malformaciones consistentes en; ausencia de sedas en el borde del ala y alas plegadas, aunque los resultados fueron significativos sólo en la concentración más baja.

Bautista, (2005) trabajó con este bioensayo, con moscas *Drosophila hydei* y encontró, además de las alteraciones reportadas por Lynch, (alas tipo “Noth” y sedas tipo “bent”) fusión incompleta en los terguitos del abdomen, y en algunos casos ausencia y reducción en el tamaño del ojo.

El efecto provocado por los diferentes genotóxicos administrados de la misma manera a larvas de la misma edad podría reflejarse en la cabeza, o el tórax dependiendo del tiempo en el que la concentración necesaria para interferir con el desarrollo actúa en el blanco. Se ha propuesto que los compuestos que interfieren con el desarrollo de los organismos

(teratógenos) podrían mostrar especificidad por ciertos órganos; sin embargo, es probable que más bien el efecto detectado dependa del tiempo en el que el compuesto o sus metabolitos están disponibles en el tejido o células sensibles.

Es importante considerar que, además de la exposición directa (en la dieta) a un genotóxico la exposición indirecta también afectará la respuesta. Una vez que el compuesto es ingerido por las larvas, parte de éste es metabolizado y eliminado, ya sea por excreción o por acumulación en los tejidos grasos que son abundantes en los insectos inmaduros. Al iniciar la metamorfosis, el tejido larvario es lisado y la energía contenida en él es utilizada para sostener la diferenciación del tejido imagal, lo que alarga el período de exposición a los compuestos (Dietrich, 1965), es posible que esto suceda con griseofulvina, ya que este genotóxico con el que se obtuvo gran respuesta teratógena, tiene una vida media de 9 a 21 horas y en mamíferos es detectada en la capa del estrato córneo poco después de ser ingerida, ya que se ha detectado su mayor concentración a las cuatro horas de ser administrada por vía oral (Develoux, 2001).

La calibración de bioensayos para pruebas de monitoreo, permite se pruebe la sensibilidad y especificidad del sistema. Se garantice con resultados similares la determinación reproducible de respuestas positivas o negativas, así como se pueda descartar errores o limitantes en la metodología. Por otro lado también permite que se documente la transferibilidad de la prueba entre laboratorios.

Una vez que se entiende las fortalezas y debilidades de la metodología se puede modificar para mejorar el instrumento y que sea más útil, ya que las bases del desarrollo se conservan, por ejemplo el registro de alteraciones durante el desarrollo de este organismo *D. melanogaster*, mostró un comportamiento similar al observado para otras especies de dípteros como; *D. hydei*, *D. virilis* (Bautista, 2005) y una especie de la Familia Phoridae, *Megaselia scalaris* (Ríos, 2007). Se ha descubierto por medio de análisis DNA y de genotecas de diferentes especies con secuencias homeobox de *Drosophila*, que estas secuencias están presentes en una amplia gama de eucariontes superiores, incluyendo ranas, ratones, abejas y seres humanos (Gilbert, 2006). Lo cual permite suponer que ésta podría probarse con resultados similares con organismos que se desarrollan en diferentes ambientes, y así mismo explorar las ventajas y limitaciones de incorporarla en estudios de biomonitoreo en condiciones de campo y laboratorio con vertebrados y plantas. Aunque en

condiciones de laboratorio existen grandes restricciones impuestas por las sociedades protectoras para trabajar con estos animales (Muñoz-Moya et al., 2008).

La sensibilidad de la prueba tiene grandes posibilidades de transferirse a condiciones de vida silvestre, ya que el cambio de forma en algún organismo, en cualquier ambiente, podría indicar que algo está generando cambios y dar señales de alerta, por ejemplo, algún cambio en el patrón de disposición de las nervaduras en las hojas o puede citarse el ejemplo de las ranas de Minnesota, cuyas deformidades en las patas alertaron a la Agencia de control Ambiental de Minnesota (MPCA), y al Programa de Salud Ambiental (NIEHS) respecto a los compuestos de uso agrícola vertidos en los estanques y que estaban causando interrupciones en el desarrollo de las ranas (Davidson, 2004).

IV.1 PERSPECTIVAS

Es posible utilizar la prueba ya que el organismo es sensible, pero sería recomendable probar los compuestos a bajas concentraciones, ya que es más viable, alertar o considerar como factor de riesgo a la exposición a alguna sustancia en condiciones “normales” o cotidianas que en extraordinarias. Me refiero las condiciones en que los organismos pueden estar expuestos en el ambiente.

También se podría ampliar el criterio de revisión de los puntos considerados como blancos. Para identificar a un compuesto con potencial para afectar el desarrollo, el efecto podría ubicarse en cabeza ojos y en tórax: sedas, cualquier alteración no solo “bent”. Y alas a partir de que presenten las alas infra infladas, que presenten muescas o que carezcan de sedas en la orilla de la misma.

V. CONCLUSIONES

1. Nuestro organismo de prueba resulto ser sensible a partir de la concentración más baja experimentada. Exhibe efectos teratogénicos dependientes de la dosis, a mayor concentración mayor frecuencia de alteraciones.
2. Se identificaron los atributos como objetivos a observar en *Drosophila melanogaster*, ala, y sedas humerales.
3. Los compuestos de prueba pudieron alterar el proceso de desarrollo de *Drosophila* en la última etapa de diferenciación del desarrollo larvario y de la metamorfosis, provocando efectos teratogénicos principalmente en ojos alas y sedas.
4. Las concentraciones más altas utilizadas son muy tóxicas para el organismo, no se recupera un tamaño de población suficiente.
5. Este modelo puede ser una alternativa para la prueba de teratogénesis en la valoración preliminar de potenciales tóxicos del desarrollo.
6. Se determinó la sensibilidad y repetitividad de la prueba, principalmente en las concentraciones más bajas probadas.

VI. REFERENCIAS.

- Albert L. A. y Saldívar O. L. (1996) La toxicología en México estado actual y perspectivas. Sociedad Mexicana de Toxicología, A.C. 119-122 pp.
- Arellano A. R. O. (2002). *Drosophila* como modelo *in vivo* para evaluar el potencial genotóxico de muestras ambientales. Los azufres Michoacán Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM. México. 51p.
- Arida A. I., Tabakha M. M., Hambury H. A. (2007). Improving the high variable bioavailability of griseofulvin by seeds. *Chem. Pharm. Bull.* 55(12): 1713 – 1719 pp.
- Bautista-Hernández D. A. (2005) Comparación de la respuesta teratogénica con tres especies del género *Drosophila*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM. México. 65p.
- Bishop J. B. Witt, K. L., Sloane R. A. (1997) Genetic Toxicities of human teratogens. *Mutation Research* 396:9-43 pp.
- Cozar O JM. (2002) Estudio experimental de la teratogénesis del Interferón Alfa 2Beta en vertebrados. Tesis Doctoral Universidad Complutense Facultad de Medicina. Madrid España pp.
- Cunnington M., Tennis P. (2005) Lamotrigine and the risk of malformations in pregnancy. *Neurology* 64(6): 955-960 pp.
- Boreham D. R., Dolling J. A., Misonoh J., Mitchel J. R. (2002) Radiation – induced teratogenic effects in fetal mice with varying Trp53 function: influence of prior heat stress. *Radiat Res.* 158(4): 449 -457 pp.
- Davidson C. (2004) Declining downwind amphibian population declines in California and historical pesticides use. *Ecol. Appl.* 14: 1892 -1902 pp.
- Demerec M. (1965). *Biology of Drosophila*. Hafner Publishing Co. Nueva York. 633p.
- De Carli L. y Larizza L. (1988) Griseofulvin. *Mutation Research.* 195:91-126pp.
- De Die-Smulders, Christine E. M., Sturkenboom Mirjam CJM., Veraart Joep, VanKatwijk Cees, Sastrowijoto Prapto, Vander Linden Ed.(1995) Severe limb defects and craniofacial anomalies in a fetus conceived during acitretin therapy. *Teratology* 52:215-219

De Matteis F. y Gibbs A. H. (1980) Drug induced conversión of liver haem into modified porphyrins, evidence for two clases of products, biochem. J. (187):285-288 pp. En De Carli Luigi y Larizza Lidia (1988) Griseofulvin. Mutation Research. 195:91-126pp.

Depass L. R., W.R. Shellings, Woodside M. D.. (1979) Teratogenic evaluation of aspirin in the Fischer 344 rat. Toxicol. Appl. Pharmacol. 48 Abstrac A32.

Develoux, M. (2001) Griseofulvina. Ann Dermatol Venereol 128(12): 1317 -25 pp.

Dietrich B., Cooper K W. (1965) Biology of Drosophil. Hafner Publishing Company N Y., London.

Fahmy M. A., Hassan M H., (1996) Cytogenetic effect of griseofulvin in mouse spermatocytes. J. Appl. Toxicol 16(2):177 – 183pp.

Figuroa-Torres G. (2003). Evaluación del potencial teratogénico del misoprostol en *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM. México.56 p.

Foster W., Myllynen P., Winn L.M., Ornoy A., Miller R K. (2007) Reactive oxygen species, diabetes and toxicity in the placenta – a workshop report. Placenta XX 1-3 pp.

Gilbert, S. E. (1988) Developmental Biology. 2nd. Edition Sinaver Associates Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts. 681p.

Gilbert, Scott E. (2006) Developmental Biology 6a. Edition Sinaver Associates Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts.749 p.

Gillick A. y Bulmer W. S.(1972) Griseofulvina posible teratogen. Can. Vet. J, 13,244.

Giri A. K. (1993) The genetic toxicology of paracetamol and aspirin: a review. Mutation Res. 93: 199-209 pp.

Goodlett Ch. R, Horn K. H, Zhou F. C. (2005). Alcohol teratogenesis: mechanisms of damage and strategies for intervention. Society for Experimental Biology and Medicine. Exp. Biol. Med (Maywood) 230(6): 394-406 pp.

Inoue H., Baba H., Awano K., Yoshikawa K. (1995) Genotoxic effect of griseofulvin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Mutation Resaerch 343: 229 – 234pp.

Johnson C. S, Zucker R. M, Hunter E. S. 3rd, Sulik K. K (2007). Perturbation of retinoic acid (RA) mediated limb development suggests a role for diminished RA signaling in the teratogenesis of ethanol. Birth defects Research A: Clinical and Molecular Teratology. 79 (9): 631- 641 pp.

Kimura K. A., Reynolds J. N., Brien J. F. (2000) Ethanol neurobehavioral Teratogenesis and the role of the hippocampol glutamate- Nmethyl-D-aspartate receptor- nitric oxide synthase system. Neurotoxicology and Teratology 22:607-616 pp.

Kirkland J, D. J. (1989) Statistical evaluation of mutagenicity test data. Cambridge University Press. Gran Bretaña. 294p.

Klaassen Curtis D., Watkins III J. B. (2001). Casarett & Doull Manual de Toxicología. 5ª. Ed. Mc Graw Hill. Mexico. 981 pp.

Klaassen Curtis D., Watkins III J. B., (2005) Casarett & Doull Fundamentos de Toxicología. Mc Graw – Hill Interamericana de España, S.A.V. Madrid. 536 pp.

Klein M.F., Bell J. R. (1972) Griseofulvin a teratogenic study, Science, 175,1483 -1484pp.

Komili S, Silver P A. (2008). Coupling and coordination in gene expression processes: a systems biology view. Natun Reviews Genetcs. 9(1): 38-48 pp.

Lieber C S., Baraona E., Leo M A., Garro A. (1987)Metabolism and metabolic effects of etanol, including interaction with drugs, carcinogens and nutrition. Mutation Research, 186: 201- 233pp.

Lindsley D L, Grell E H. (1972) Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Institution of Washington Publication. USA. 471pp. En Ríos Pérez Hugo A. (2007) *Megaselia scalaris* (Insecta, Diptera) un modelo potencial para evaluar daño genotóxico. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM. México. 66 p.

Luo Jia, Miller M. W. (1998) Growth factor mediated neural proliferation: target of etanol toxicity. Brain Research reviews 27:157-167 pp.

Lynch D. W., Schuler R. L., Hood R. D., Davis G.(1991) Evaluation of *Drosophila* for screening developmental toxicants: test results with eighteen chemical and presentation of a new *Drosophila* Bioassay. Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis, 11: 147-173pp.

Maia CS, Lucena GM, Correa PB, Serra RB, Matos RW, Menezes FC; Santos SM, Sousa JB, Costa ET, Ferreira JM. (2009) Interference of ethanol and methylmercury in the developing central nervous system. *Neurotoxicology* 30(1):23 -30pp.

Mc Caffery P., Koul O, Smith D, Napoli J L, Chen N, Ulman MD. (2004) Ethanol increases retinoic acid in cerebella astrocytes and cerebellum. *Developmental Brain Research*. 153: 233-241pp.

Muñoz H A, Hernández B B; Rivas M H, Herrera B J, Ramos M P (2002) *Drosophila*: una alternative in vivo para la evaluación de actividad teratogénica. Congreso de la Sociedad Mexicana de Genética. Morelia, Michoacán.

Muñoz-Moya A., Ramos-Morales P., Muñoz-Hernández A. (2008) Mammals replacement: *Drosophila* is a reliable option for the screening of anti-inflammatory activity. *Drosophila Information Service* 91: 133-142pp.

Newman M. C. Unger Michael A. (2003). *Fundamentals of ecotoxicology*. 2nd Ed. Lewis Publisher. New York, 458p.

Parnell S. E., Chen S., Chames M. E., Hodge C. W., Mdehart D. B., Sulik K. K. (2007) Concurrent dietary administration of D- Sal and ethanol diminishes ethanol's teratogenesis. *Alcoholism: clinical and Experimental Research*, 31(12): 2059 -2063pp.

Pérez-Carreño Rodríguez E., Y., Arzola G. (2001) Embriopatías por abuso de drogas que producen dependencia. XXXVI Congreso Nacional de Pediatría. Coche Caracas.

Polifka J. E. y Friedman J.M. (2002) Medical genetics: 1.Clinical teratology in the age of genomics *CMAJ*. 167(3): 265 – 273 pp.

Ramos M. P. (1994) Efectos genotóxicos de algunas sales de arsénico en *Drosophila melanogaster*. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. UNAM. México. pp.

Ramos P. Muñoz H A, Hernández B B; Rivas M H, Herrera B J. (1993) Manual de laboratorio de genética para *Drosophila melanogaster*. Mc Graw Hill Serie Schaum. 131p.

Ramos M.P. (2005) Estrategias para la evaluación del impacto in vivo de genotoxicos ambientales utilizando insectos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 21(1). Resúmenes carteles Congreso Nacional y IV Internacional de ciencias Ambientales, 307pp.

Ranganathan S. Davis DG. HoodRD. (1987) Developmental toxicity of ethanol in *Drosophila melanogaster*. *Teratology* 36:45 – 49pp.

Rebacz, B. (2001) Identification of griseofulvin as an inhibitor of antrosomal clustering in a phenotype – based screen. *Cancer Resaerch*; 67(13): 6342 -6350 pp.

Ríos- Pérez H. A. (2007) *Megaselia scalaris* (Insecta, Diptera) un modelo potencial para evaluar daño genotóxico. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM. 66 p.

Roth F. J., Sallman B, Blank H. (1959) In vitro studies of the antifungal antibiotic griseofulvin. *J. Invest. Dermatol* (33): 403-418 pp. En De Carli Luigi y Larizza Lidia (1988) Griseofulvin. *Mutation Research*. 195:91-126pp.

Rubin G. M. (1988) *Drosophila melanogaster* as an experimental organism. *Science* (240):1453 -1459 pp.

Saavedra O D., Arteaga M. M., Serrano M. B., Reynoso A. F., Prada G. N., Cornejo R. L. R. (1996) Contaminación industrial con solventes orgánicos como causa de teratogénesis. *Salud Pública Mex*. 38:3-12pp.

Sankar R. (2007) Teratogenicity of antiepileptic drugs: metabolism and pharmacogenomics. *Acta Neurologica Scandinavica*. 116(1): 65 – 71 pp.

Sulik K. K., (2005). Genesis of alcohol- induced craniofacial dimorphism. *Symposium. Experimental Biology and Medicine*. 366-375 pp.

Vinten J., Adab N., Kini U., Gorrry J., Gregg J., Baker G. A. (2005) Neuropsychological effects of exposure to anticonvulsant medication in utero. *Neurology*.64: 949-954 pp.

Vogel E. W. (1987) Evaluation potencial mammalian genotoxins using *Drosophila*: the need for a changein test strategy. *Mutagenesis*;2 (2):161 – 171pp.

Wassenberg D M, Di Giulio R T. ((2004) Teratogenesis in *Fundulus heteroclitus* emryos exposed to a creosote – contaminated sediment extract and CYP1A inhibitors. *Mar Environ. Res*. 58(2-5): 163 -168pp.

Weimer R. C.(2007) *Estadística*. 1ª. Ed. Español CECSA México. 839 p.

Warren KR, Li TK. (2005) Genetic polymorphism: impact on the risk of fetal alcohol spectrum disorders. *Birth Defets Res A Clin Mol Teratol*. 73(4): 195-203pp.

WHO (1984) Principles for evaluating health risks to progeny associated with exposure to chemicals during pregnancy. Environmental Health Criteria 30, IPCS. 177p.

Wu M., Chaudhary A., Khan I. A, Dasmanapatra A. K (2008). Ethanol teratogenesis in Japanese medaka: effects at the cellular level. Comp. Biochem and Physiol, Biochem. Mol. Biol. 149(1): 191- 301 pp.

Wyszynski D F. Nambison M, Surve T. Alsdorf R M, Smith C R, Holmes L B. (2005). Increased Rate of mayor malformations in offspring exposed to valproate during pregnancy. Antiepileptic Drug Prenancy Registrey Neurology. 64: 961 -965 pp.

Xiao, R. et al. (2007) Developmental neurotoxicity role of ciclophosphamide on post – neural tube closure of rodents in vitro and in vivo. Int.J. Dev. Neuroscience 25;531 -537 pp.

Xueqing W., Erin W., Haasch M. L., Dasmahapatra A. K. (2006) Japanese Medaka (*Oryzias latipes*): Developmental model for the study of alcohol teratology. Birth Defects Research (part B) 77: 29-39 pp.

Yelin R., Kot H., Yelin d, Fainsod A. (2007) Early molecular effects of ethanol during vertebrate embryogenesis. Differentiation 75:393-403 pp.