



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

Efecto del H_2O_2 en la sobrevivencia y los parámetros reproductivos: fecundidad total, desempeño reproductivo y porcentaje de fertilidad en las líneas *flare*³ y Oregon-*flare*³ de *Drosophila melanogaster*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

MARIANA ANDREA MARTÍNEZ CASTILLO

**DIRECTOR DE TESIS:
BIÓL. LUIS FELIPE SANTOS CRUZ
2012**



Este trabajo forma parte del proyecto: “Determinación de la eficiencia reproductiva y genotoxicidad del Peróxido de Hidrógeno y Zearalenona en *D. melanogaster*; patrones de expresión de algunos genes *Cyp450* y *Hsp* ante el estrés oxidativo” apoyado por el Programa de apoyo PAPCA 2011-2012 No. 34.

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por todas las bendiciones.

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Por permitirme formar parte de la máxima casa de estudios y cumplir una meta más.

A las profesoras M. en C. Irma Elena Dueñas García, M. en C. Ma. Eugenia Heres Pulido y M. en C. Laura Castañeda Partida

Por las aportaciones, sugerencias y tiempo dedicado en la realización de éste proyecto. Gracias también por aceptarme en su laboratorio y por sus valiosas enseñanzas en mi formación profesional y personal.

Al Dr. Elías Piedra Ibarra

Por ser un excelente profesor que con sus clases confirmó mi gusto por la genética. Le agradezco por recibirme inicialmente como tesista y por comenzar éste proyecto, así como por sus ideas y apoyo a lo largo del mismo.

Al M. en C. Ángel Durán Díaz

Por su paciencia, interés, tiempo y disposición en el análisis de resultados de ésta tesis.

A mi asesor, el Biol. Luis Felipe Santos Cruz

Por la dedicación en el desarrollo de ésta tesis y porque convirtió su laboratorio también en el mío, siempre paciente e interesado en mi aprendizaje. Gracias por su apoyo, fue muy agradable ser su alumna.

**A todos los que formaron parte del Laboratorio de Genética Toxicológica
durante mi estancia**

Tanto profesores como alumnos, ya que día tras día hicieron que las horas de trabajo fueran realmente amenas y con su buena actitud lograron que el laboratorio se convirtiera en un lugar cómodo para trabajar, sobre todo gracias a aquellas personas que me ofrecieron su amistad, espero poder conservarla.

A Eduardo Martínez

Porque compartió su vida con la mía, creció a mi lado y sirvió de motivación, inspiración y apoyo durante este tiempo.

A todos mis familiares y amigos

Que aunque no tuvieron una participación directa en la elaboración éste proyecto, estuvieron conmigo a lo largo de ésta etapa tan importante de mi vida, que con esto concluye y da pie a una nueva aventura. Gracias por siempre estar.

Al Programa de apoyo PAPCA 2011-2012 No. 34

Por el apoyo brindado.

¡MUCHAS GRACIAS!

DEDICADA A TI MAMÁ:

Por vivir tantos momentos importantes junto a mí y además de ser madre, juegues tantos roles en mi vida, mejor amiga, compañera y cómplice, ya que gracias a tu apoyo incondicional, comprensión, tiempo, esfuerzo y cariño todo ha sido posible. Es para ti, por enseñarme a luchar por mis sueños y por ser un ejemplo a seguir en todos los aspectos.

Evidentemente éste logro es también tuyo.

¡Gracias por todo!

ÍNDICE

1. Resumen
2. Introducción
3. Antecedentes
4. Justificación
5. Hipótesis
6. Objetivo general
 - 6.1. Objetivos particulares
7. Materiales
8. Métodos
 - 8.1. Propagación y mantenimiento de líneas *flare*³ y Oregon-*flare*³ de *D. melanogaster*
 - 8.2. Colecta de huevos de las líneas *flare*³ y Oregon-*flare*³ de *D. melanogaster*
 - 8.3. Determinación de la CL₅₀ de H₂O₂ en las líneas *flare*³ y Oregon-*flare*³ de *D. melanogaster*
 - 8.4. Aplicación de tratamientos en larvas de las líneas *flare*³ y Oregon-*flare*³ de *D. melanogaster*
 - 8.5. Emergencia de organismos tratados de las líneas *flare*³ y Oregon-*flare*³ de *D. melanogaster*
 - 8.6. Proporción de sexos de las líneas *flare*³ y Oregon-*flare*³ de *D. melanogaster*
 - 8.7. Evaluación de parámetros reproductivos en las líneas *flare*³ y Oregon-*flare*³ de *D. melanogaster*

- 8.8. Análisis estadístico**
- 9. Resultados**
 - 9.1. Experimentos preliminares de toxicidad**
 - 9.2. Prueba de toxicidad (CL₅₀)**
 - 9.2.1. Línea *flare*³**
 - 9.2.2. Línea Oregon-*flare*³**
 - 9.3. Parentales (P0): Emergencia, Proporción sexual y parámetros reproductivos**
 - 9.3.1. Emergencia total y proporción sexual**
 - 9.3.2. Emergencia por día**
 - 9.3.3. Parámetros reproductivos**
 - 9.4. Filial 1 (F1): Emergencia**
- 10. Discusión**
- 11. Conclusiones**
- 12. Recomendaciones**
- 13. Literatura citada**
- 14. Anexos**
 - 14.1. Dimorfismo sexual**
 - 14.2. Manejo y eliminación de residuos**

1. RESUMEN

El oxígeno molecular es esencial en la vida de los organismos aerobios; sin embargo, puede originar especies reactivas de oxígeno que al incrementarse perturban el balance prooxidante-antioxidante de las células, lo que provoca estrés oxidativo que conlleva daño potencial sobre moléculas biológicas, tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al ser una molécula altamente reactiva, puede originar radicales libres fácilmente y por lo tanto inducir estrés oxidativo. Se ha observado que procesos relacionados con la reproducción en humanos se ven afectados al incrementar la cantidad de ROS. En la actualidad los humanos se encuentran frecuentemente expuestos, en bajos niveles, al H_2O_2 de manera prolongada puesto que es utilizado en numerosos productos de uso cotidiano. Por lo anterior, se evaluó el efecto del H_2O_2 en la sobrevivencia y los parámetros reproductivos: fecundidad, desempeño reproductivo y porcentaje de fertilidad de moscas P0 de las líneas *flare*³ y *Oregon-flare*³ de *D. melanogaster*. Asimismo, se evaluó la emergencia de la generación F1 por un posible efecto crónico. En este trabajo se demostró que el H_2O_2 posee efectos tóxicos en *D. melanogaster*, obteniendo una CL_{50} para la línea *flare*³ de 38 mM y para *Oregon-flare*³ de 46 mM. Se concluyó que el H_2O_2 a la concentración subtóxica utilizada (20 mM) modificó la proporción sexual y el ciclo de vida de *D. melanogaster*.

2. INTRODUCCIÓN

El oxígeno molecular es esencial en la vida de los organismos aerobios; sin embargo, en ocasiones puede ser convertido en derivados citotóxicos, originando las denominadas especies reactivas de oxígeno (ROS por reactive oxygen species) las cuales incluyen derivados no radicales y radicales libres de O₂ (Fortunato *et al.*, 2006).

Un radical libre es cualquier especie capaz de existir de manera independiente, que contiene uno o más electrones no apareados en el orbital atómico o molecular que ocupa (Halliwell y Gutteridge, 2007); la presencia de un electrón desapareado, usualmente causa atracción a un campo magnético, por lo que los radicales libres son muy reactivos y tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica (Avello y Suwalsky, 2006). Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede, se convierte a su vez en un radical libre, ocasionando que la estructura afectada quede inestable, iniciándose una reacción en cadena que, si es excesiva, destruye las células (Velázquez *et al.*, 2004).

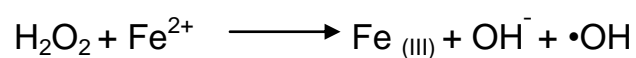
Los radicales libres son resultado de procesos fisiológicos propios del organismo, como el metabolismo de los alimentos y la respiración (Velázquez *et al.*, 2004); además son cruciales en algunos procesos como: fertilización, embriogénesis, desarrollo, morfogénesis, patogénesis, infecciones microbianas, inflamación, mutación, carcinogénesis, hipertensión, metabolismo xenobiótico, incluyendo metales de transición como hierro y cobre, regulación de reacciones enzimáticas y transducción de señales (Maeda, 2009).

Las células poseen mecanismos que las protegen del efecto nocivo de los radicales libres, mediante un sistema de defensa constituido por agentes antioxidantes, los cuales son moléculas capaces de prevenir,

retrasar o eliminar significativamente la oxidación de un sustrato, ya sea mediante la liberación de electrones (Rico y Ruiz, 1990) o el reemplazo de moléculas sensibles al daño por otras más resistentes, disminuyendo la formación de los radicales libres o eliminándolos. Tales moléculas pueden ser obtenidas en la dieta o sintetizadas de manera endógena (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Sin embargo, cuando el aumento de agentes oxidantes sobrepasa las defensas antioxidantes de las células, se produce estrés oxidativo a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Avello y Suwalsky, 2006) llevándolas a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos que dan por resultado entre múltiples alteraciones, deterioro (Zapata *et al.*, 2007) y muerte celular (Ayed-Boussema *et al.*, 2007).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una molécula perteneciente a las ROS, que no es un radical libre debido a que no tiene ningún electrón desapareado, pero puede originarlos fácilmente al ser una molécula altamente reactiva y selectiva en sus reacciones con otras moléculas biológicas (Halliwell y Gutteridge, 2007). Puede generar el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) por la reacción Fenton en presencia de ión Fe^{2+} ; de todas las especies reducidas del oxígeno, el radical $\bullet\text{OH}$ es sin duda la más dañina ya que es capaz de actuar sobre todo tipo de biomoléculas. Así, en los lípidos provoca peroxidación lipídica de las membranas, en las proteínas da lugar a inactivación enzimática, en el DNA ocasiona mutaciones y, en los glúcidos, puede provocar alteraciones, como en los de los receptores celulares (Montero, 1996).



Reacción Fenton

El H_2O_2 posee diversas propiedades, entre las que destacan ser oxidante, bactericida, fungicida y esporicida (Baldry, 1983), por tal motivo ha sido utilizado en numerosos productos de uso cotidiano incluyendo desinfectantes generales, blanqueadores libres de cloro, removedores de manchas y como componente de productos para blanquear los dientes. En la industria, el principal uso es como blanqueador de papel y en la medicina, ha sido empleado para detener hemorragias y limpiar las heridas, así como en la esterilización de instrumentos (Watt *et al.*, 2004).

Hoy en día, la mayor fuente de exposición de poblaciones humanas al H_2O_2 es por el uso de tintes para cabello, puesto que más del 60% de las mujeres y entre el 5 y 10% de los varones se tiñen el pelo un promedio de 6-8 veces al año (Benaiges, 2007). El H_2O_2 representa entre 6-12% de la solución oxidante que contienen. En las formulaciones más concentradas (donde el H_2O_2 está en un recipiente separado) puede presentar mayor toxicidad que los propios colorantes (Mencías y Mayero, 2000). Por todo lo anterior es importante conocer los efectos que este compuesto puede tener sobre los organismos.

En humanos el H_2O_2 causa toxicidad por medio de tres mecanismos:

- Daño corrosivo. La exposición a bajas concentraciones puede causar daño a los tejidos locales.
- Formación de gas oxígeno. La ingestión de H_2O_2 (>35%) puede generar grandes volúmenes de oxígeno, lo cual es peligroso cuando la cantidad de éste supera su máxima solubilidad en sangre, ya que puede ocasionar embolias; además, la rápida generación de oxígeno en cavidades cerradas del cuerpo puede causar distensión mecánica.
- Lipoperoxidación. Ejerce un efecto citotóxico directo (Watt *et al.*, 2004) por medio de un conjunto de reacciones autooxidativas que producen degradación de los ácidos grasos poliinsaturados de las

membranas biológicas, con fijación de oxígeno (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Además se ha observado que procesos relacionados con la reproducción se ven afectados al incrementar la cantidad de ROS, las cuales regulan su acción a través de muchas de las citocinas proinflamatorias y este mecanismo ha sido propuesto como un factor común subyacente de la endometriosis, cáncer de ovario, enfermedad de ovario poliquístico, y otras patologías que afectan el proceso reproductivo femenino (Ashok *et al.*, 2006) asimismo, el daño al DNA de espermatozoides y apoptosis están involucrados en la infertilidad masculina (Lopes *et al.*, 1998).

La toxicología estudia los efectos adversos de los xenobióticos (compuestos extraños al organismo) sobre sistemas biológicos, para conocer los efectos en la salud que la exposición a alguno de éstos compuestos pueda ocasionar, enfatizando en los mecanismos de acción de la toxicidad, en las condiciones en que ocurren y en su posible tratamiento (Mendoza, 2008); se fundamenta principalmente en el uso de bioensayos desarrollados en organismos cuya respuesta podría ser similar a la que se presentaría en el humano bajo condiciones parecidas de exposición. Todo protocolo experimental requiere pruebas de toxicidad previas para conocer el rango de concentraciones al que el modelo biológico puede ser expuesto. Algunas pruebas frecuentemente utilizadas son la Dosis Letal Media (DL_{50}) y la Concentración Letal Media (CL_{50}) que expresan la dosis o concentración a la que muere el 50% de la población respectivamente (Silbergeld, 2001). La CL_{50} , aunque criticada como simplista y no cercana al ambiente natural, debido a que el experimentador puede manipular variables, es necesaria y se realiza en todo laboratorio alrededor del mundo (Castañeda *et al.*, 2008). Posteriormente, se hacen extrapolaciones que son estimaciones teóricas de la toxicidad que se obtienen trasladando datos de una especie a otra

sobre la que no existen datos y a partir de ellas se diseñan otros experimentos. Determinados organismos sirven como modelo para detectar el grado tóxico de una sustancia con facilidad, entre los que se incluyen virus, bacterias, hongos (levaduras), rata, ratón y la mosca de la fruta (Silbergeld, 2001).

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, es un modelo biológico ampliamente utilizado en toxicología ya que ofrece una serie de ventajas como sistema eucariótico *in vivo* (Spanó y Graf, 1998), tales como un ciclo de vida corto (Figura1) que alcanza la adultez entre 10 y 12 días a 25°C con estadíos de desarrollo bien definidos, lo que permite analizar el efecto de compuestos de manera controlada. Inicia con la ovoposición, 24h después las larvas de primer estadio eclosionan de los huevos y éstas pasan por dos estadíos más durante la fase larvaria, en ésta la ingesta de alimento es continua llegando a consumir de tres a cinco veces su peso (Mitchell y Combes, 1984). En el tercer estadio larval existe una intensa actividad metabólica (Herrera, 2005), las células se dividen de manera activa y en ese momento aumenta la síntesis de complejos enzimáticos que favorecen la viabilidad del organismo hasta el final del desarrollo, por lo que es la mejor fase para la experimentación (Graf, *et al.*, 1984). Posteriormente, forman la prepupa, pupa y finalmente emergen las moscas adultas a los diez días de que las hembras ovopositaron. Los machos son fértiles aproximadamente entre 6 y 8h después de la emergencia, mientras que las hembras tardan de 10 a 12h (Mitchell y Combes, 1984).

Otras de las ventajas que posee este modelo son: i) descendencia numerosa por generación que permite hacer un análisis estadístico confiable, ii) fácil cultivo y manutención económica, iii) gran cantidad de mutantes disponibles, iv) mapa genético completo y genoma totalmente secuenciado accesible en *GenBank* con un nivel de conservación muy alto (Castañeda *et al.*, 2008), v) contar con sistemas enzimáticos

(citocromos P450 o CYP450s) similares a los que presenta la fracción S9 del hígado de mamíferos, y vi) ser un modelo bien establecido para el estudio de enfermedades humanas dado que se conoce su biología del desarrollo y genética (Botas, 2007).

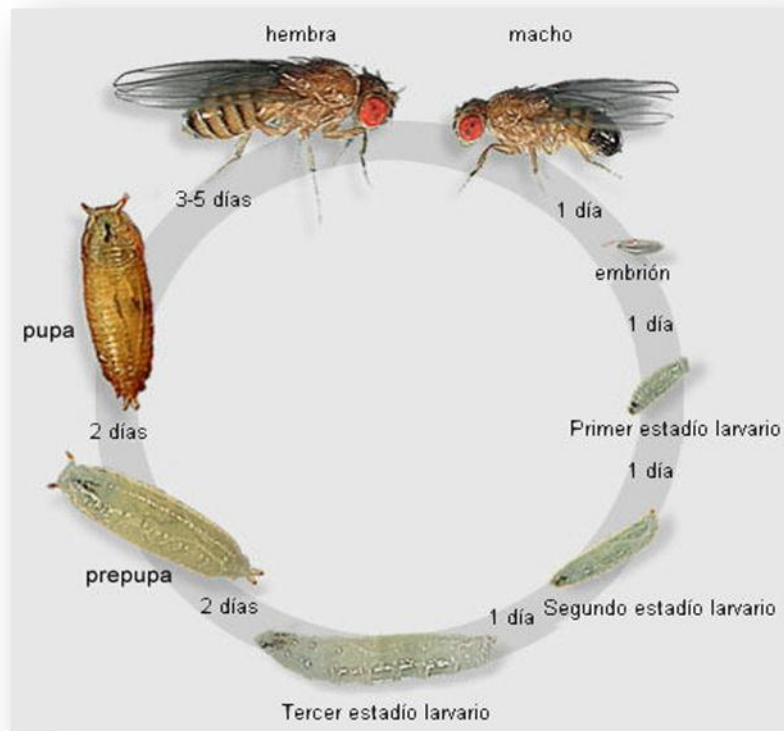


Fig. 1. Ciclo de vida de *D. melanogaster*

(Tomado de <http://www.ucm.es/info/genetica/grupod/Genenzima/ciclovid.htm>)

Dos de las líneas mutantes de *D. melanogaster* más interesantes para estudios de toxicidad son: *flare*³ (*flr*³/TM3,*Bd*^S) y Oregon-*flare*³ (ORR(1)/ORR(2);*flr*³/TM3,*Bd*^S) (Castañeda *et al.*, 2001), que tienen actividad del conjunto enzimático CYP450s regulada e inducible alta, respectivamente.

La línea *flare* posee tres alelos: *flr*¹, *flr*² y *flr*³, el último es portador de una mutación letal recesiva en condición homocigótica que se distingue fenotípicamente por la presencia de tricomas de forma irregular, la cual

está localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 a 38.8 unidades Morgan (u.m.). El marcador *flr³* por ser letal requiere de un balanceador *In(3LR)TM3* (*Inversion (3 Left, Right) Third Multiple 3*) que al presentar tres inversiones, permite mantener los marcadores letales en heterocigosis. El cromosoma balanceador se reconoce indirectamente por el alelo *Bd^s* (*Beaded-Serratia*) del locus *Beaded* el cual está localizado en el cromosoma 3 a 91.9 u.m., originalmente designado *Serratia* (*Ser*) que por ser dominante permite reconocer a los individuos que portan la inversión, ya que las moscas que lo poseen, presentan una o más muescas en el borde de las alas (Figura 2) (ver Lindsley y Zimm, 1992).



Fig. 2. Ala con el marcador *Bd^s*, las flechas muestran las muescas en el borde.
(Tomado de <http://sanpatricio.co.uk/Innexins/drosinx.php>)

La línea Oregon-*flare³* (*ORR(1);ORR(2);flr³/TM3,Bd^s*) presenta los cromosomas 1 y 2 de la línea Oregon *R(R)* resistente al DDT (Frölich y Würigler, 1989). El marcador dominante *Rst (2) DDT* ubicado a 65 u.m. en el cromosoma 2, es responsable de la alta expresión de los genes *Cyp* que se expresan en el complejo enzimático CYP450s, el cual forma parte del metabolismo xenobiótico, por lo que éste se incrementa (Dueñas, 2002).

El metabolismo Xenobiótico (MX) es un mecanismo de protección de las células, el cual tiene por objetivo facilitar la eliminación de los xenobióticos del organismo. Comienza cuando los xenobióticos se

encuentran en la vecindad inmediata de las vías de ingreso al organismo (inhalación, absorción o ingestión), después éstos pasan a través de las membranas de circulación sistémica (pulmonar, cutánea o gastrointestinal) y son distribuidos hacia tejidos corporales donde son absorbidos, biotransformados, acumulados en ciertos tejidos o excretados por orina y/o heces, todo depende de su hidrofiliidad; aquellos xenobióticos que por su carácter no polar no pueden excretarse fácilmente, tienen que ser biotransformados principalmente por las enzimas CYP450s mediante reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis, lo que se denomina Fase I del MX, el resultado final son productos más hidrosolubles. En la Fase II o de conjugación, se unen moléculas tales como péptidos, sulfatos, acetilo o ácido glucurónico entre otros, a los productos que resultan de la Fase I y que aún no han sido eliminados. Estos conjugados son estables e hidrosolubles y se excretan del organismo (Heres *et al.*, 2006).

3. ANTECEDENTES

A la fecha existen diversas investigaciones que comprueban que *D. melanogaster* es un buen modelo de prueba para analizar el efecto de diversos compuestos sobre algunos parámetros reproductivos.

Singh y colaboradores (2009) evaluaron el tolueno en larvas transgénicas que expresan β -galactosidasa bacteriana como respuesta al estrés y en larvas tipo silvestre de *D. melanogaster*, demostrando que éste compuesto es tóxico e induce la expresión de los genes de estrés oxidativo (*hsp*'s de heat shock proteins). Además, afecta el desarrollo de *D. melanogaster*, lo cual se evidenció por el retraso en la emergencia de imagos hasta por 48 h y la disminución significativa en el número de imagos emergidos (solo un 23% de emergencia por día comparado con el control). También se observó que el desempeño reproductivo (número total de imagos emergidos durante 10 días) disminuyó de manera proporcional al incremento en la concentración del tolueno.

Espinoza-Navarro en el 2009 evaluó el efecto del boro usando como modelo a *D. melanogaster*. Los resultados mostraron una alteración significativa en el número de descendientes desde F1 a F3 con tendencia a la normalización a partir de F4, además encontraron un cambio significativo en la proporción entre hembras y machos con un efecto agudo en F1 y posiblemente crónico en F2, registrando una mayor proporción de hembras sobre los machos, concluyendo que el boro actuó sobre la diferenciación sexual.

Nazir y colaboradores en el 2001 demostraron que la expresión del gen *hsp 70* en los tejidos de larvas de tercer estadio de *D. melanogaster* transgénica (*hsp70-lacZ*)Bg⁹ se incrementó en un 61% después de la exposición dietética al pesticida Captan en relación al control; además se observó el efecto del mismo en diferentes etapas de desarrollo, lo cual se reflejó en el retraso en la emergencia de imagos hasta por 72 h. El desempeño reproductivo así como la fecundidad (número total de huevos

puestos en 10 días) y fertilidad (número de moscas emergidas en 10 días / número de huevos puestos en 10 días × 100) también fueron afectados de manera significativa, demostrando que el efecto tóxico se mantiene en diferentes etapas del desarrollo.

Por otra parte, se tienen pocos reportes de las alteraciones que el H₂O₂ provoca sobre la reproducción; Gupta y colaboradores (2011) encontraron que éste compuesto aumenta la cantidad de ROS en etapas iniciales de la foliculogénesis *in vitro* y disminuye significativamente el tamaño del folículo en bovinos. Cui y colaboradores en el mismo año demostraron que también eleva moderadamente el contenido de ROS en ovocitos porcinos *in vitro*. Bain y colaboradores en el 2011 reportaron que el H₂O₂ disminuye el desarrollo de blastocistos *in vitro* e incrementa la inducción de apoptosis. Pandey y colaboradores en el 2010 observaron que el H₂O₂ actúa como molécula de señalización y modula diversos aspectos de la fisiología de los ovocitos *in vitro*, incluyendo el arresto del ciclo celular meiótico en mamíferos. Oehninger y colaboradores (1995) hicieron un trabajo *in vitro* en el cual reportaron que el H₂O₂ afecta directamente las funciones espermáticas humanas necesarias para la fertilización por daño a la membrana plasmática y modificación en la homeostasis inducida por el efecto oxidativo del compuesto.

Actualmente no se cuenta con reportes disponibles sobre el efecto del H₂O₂ sobre la reproducción en *D. melanogaster*, pero sí con reportes sobre otros efectos, por ejemplo Grover y colaboradores (2009) sometieron a larvas de *D. melanogaster* a la administración de H₂O₂ de manera directa y por medio de alimento, demostrando que éste compuesto puede llegar a incrementar la actividad locomotora en las adultas por días e incluso semanas. Por otra parte, Le Bourg (2007), realizó un experimento en el que sometió a moscas de edad temprana a H₂O₂ (19mM) produciéndose estrés, lo cual incrementó la longevidad en las moscas tratadas, y además contribuyó a enfrentar posteriormente un fuerte estrés producido por la exposición a una solución de sacarosa a

diferentes concentraciones (500, 62.5 y 15.6 mM), cuya propiedad de disminuir la longevidad a mediana edad ya había sido probada. Se concluyó que a altas dosis el H₂O₂ disminuye la longevidad y en cambio a bajas dosis incrementa hasta en cuatro semanas el tiempo de vida en los machos. En otro estudio, se observó que en *Drosophila* se incrementa la formación de radicales libres 1.67 veces cuando el medio donde se alimentaron las larvas se contamina con 7mM de H₂O₂ en comparación con el testigo negativo; asimismo, en pruebas de quimioluminiscencia aumentó 1.63 veces los registros comparándolos con los del testigo negativo. Sin embargo, en la prueba de 8-hidroxi-desoxyguanosina (8-OH-dG) no se encontraron evidencias de daño al DNA (Kawai y Furukawa, 1995). En 1988, Courgeon y colaboradores realizaron un estudio *in vitro* en células de *Drosophila* derivadas de la línea Kc que fueron tratadas con varias concentraciones de H₂O₂. La concentración 10 mM fue letal después de 48 h, mientras que concentraciones entre 1-100 µM no afectaron la viabilidad celular. La concentración 1 mM fue utilizada para el estudio de la respuesta celular al estrés oxidativo. Observaron una disminución en la síntesis global de proteínas acompañada por cambios en los patrones electroforéticos de los polipéptidos. Hubo un incremento de 2.5 veces en la síntesis de *hsp*'s 70, 68 y 23 y la síntesis de actina se incrementó 8.5 veces por lo que se concluyó que el H₂O₂ induce la activación transcripcional de estos genes.

4. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, el H_2O_2 es conocido por ser un agente oxidante que puede causar alteraciones en diversos órganos y sistemas de los seres vivos; sin embargo, la respuesta antioxidante del organismo podría enmascarar su efecto. Actualmente no se dispone de datos suficientes acerca de si tal efecto es hereditario y tiene un efecto crónico, por lo que es conveniente evaluar en *D. melanogaster*, tanto la emergencia y los parámetros reproductivos de la generación parental P0, así como de la generación proveniente de la tratada (F1) con tal compuesto, con el propósito de aportar conocimientos sobre el efecto del H_2O_2 en un modelo biológico eucarionte.

5. HIPÓTESIS

- Si la sobrevivencia de organismos tratados con H_2O_2 mostrara diferencias significativas en comparación con los organismos tratados con el testigo agua, entonces el H_2O_2 es tóxico para *D. melanogaster*.
- Si los parámetros reproductivos de organismos tratados con H_2O_2 mostraran diferencias significativas en comparación con los organismos tratados con el testigo agua, entonces el H_2O_2 afecta la reproducción de *D. melanogaster*.
- Si los CYP450s participan en la activación o desintoxicación del H_2O_2 , entonces se encontrarán diferencias significativas en la toxicidad del compuesto y/o en los parámetros reproductivos de los organismos tratados, entre las líneas *flare*³ y *Oregon-flare*³ de *D. melanogaster*, debido a las diferencias en la expresión de CYP450s que presentan.
- Si el H_2O_2 afecta la diferenciación sexual y la capacidad reproductiva de *D. melanogaster*, entonces se observarán diferencias significativas en la sobrevivencia y parámetros reproductivos de hembras y machos.

6. OBJETIVO GENERAL

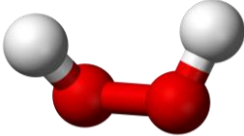
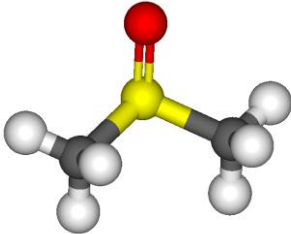
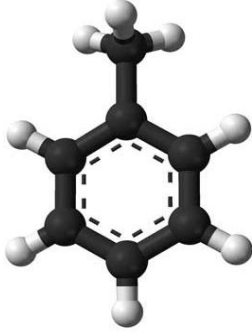
Evaluar el efecto del H_2O_2 en la sobrevivencia, proporción de sexos y parámetros reproductivos de las líneas mutantes *flare*³ y *Oregon-flare*³ de *D. melanogaster*.

6.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la toxicidad del H_2O_2 en larvas de tercer estadio de las líneas *flare*³ y *Oregon-flare*³ de *D. melanogaster*.
- Establecer una concentración subtóxica de H_2O_2 (>50% sobrevivencia) para la evaluación de los parámetros reproductivos en las dos líneas de *D. melanogaster*.
- Delimitar si el H_2O_2 induce cambios en los parámetros reproductivos fertilidad, desempeño reproductivo y fecundidad en la P0 de ambas líneas de *D. melanogaster*.
- Definir si la administración de H_2O_2 durante el desarrollo larvario provoca alteraciones en la emergencia de P0 y si dichas alteraciones se presentan también en la F1.
- Comparar la sobrevivencia al H_2O_2 y si afecta a la proporción 1:1 de hembras y machos esperada teóricamente.

7. MATERIALES

Cuadro 1. Se muestran los agentes químicos utilizados en los experimentos con su modelo en barras y esferas correspondiente. (Para todos los modelos: esferas blancas: H, esferas rojas: O, esferas grises: C, esfera amarilla: S).

Agente químico	Estructura de barras y esferas
<p>Solución de peróxido de hidrógeno</p> <p>30% (w/w) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).</p> <p>Fórmula molecular: H_2O_2</p> <p>CAS N° 7722-84-1</p>	
<p>Dimetilsulfóxido (DMSO)</p> <p>99.9% (Fluka Chemie, Switzerland).</p> <p>Fórmula molecular: $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$</p> <p>CAS N° 67-68-5</p>	
<p>Tolueno 99.5% (J.T. Baker, México)</p> <p>Fórmula molecular: $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$</p> <p>N° CAS 108-88-3</p>	

Otros

- **Solución conservadora:** 5 mL de tegosept al 12% (EtOH) y 5 mL de ácido propiónico aforados a 1 litro de agua (Dueñas *et al.*, 2001).
- **Medio de cultivo instantáneo (DIM):** *Drosophila Instant Medium* (Carolina Biological Supply Co. Burlington N.C. USA).
- **Líneas de *Drosophila melanogaster*:**
Oregon-*flare*³ (ORR(1);ORR(2);*flr*³/TM3,*Bd*⁶) y *flare*³ (*flr*³/TM3,*Bd*⁶) del Laboratorio de Genética Toxicológica de la FES-Iztacala, UNAM, donadas originalmente por el Dr. Ulrich Graf del Instituto de Toxicología (Swiss Federal Institute of Technology) de la Universidad de Zurich, Schwerzenbach, Suiza.

8. MÉTODOS

8.1. Propagación y mantenimiento de líneas mutantes *flare*³ y Oregon-*flare*³ de *D. melanogaster*

Moscas pertenecientes a las líneas *flare*³ y Oregon-*flare*³ de *D. melanogaster* se propagaron en un medio de hojuelas de papa y solución conservadora en frascos de 250 mL para su cultivo (Dueñas *et al.*, 2001).

8.2. Colecta de huevos de las líneas mutantes *flare*³ y Oregon-*flare*³ de *D. melanogaster*

Los huevos de ambas líneas fueron colectados en un medio de levadura fresca activada con sacarosa y agua durante 8 h a 25°C en condiciones de obscuridad y entre 60-80% de humedad relativa (HR). Tres días después, se recuperaron las larvas de tercer estadio (72 ± 4 h) lavándolas con agua corriente a temperatura ambiente y filtrándolas a través de un colador de acero de malla fina.

8.3. Determinación de la CL₅₀ de H₂O₂ en las líneas mutantes *flare*³ y Oregon-*flare*³ de *D. melanogaster*

Se realizaron tres experimentos preliminares con las concentraciones 2, 5, 20, 50, 200 y 500 mM de acuerdo con Courgeon *et al.* (1988). Conforme a los resultados obtenidos en estos experimentos, se establecieron las concentraciones finales utilizadas para la prueba de toxicidad (CL₅₀) en un rango entre 5 - 200 mM.

Los experimentos finales constaron de tubos de ensayo con 5 g de DIM hidratado con 2 mL de las soluciones de H₂O₂ (5, 25, 50, 100, 150 y 200 mM) y agua mili Q como testigo.

Se realizaron cuatro experimentos independientes con tres repeticiones por cada concentración y para cada línea, colocando 10 larvas por tubo e incubando a 25°C y 60-80 % de HR hasta su emergencia como imagos,

los cuales se cuantificaron para obtener la mortalidad de 0 a 100% para cada tratamiento. Dichos datos se graficaron contra las concentraciones probadas para calcular la CL_{50} de acuerdo al método gráfico y al análisis de la ecuación cuadrática.

8.4. Aplicación de tratamientos en larvas de las líneas mutantes *flare*³ y Oregon-*flare*³ de *D. melanogaster* para medir parámetros reproductivos

Larvas de tercer estadio (72 ± 4 h) se expusieron a una concentración subtóxica de H_2O_2 (20 mM) con la finalidad de obtener un mayor número de individuos sobrevivientes. Se utilizó como control positivo tolueno 10mM disuelto en DMSO (Dimetilsulfóxido) (Singh *et al.*, 2009), DMSO 0.3 % como testigo solvente del tolueno y agua mili Q como testigo negativo. Los organismos tratados permanecieron en la incubadora a 25°C y 60-80 % de HR hasta la emergencia de los imagos. El desecho de residuos se detalla en el anexo: *Manejo y eliminación de residuos*.

8.5. Emergencia de organismos tratados de las líneas mutantes *flare*³ y Oregon-*flare*³ de *D. melanogaster*

Para evaluar la emergencia, larvas de tercer estadio (72 ± 4 h) fueron expuestas a los tratamientos agua mili Q, H_2O_2 , tolueno o DMSO a las concentraciones ya mencionadas (20 larvas por tubo y 5 tubos por grupo). El número de imagos emergidos por cada grupo se registró cada día. Este parámetro se determinó de acuerdo a Arellano (2002) con algunas modificaciones y de la siguiente manera:

$$\text{Emergencia total} = \frac{H(X_i) + M(X_i)}{H(0) + M(0)}$$

Donde:

$H(X_i)$ = Número de hembras emergidas en medio tratado.

$M(X_i)$ = Número de machos emergidos en medio tratado.

$H(0)$ = Número de hembras emergidas del control.

$M(0)$ = Número de machos emergidos del control.

Este procedimiento se realizó en la parental (P0) para evaluar un efecto agudo y en la filial (F1) para un posible efecto crónico.

8.6. Proporción de sexos de las líneas mutantes *flare*³ y Oregon-*flare*³ de *D. melanogaster*

Tras la emergencia, los imagos se cuantificaron y se separaron por sexo basándose en el dimorfismo sexual (ver Anexo: *Dimorfismo sexual*). Estos experimentos se realizaron en P0.

La proporción sexual de hembras se evaluó de acuerdo a la siguiente fórmula (Arellano, 2002):

$$P.S. = \frac{H(X)}{H(X) + M(X)}$$

De la misma forma para machos:

$$P.S. = \frac{M(X)}{H(X) + M(X)}$$

8.7. Evaluación de parámetros reproductivos en las líneas mutantes *flare*³ y Oregon-*flare*³ de *D. melanogaster*

Los parámetros reproductivos de la generación P0 fueron evaluados de acuerdo a las siguientes medidas, siguiendo el método de Gayathri y Krishnamurthy (1981) con algunas modificaciones.

- **Fecundidad**

Imagos provenientes de larvas tratadas en medios con agua mili Q, H₂O₂, tolueno o DMSO, se aislaron, se sexaron y se colocaron por separado en tubos de ensayo con medio de hojuelas de papa y solución conservadora

durante 6 h, con la finalidad de aislar las hembras vírgenes ya que este tiempo forma parte del lapso en que las hembras tardan en madurar sexualmente y están listas para aparearse (Castañeda *et al.*, 2008). Para cada tratamiento, se transfirieron una hembra y un macho a tubos de plástico individuales con medio de levadura fresca activada con sacarosa y agua. Se realizaron dos experimentos independientes en los que se utilizó un total de 5 pares de moscas por tratamiento y por cada línea, las cuales fueron transferidas a tubos diferentes diariamente por un periodo de 10 días generando un total de 400 tubos por experimento.

El número de huevos puestos se registró, con estos datos se obtuvo la fecundidad total que está dada por el número total de huevos puestos en 10 días, con una media diaria de huevos puestos por cada hembra que determina la fecundidad individual, es decir el número total de huevos puestos por hembra cada día.

- **Desempeño reproductivo**

Para estimar una medida del desempeño reproductivo, se cuantificó el número total de imagos emergidos durante 10 días.

- **Fertilidad**

El porcentaje de fertilidad está dado por el número de moscas emergidas en 10 días / número de huevos puestos en 10 días \times 100.

8.8. Análisis estadístico

Con los datos obtenidos de los experimentos se elaboraron diagramas de caja y se calcularon las siguientes medidas descriptivas: promedio, mediana y desviación estándar en los siguientes parámetros.

- Prueba de toxicidad (CL₅₀) por línea, tratamiento e interacción línea-tratamiento.

- Emergencia por día: por línea, tratamiento, día, interacción línea-tratamiento, interacción tratamiento-día, interacción línea-día e interacción línea-tratamiento-día.
- Emergencia por generación: por línea, tratamiento e interacción línea-tratamiento.
- Emergencia total y proporción sexual: por línea, tratamiento e interacción línea-tratamiento.
- Parámetros reproductivos: por línea, tratamiento e interacción línea-tratamiento.

Estos análisis se realizaron con el paquete de cómputo Minitab versión 15. Asimismo, se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) Factorial para cada uno de los parámetros.

En el caso de encontrar diferencias significativas, se realizó la prueba de comparación múltiple de medias de Fisher ó LSD (*Least Significant Difference*) para determinar cuáles factores fueron diferentes estadísticamente.

9. RESULTADOS

9.1. EXPERIMENTOS PRELIMINARES DE TOXICIDAD

Con el fin de establecer un rango de concentraciones cercanas a la CL_{50} del H_2O_2 se utilizaron las concentraciones 2, 5, 20, 50, 200 y 500 mM de acuerdo a Courgeon (1988); los resultados indicaron un rango entre 5 y 200 mM, debido a que a concentraciones mayores a ésta no se observaron sobrevivientes (ver Metodología).

9.2. PRUEBA DE TOXICIDAD (CL_{50})

Se realizaron cuatro experimentos independientes con tres repeticiones para cada concentración. Los datos de mortalidad media obtenidos fueron:

Cuadro 2. Concentraciones letales medias (CL_{50}) para cada experimento y línea.

Experimento	CL_{50} (mM)	
	<i>flare</i> ³	Oregon- <i>flare</i> ³
1	37	33
2	51	52
3	59	82
4	15	29

La Figura 3 muestra el porcentaje de mortalidad de las siete concentraciones utilizadas en los cuatro experimentos.

El ANOVA indicó diferencias significativas entre concentraciones ($F=37.54$, $p=0.000$) con una clara dosis respuesta, ya que muestran un incremento en sus valores conforme aumenta la concentración (Figura 3; Cuadro 3).

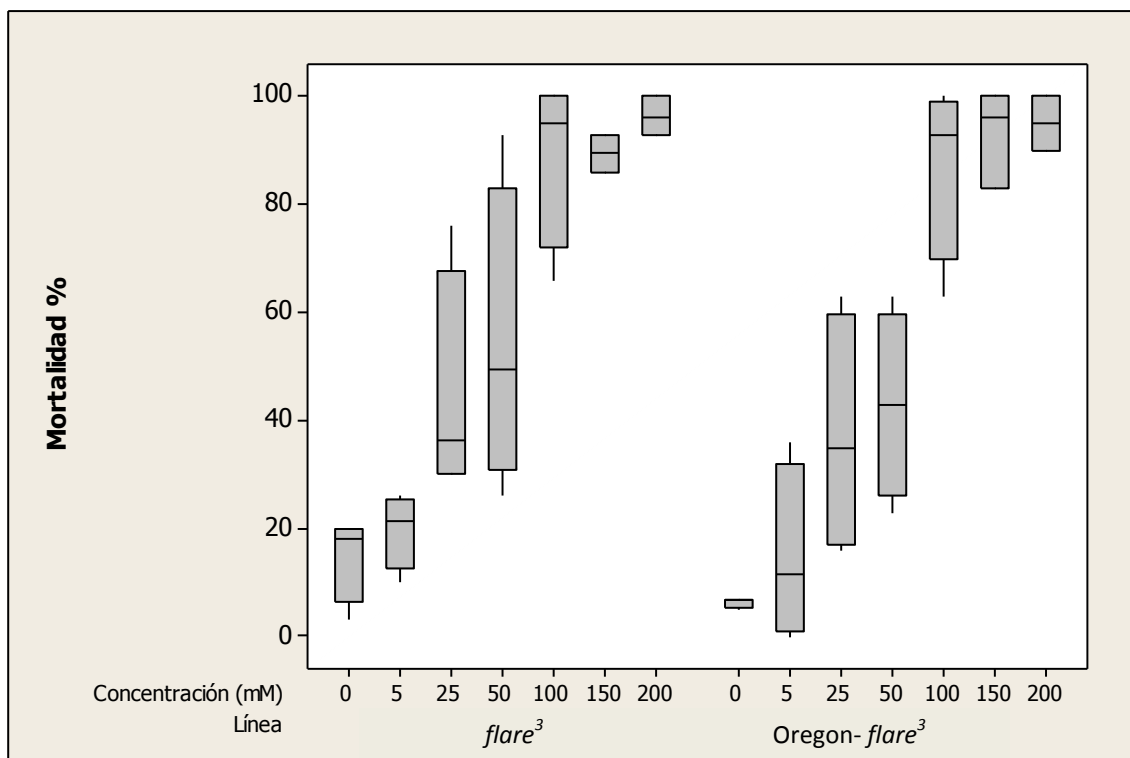


Fig. 3. Diagrama de caja del porcentaje de mortalidad por cada concentración y línea.

Cuadro 3. Medianas de las concentraciones de H₂O₂ utilizadas.

Concentración de H ₂ O ₂	Mediana
0	6.60
5	20.00
25	36.50
50	48.00
100	93.00
150	93.00
200	96.00

Por su parte los valores del ANOVA entre líneas resultaron mayores a 0.05, lo cual indica que no se encontraron diferencias significativas ($F=1.07$ $p=0.307$), tal y como se observa en el valor de sus medianas ($flare^3=46$, $Oregon-flare^3=50$). Del mismo modo, tampoco se encontraron

diferencias ($p>0.05$) entre los cuatro experimentos, por lo que los datos se manejaron en conjunto para cada línea.

9.2.1. Línea *flare*³

De acuerdo al método gráfico y al análisis con la ecuación cuadrática, los datos indican que la CL_{50} de H_2O_2 para *flare*³ es 38 mM (Figura 4).

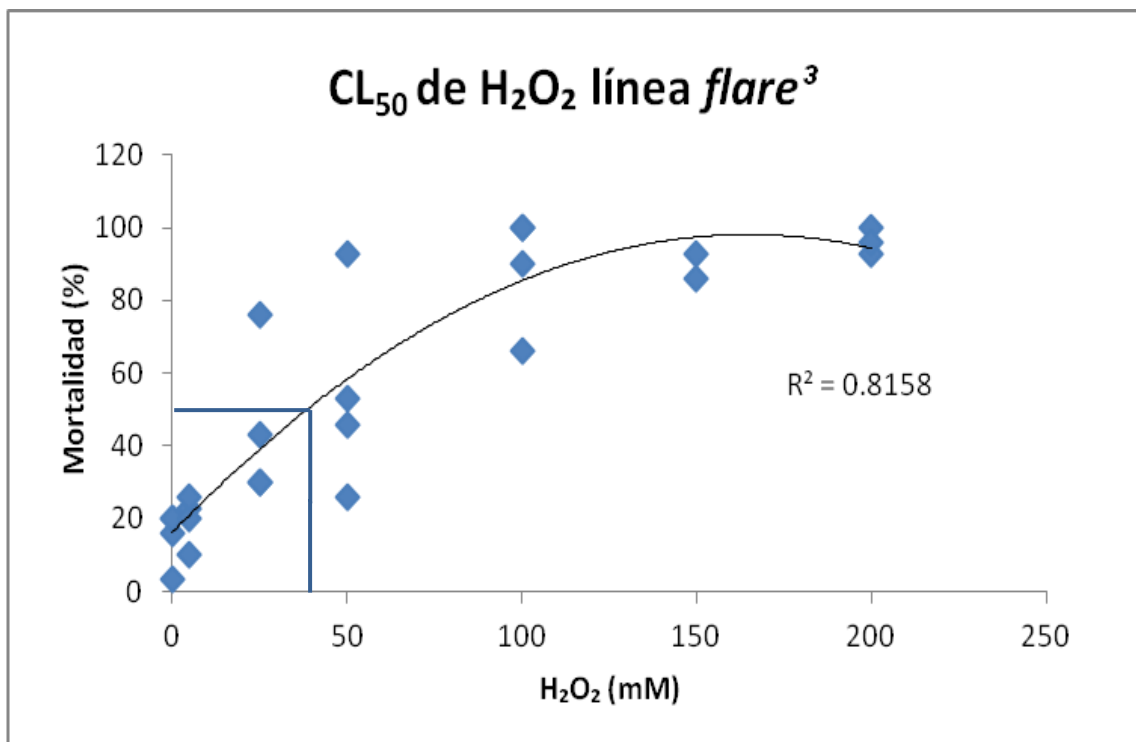


Fig. 4. Regresión polinómica que indica la $CL_{50}= 38$ mM para la línea *flare*³ en azul. Mortalidad indica el porcentaje de individuos muertos o no eclosionados después del tratamiento.

Se observó que los datos concuerdan con un comportamiento de tipo polinómico con un valor de $r^2=0.8158$. En base a la ecuación del gráfico se obtuvieron datos de sensibilidad y potencia (Cuadro 4).

9.2.2. Línea Oregon-*flare*³

En el caso de ésta línea el valor de CL_{50} de H_2O_2 es 48 mM (Figura 5).

Al igual que en la línea *flare*³ el comportamiento de los datos es polinómico, en este caso con un valor de $r^2=0.8638$. De igual modo la

sensibilidad de la línea al compuesto y la potencia del mismo se muestran en el cuadro 4.

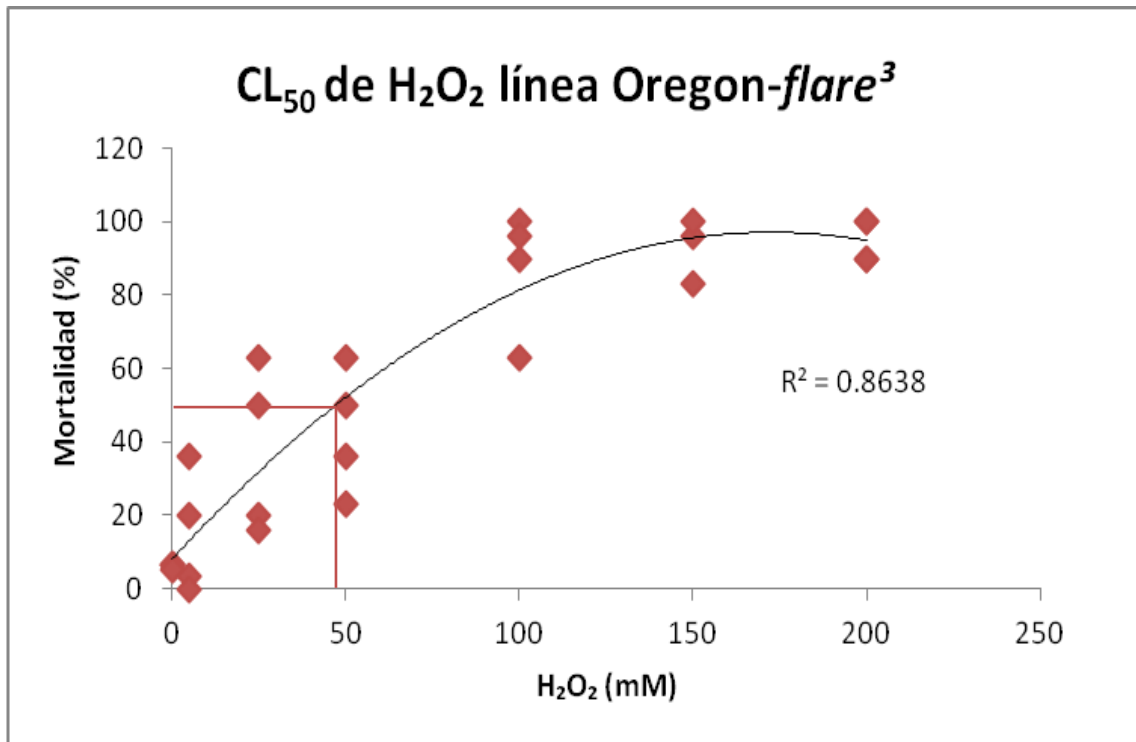


Fig. 5. Regresión polinómica en la que se indica la CL₅₀ = 47 mM para la línea Oregon-flare³ en rojo.

Cuadro 4. Valores de sensibilidad, potencia, r² y la ecuación de línea de tendencia polinómica para las dos líneas.

Línea	Sensibilidad	Potencia	r ²	Ecuación
<i>flare</i> ³	-0.003	0.9932	0.8158	y = -0.003x ² + 0.9932x + 16.241
Oregon-flare ³	-0.003	1.0325	0.8638	y = -0.003x ² + 1.0325x + 8.0362

Ambas líneas presentaron la misma sensibilidad al compuesto; sin embargo la potencia del H₂O₂ presentó valores numéricos más altos en la línea Oregon-*flare*³ que en la *flare*³ por lo cual se realizó una prueba de *t*. Los resultados fueron: $t=1.76$, $p=0.0906$, mostrando que no hubo diferencias significativas ($p>0.05$), lo que indica que el tratamiento presentó la misma fuerza en ambas líneas.

A partir de los valores de CL₅₀ obtenidos para el H₂O₂, se determinó la concentración subtóxica (20 mM) que equivale a la CL₃₄ en la línea *flare*³ y CL₂₅ en la Oregon-*flare*³ con la finalidad de medir las implicaciones del efecto oxidativo inducido por H₂O₂ en algunos parámetros reproductivos de *D. melanogaster*. Se determinó la concentración 20 mM debido a que se demostró en éste trabajo que es una concentración subtóxica y porque se tienen antecedentes de esa concentración en el laboratorio.

9.3. PARENTALES (P0): EMERGENCIA, PROPORCIÓN SEXUAL Y PARÁMETROS REPRODUCTIVOS

No se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) en los análisis (ANOVA) relacionados con la emergencia (emergencia total, proporción sexual y emergencia por día) para los dos experimentos, por lo cual los datos se manejaron en conjunto.

9.3.1. EMERGENCIA TOTAL Y PROPORCIÓN SEXUAL

Análisis de la interacción línea-tratamiento:

- **Proporción sexual**

Se observaron medianas similares en ambos sexos en las dos líneas para los tratamientos agua y DMSO. De manera general, el H₂O₂ tuvo valores mayores en hembras que en machos, sin embargo en las hembras la línea *flare*³ tuvo una mediana más alta que en la Oregon-*flare*³ y de modo opuesto, los machos de la línea Oregon-*flare*³ presentaron una proporción sexual mayor. Esto también ocurrió en el

tratamiento con tolueno. En la línea *flare*³ se observó mayor variación y el compuesto con mayor dispersión fue el agua en ambos sexos (Cuadro 5; Figura 6).

En el ANOVA no se encontraron diferencias significativas en la proporción de hembras y machos para la interacción línea-tratamiento ($F=1.46$, $p=0.234$).

Cuadro 5. Medidas descriptivas de la interacción línea-tratamiento en la proporción sexual de hembras y machos.

Tratamiento	Línea	Proporción sexual hembras	Mediana	Proporción sexual machos	Mediana
Agua	<i>flare</i> ³	0.4794 ± 0.2012	0.4722	0.5206 ± 0.2012	0.5278
	Oregon- <i>flare</i> ³	0.5188 ± 0.1569	0.5147	0.4812 ± 0.1569	0.4853
DMSO	<i>flare</i> ³	0.6220 ± 0.1575	0.5836	0.3780 ± 0.1575	0.4164
	Oregon- <i>flare</i> ³	0.6076 ± 0.0932	0.6111	0.3924 ± 0.0932	0.3889
H ₂ O ₂	<i>flare</i> ³	0.6916 ± 0.1773	0.6970	0.3084 ± 0.1773	0.3030
	Oregon- <i>flare</i> ³	0.5726 ± 0.0780	0.5917	0.4274 ± 0.0780	0.4083
Tolueno	<i>flare</i> ³	0.7178 ± 0.2361	0.6825	0.2822 ± 0.2361	0.3175
	Oregon- <i>flare</i> ³	0.5701 ± 0.1413	0.5774	0.4299 ± 0.1413	0.4226

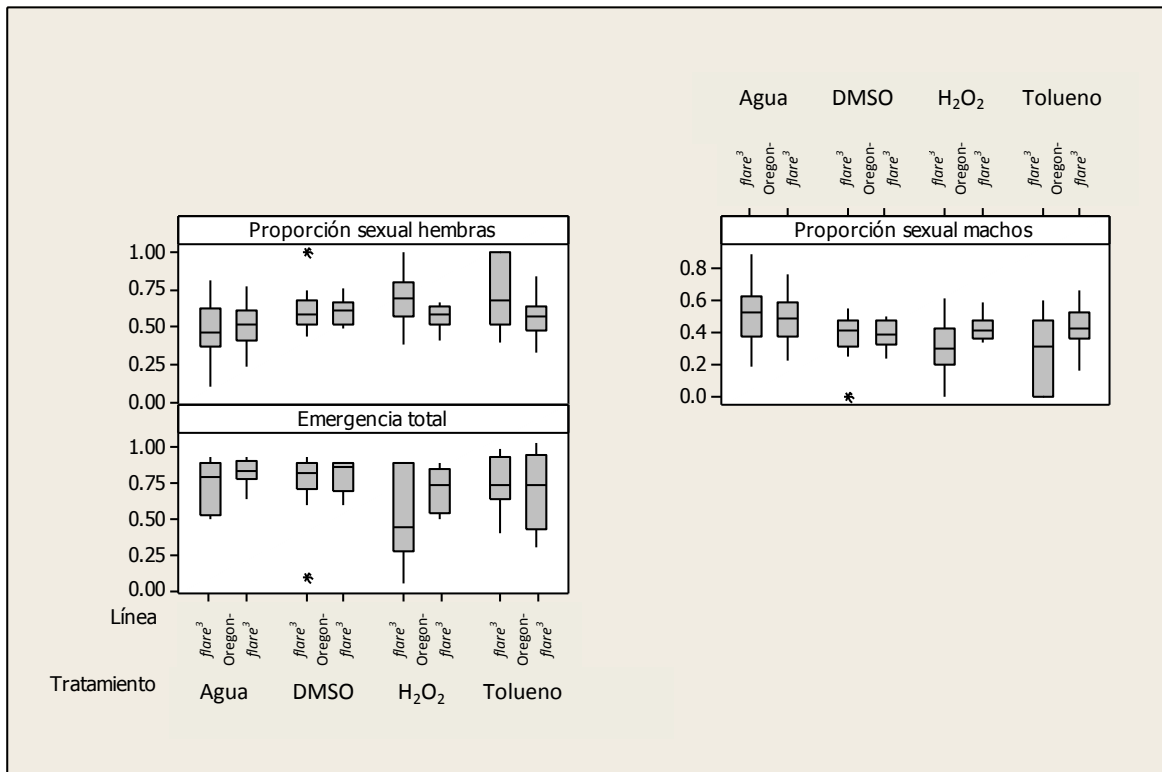


Fig. 6. Diagramas de caja de la proporción sexual de hembras, machos y emergencia total por cada línea y tratamiento.

- **Emergencia total**

En el caso de la emergencia, los tratamientos con agua y DMSO tuvieron medianas similares en las dos líneas y presentaron los valores más altos en sus medianas. Por otro lado, el H₂O₂ en la línea Oregon-*flare*³ tuvo un valor parecido a los que presentaron las dos líneas ante el tolueno. Es importante mencionar que la línea *flare*³ tratada con H₂O₂, presentó el valor de mediana más bajo y fue el H₂O₂ el compuesto con mayor variación en sus datos (Cuadro 6).

Cuadro 6. Medidas descriptivas de la interacción línea-tratamiento en la emergencia total.

Tratamiento	Línea	Emergencia total	Mediana
Agua	<i>flare</i> ³	0.7450 ± 0.1787	0.8000
	Oregon- <i>flare</i> ³	0.8400 ± 0.0907	0.8500
DMSO	<i>flare</i> ³	0.7450 ± 0.2477	0.8250
	Oregon- <i>flare</i> ³	0.8200 ± 0.1111	0.8750
H ₂ O ₂	<i>flare</i> ³	0.5300 ± 0.3320	0.4500
	Oregon- <i>flare</i> ³	0.7150 ± 0.1528	0.7500
Tolueno	<i>flare</i> ³	0.7650 ± 0.1780	0.7500
	Oregon- <i>flare</i> ³	0.7100 ± 0.2675	0.7500

En el ANOVA no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la emergencia total ($F=1.12$, $p=0.347$) para la interacción línea-tratamiento.

Análisis por tratamiento:

- **Proporción sexual**

Las medianas fueron parecidas con los compuestos DMSO, H₂O₂ y tolueno, tanto en la proporción sexual de hembras como de machos, de modo opuesto al testigo agua en el cual se observaron medianas con valores más dispersos. Dichos valores fueron menores en hembras y mayores en machos comparados con los otros tres compuestos (Cuadro 7; Figura 7).

El ANOVA indicó diferencias significativas ($F=3.36$, $p=0.023$) en la proporción sexual de hembras y machos entre los tratamientos.

La prueba LSD mostró que las diferencias fueron entre agua-DMSO ($p=0.02760$), agua-H₂O₂ ($p=0.01176$) y agua-tolueno ($p=0.0062$).

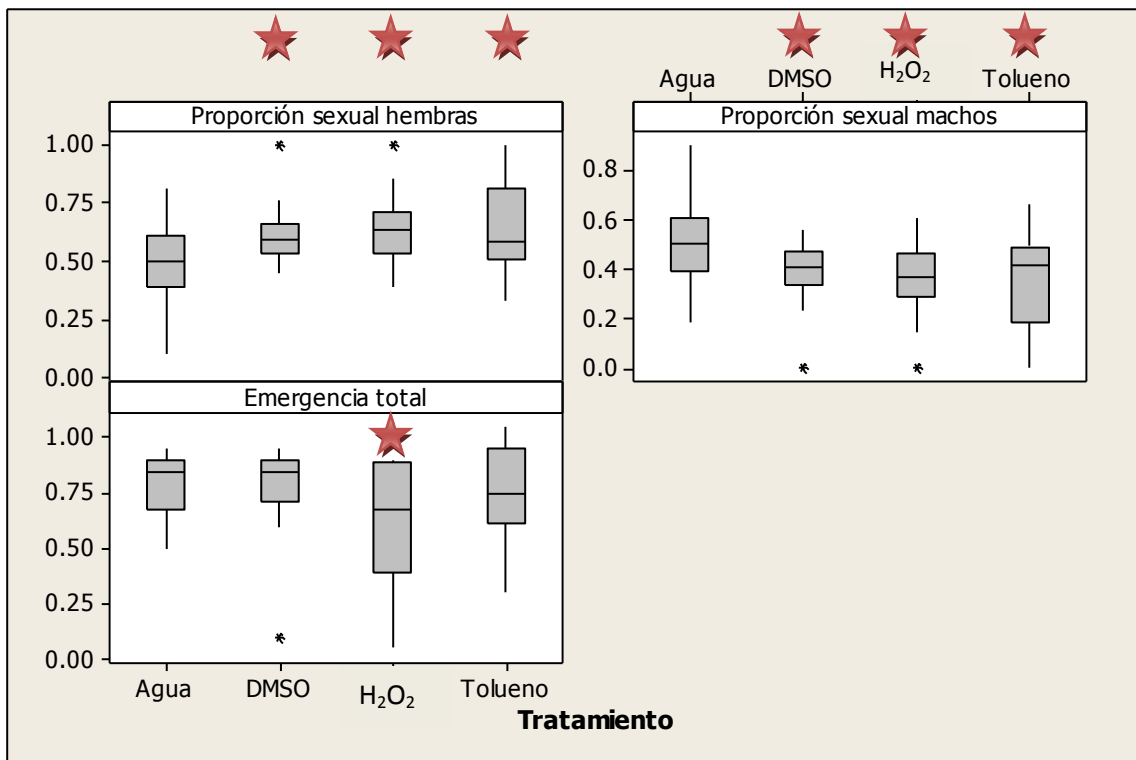


Fig. 7. Diagramas de caja de la proporción sexual de hembras, machos y emergencia total por tratamiento. ★ Diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo según la prueba LSD.

Cuadro 7. Medidas descriptivas de la proporción sexual de hembras y machos por tratamiento.

Tratamiento	Proporción sexual hembras	Mediana	Proporción sexual machos	Mediana
Agua	0.4991 ± 0.1767	0.5000	0.5009 ± 0.1767	0.5000
DMSO	0.6148 ± 0.1262	0.5941	0.3852 ± 0.1262	0.4059
H ₂ O ₂	0.6321 ± 0.1466	0.6307	0.3679 ± 0.1466	0.3693
Tolueno	0.6440 ± 0.2040	0.5858	0.3560 ± 0.2040	0.4142

- **Emergencia total**

En relación a la emergencia, el tratamiento con agua mostró valores parecidos a los del DMSO, lo mismo ocurrió con los tratamientos H₂O₂ y tolueno en los cuales las medianas fueron similares. Cabe resaltar que el H₂O₂ fue el compuesto con mayor variación en sus datos (Cuadro 8; Figura 7).

En el ANOVA para la emergencia se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($F=2.77$, $p=0.048$).

La prueba LSD correspondiente, reveló las diferencias entre H₂O₂-DMSO ($p=0.01818$) y H₂O₂-agua ($p=0.01230$).

Cuadro 8. Medidas descriptivas de la emergencia total por tratamiento.

Tratamiento	Emergencia total	Medianas
Agua	0.7925 ± 0.1462	0.8500
DMSO	0.7825 ± 0.1908	0.8500
H ₂ O ₂	0.6225 ± 0.2688	0.6750
Tolueno	0.7375 ± 0.2229	0.7500

Análisis por línea:

- **Proporción sexual**

En ambos sexos, las medianas en la proporción sexual fueron similares entre las líneas y los ANOVA confirmaron que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($F=2.76$, $p=0.101$) (Cuadro 9).

Cuadro 9. Medidas descriptivas de la proporción sexual de hembras y machos por línea.

Línea	Proporción sexual hembras	Mediana	Proporción sexual machos	Mediana
<i>flare</i> ³	0.6277 ± 0.2096	0.6056	0.3723 ± 0.2096	0.3944
Oregon-<i>flare</i> ³	0.5673 ± 0.1214	0.5811	0.4327 ± 0.1214	0.4189

- **Emergencia total**

En la emergencia, las medianas fueron parecidas en ambas líneas. El ANOVA no mostró diferencias significativas ($F=2.57$, $p=0.113$) (Cuadro 10).

Cuadro 10. Medidas descriptivas de la emergencia por línea.

Línea	Emergencia total	Mediana
<i>flare</i> ³	0.6963 ± 0.2525	0.7750
Oregon-<i>flare</i> ³	0.7713 ± 0.1739	0.8500

9.3.2. EMERGENCIA POR DÍA

Análisis de la interacción línea-tratamiento-día:

En los tratamientos agua y DMSO en ambos sexos, la emergencia presentó medianas similares siendo mayores en el día 10, seguidas por el 11 y el 12, aunque para el tratamiento con DMSO los datos de los machos fueron menos dispersos. Por el contrario, en los tratamientos con H₂O₂ y tolueno, conforme pasaron los días se observó un valor mayor en

las medianas, siendo el día 12 en el que la mayoría de los imagos emergieron. Sin embargo, en estos compuestos las hembras presentaron mayor variación en los datos. De manera general la línea *flare*³ presentó mayor variación (Cuadros 11 y 12; Figura 8)

El ANOVA no mostró diferencias significativas en la interacción línea-tratamiento-día de hembras ($F=1.53$, $p=0.169$) ni en la de machos ($F=1.45$, $p=0.196$).

Cuadro 11. Medidas descriptivas de la emergencia de hembras y machos por tratamiento durante tres días en la línea *flare*³.

Tratamiento	Día	Emergencia hembras	Mediana	Emergencia machos	Mediana
Agua	10	0.4506 ± 0.2158	0.4626	0.4979 ± 0.1838	0.4853
	11	0.0255 ± 0.0433	0	0.0261 ± 0.0438	0
	12	0	0	0	0
DMSO	10	0.5414 ± 0.0631	0.5374	0.4177 ± 0.0443	0.4330
	11	0.0181 ± 0.0294	0	0.0161 ± 0.0359	0
	12	0.0066 ± 0.0210	0	0	0
H ₂ O ₂	10	0.0838 ± 0.1078	0.0263	0.0071 ± 0.0225	0
	11	0.3033 ± 0.2010	0.3750	0.0837 ± 0.1084	0.0357
	12	0.3699 ± 0.2952	0.2679	0.1521 ± 0.1541	0.1339
Tolueno	10	0.1041 ± 0.1721	0	0.0548 ± 0.0762	0.0185
	11	0.2487 ± 0.1678	0.1820	0.1721 ± 0.1153	0.1484
	12	0.2430 ± 0.1816	0.2899	0.1773 ± 0.1642	0.1488

Cuadro 12. Medidas descriptivas de la emergencia de hembras y machos por tratamiento durante tres días en la línea Oregon-flare³.

Tratamiento	Día	Emergencia hembras	Mediana	Emergencia machos	Mediana
Agua	10	0.4668 ± 0.1200	0.4686	0.4334 ± 0.1445	0.4367
	11	0.0472 ± 0.0493	0.0532	0.0526 ± 0.0637	0.0263
	12	0	0	0	0
DMSO	10	0.5421 ± 0.0837	0.5425	0.3137 ± 0.1502	0.3256
	11	0.0479 ± 0.0695	0.0278	0.0964 ± 0.1065	0.0833
	12	0	0	0	0
H ₂ O ₂	10	0.0919 ± 0.1068	0.0500	0.0361 ± 0.0561	0
	11	0.1896 ± 0.1160	0.2250	0.0782 ± 0.0476	0.0833
	12	0.3388 ± 0.1857	0.3471	0.2654 ± 0.1496	0.2750
Tolueno	10	0.0076 ± 0.0243	0	0	0
	11	0.2302 ± 0.1582	0.1987	0.1247 ± 0.1896	0.0690
	12	0.3863 ± 0.1889	0.3923	0.2511 ± 0.2020	0.2804

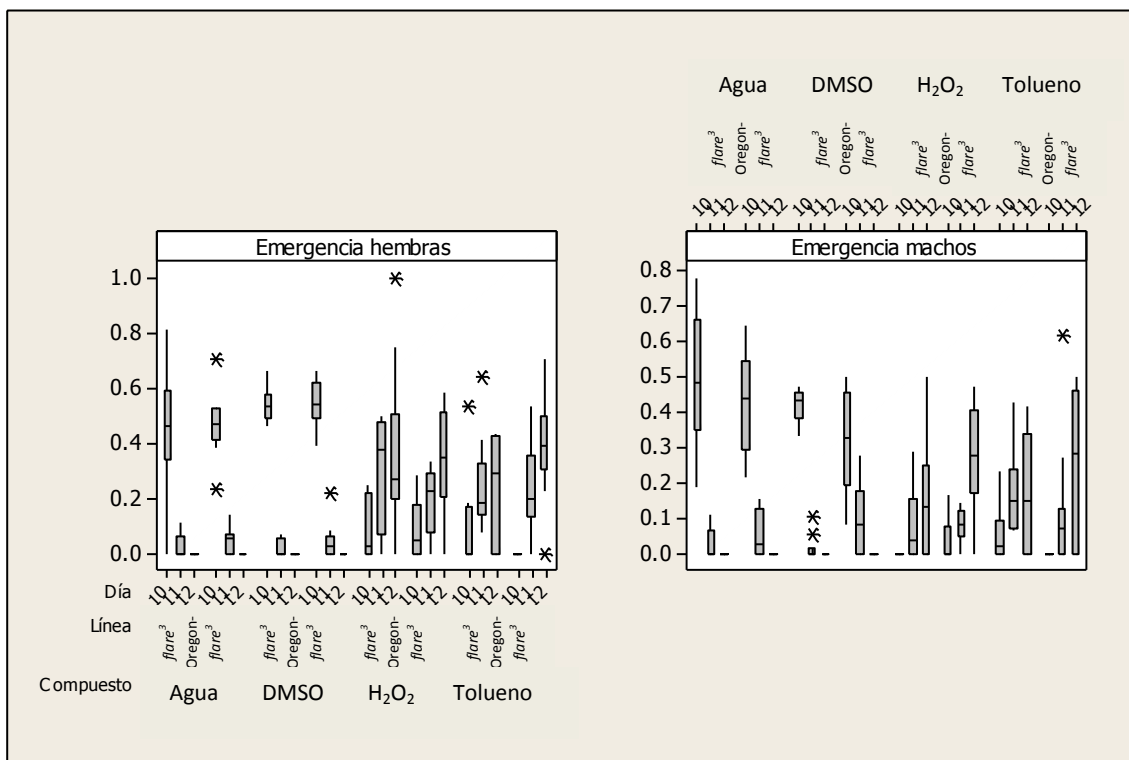


Fig. 8. Diagramas de caja de la emergencia de hembras y machos por línea y tratamiento durante tres días.

Análisis por tratamiento:

Tanto en hembras como machos, las medianas de los tratamientos de agua y DMSO fueron similares. También se encontró similitud entre los datos de H₂O₂ y tolueno. La mayor dispersión se observó en agua en ambos sexos. Sin embargo, los valores de medianas en machos fueron menores que en las hembras (Cuadro 13; Figura 9)

El ANOVA de la emergencia de hembras no indicó diferencias significativas estadísticamente ($F=2.37$, $p=0.071$), sin embargo en el caso de los machos si reveló diferencias ($F=3.61$, $p=0.014$).

La prueba LSD mostró que las diferencias se dieron entre los tratamientos agua y H₂O₂ ($p=0.001353$).

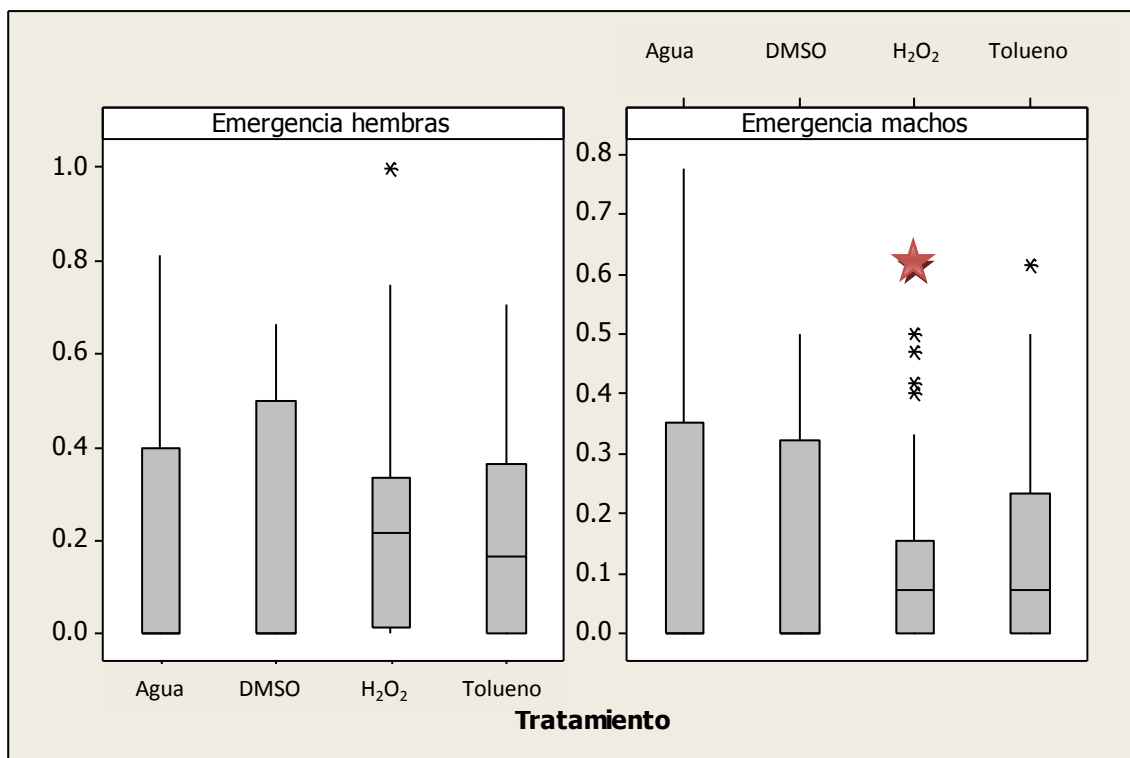


Fig. 9. Diagramas de caja de la emergencia de hembras y machos por tratamiento.

★ Diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo según la prueba LSD.

Cuadro 13. Medidas descriptivas de la emergencia de hembras y machos por tratamiento.

Tratamiento	Emergencia hembras	Mediana	Emergencia machos	Mediana
Agua	0.1650 ± 0.2326	0	0.1683 ± 0.2342	0
DMSO	0.1927 ± 0.2545	0	0.1406 ± 0.1828	0
H ₂ O ₂	0.2295 ± 0.2089	0.2143	0.1038 ± 0.1307	0.0714
Tolueno	0.2033 ± 0.1943	0.1667	0.1300 ± 0.1604	0.0714

Análisis por línea:

En cuanto a la emergencia de hembras, se observó que la mediana en la línea *flare*³ fue similar a la línea de Oregon-*flare*³ aunque en la primera hubo mayor variación.

En el caso de los machos, la línea *flare*³ tuvo una mediana menor que la línea Oregon-*flare*³ y por el contrario esta última tuvo una mayor dispersión (Cuadro 14).

Los análisis de ANOVA no mostraron diferencias significativas en la emergencia de hembras ($F=0.05$, $p=0.823$) ni de machos ($F=0.08$, $p=0.782$) entre las dos líneas.

Cuadro 14. Medidas descriptivas de la emergencia de hembras y machos por línea.

Línea	Emergencia hembras	Mediana	Emergencia machos	Mediana
<i>flare</i> ³	0.1996 ± 0.2323	0.0931	0.1337 ± 0.1860	0.0185
Oregon- <i>flare</i> ³	0.1957 ± 0.2155	0.1026	0.1376 ± 0.1774	0.0667

Análisis por día:

En el análisis (ANOVA) realizado por día, las hembras mostraron diferencias significativas ($F=26.94$, $p=0$) entre los tres días evaluados (10, 11 y 12), lo cual también ocurrió en machos ($F=37.07$, $p=0$) (Figura 10).

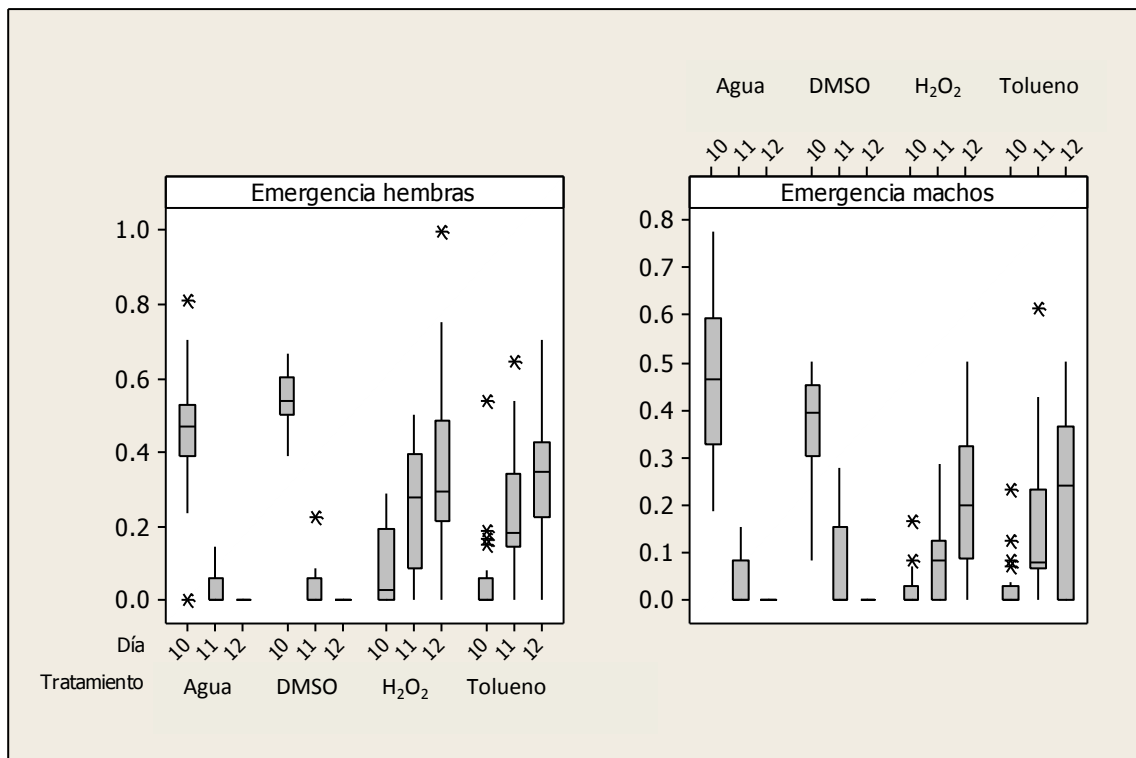


Fig. 10. Diagramas de caja de la emergencia de hembras y machos por tratamiento durante tres días.

9.3.3. PARÁMETROS REPRODUCTIVOS

En el ANOVA factorial de tres factores: experimento, línea y tratamiento no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la comparación de los dos experimentos, por lo cual se optó por manejar los datos en conjunto y elaborar un Análisis de Varianza de dos factores (línea y tratamiento) para los parámetros: fecundidad total, desempeño reproductivo y porcentaje de fertilidad.

Análisis de la interacción línea-tratamiento:

- **Fecundidad total**

En la fecundidad total las medianas en agua fueron similares en las dos líneas, lo mismo sucede en DMSO (Figura 11). Por el contrario las

medianas en H₂O₂ y tolueno tuvieron valores más altos en la línea *flare*³ que en la *Oregon-flare*³.

Cabe destacar que la mediana del tratamiento con H₂O₂ en *flare*³ fue parecida a la del agua en ambas líneas y éstos fueron los tratamientos con los valores más altos. A diferencia de la mediana de H₂O₂ en la línea *Oregon-flare*³, que es semejante a las obtenidas en los tratamientos con DMSO y tolueno en ambas líneas, las cuales tuvieron los valores más bajos.

Por otro lado, el tratamiento que tuvo una mayor variación en sus datos fue el tolueno en la línea *Oregon-flare*³, y el tratamiento que presentó datos más homogéneos fue DMSO en la misma línea (Cuadro 15).

Cuadro 15. Medidas descriptivas en la interacción línea-tratamiento en la fecundidad total.

Tratamiento	Línea	Fecundidad total	Mediana
Agua	<i>flare</i> ³	551.8 ± 89.7	570.5
	<i>Oregon-flare</i> ³	552.9 ± 125.8	595.5
DMSO	<i>flare</i> ³	426.9 ± 140.3	457.0
	<i>Oregon-flare</i> ³	448.8 ± 65.1	450.5
H ₂ O ₂	<i>flare</i> ³	595.4 ± 83.8	590.0
	<i>Oregon-flare</i> ³	516.4 ± 143.8	469.5
Tolueno	<i>flare</i> ³	498.9 ± 128.0	504.5
	<i>Oregon-flare</i> ³	445.8 ± 172.8	444.0

El ANOVA realizado no mostró diferencias significativas (F=0.72 $p=0.544$) en la interacción línea-tratamiento.

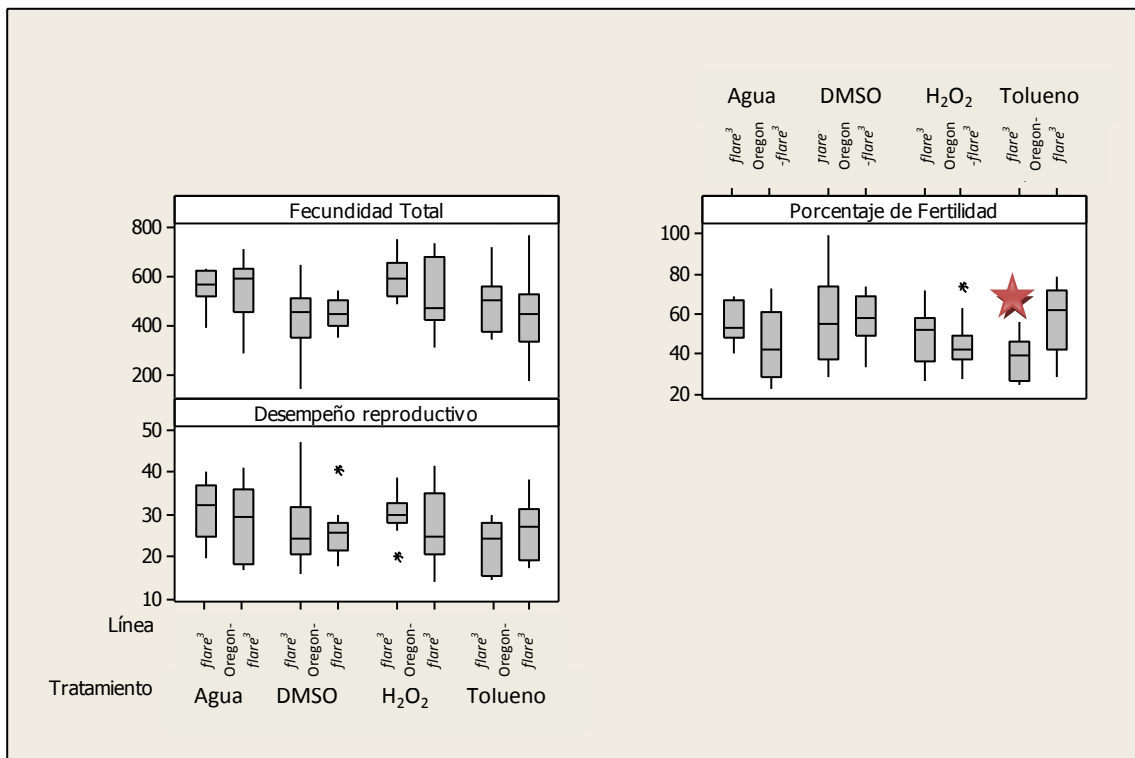


Fig. 11. Diagramas de caja de los experimentos realizados por línea y por tratamiento en los tres parámetros reproductivos evaluados. ★ Diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo según la prueba LSD.

- **Desempeño reproductivo**

No existe diferencia entre las medianas del agua en ambas líneas, lo cual también es evidente entre las medianas del tratamiento con DMSO y tolueno (Figura 11). Contrariamente, la mediana del tratamiento con H₂O₂ en la línea *flare*³ fue mayor que en la *Oregon-flare*³. Los valores más altos corresponden al testigo agua en ambas líneas y H₂O₂ en *flare*³ que tuvieron similitud entre sí y los más bajos a DMSO y tolueno en ambas líneas así como H₂O₂ en *Oregon-flare*³, que también son similares. Cabe mencionar que la mayor variación se encuentra en DMSO de la línea *flare*³ y la menor H₂O₂ también en *flare*³ (Cuadro 16).

A pesar de lo anterior, el ANOVA no mostró diferencias significativas ($F=0.89$ $p=0.450$) en la interacción línea-tratamiento.

Cuadro 16. Medidas descriptivas de la fecundidad total en la interacción línea-tratamiento.

Tratamiento	Línea	Desempeño reproductivo	Mediana
Agua	<i>flare</i> ³	30.95 ± 6.76	32.40
	Oregon- <i>flare</i> ³	28.27 ± 8.92	29.65
DMSO	<i>flare</i> ³	27.10 ± 9.09	24.20
	Oregon- <i>flare</i> ³	25.73 ± 6.48	25.65
H ₂ O ₂	<i>flare</i> ³	30.09 ± 5.01	29.85
	Oregon- <i>flare</i> ³	26.63 ± 8.52	25.00
Tolueno	<i>flare</i> ³	22.73 ± 6.26	24.40
	Oregon- <i>flare</i> ³	26.27 ± 7.53	27.25

- **Porcentaje de fertilidad**

En cuanto a la fertilidad, tanto con el agua como con el H₂O₂ la línea *flare*³ tuvo valores más altos que la línea Oregon-*flare*³; en contraste, en el testigo tolueno se encontraron valores más altos en la línea Oregon-*flare*³ que en Oregon-*flare*³. En DMSO los valores fueron semejantes en las dos líneas.

Ahora bien, los valores de agua para *flare*³ fueron parecidos a los de DMSO en ambas líneas, así como con H₂O₂ en *flare*³ y tolueno en Oregon-*flare*³, siendo éstos los más altos. También fueron parecidos entre sí H₂O₂ en Oregon-*flare*³ y tolueno en *flare*³, los valores más bajos obtenidos.

DMSO en la línea *flare*³ fue el tratamiento donde se presentó la mayor variación, por el contrario la menor variación se presentó en agua *flare*³ de ésta línea (Cuadro 17; Figura 11).

El ANOVA mostró que sí hubo diferencias significativas ($F=3.01$ $p=0.036$) en la interacción línea-tratamiento.

La prueba de LSD mostró que las diferencias significativas fueron entre DMSO Oregon-*flare*³ - tolueno *flare*³ ($p=0.006789$), DMSO *flare*³ - tolueno *flare*³ ($p=0.012792$), tolueno Oregon-*flare*³ - tolueno *flare*³ ($p=0.011019$) y tolueno *flare*³ - agua *flare*³ ($p=0.018437$).

Cuadro 17. Medidas descriptivas del porcentaje de fertilidad en la interacción línea-tratamiento.

Tratamiento	Línea	% Fertilidad	Mediana
Agua	<i>flare</i> ³	55.44	53.60
	Oregon- <i>flare</i> ³	45.73	42.75
DMSO	<i>flare</i> ³	56.42	55.35
	Oregon- <i>flare</i> ³	58.04	58.60
H ₂ O ₂	<i>flare</i> ³	49.19	52.15
	Oregon- <i>flare</i> ³	44.97	42.50
Tolueno	<i>flare</i> ³	38.76	39.10
	Oregon- <i>flare</i> ³	56.81	61.90

Análisis por tratamiento:

- **Fecundidad total**

En la fecundidad total las medianas de agua y H₂O₂ fueron similares y tuvieron los valores más altos. Mientras que las medianas de DMSO y tolueno fueron parecidas con los valores más bajos.

Los datos pertenecientes al tratamiento tolueno fueron los que presentaron mayor variación, a diferencia de los correspondientes al testigo agua que fueron los más homogéneos (Cuadro 18; Figura 12).

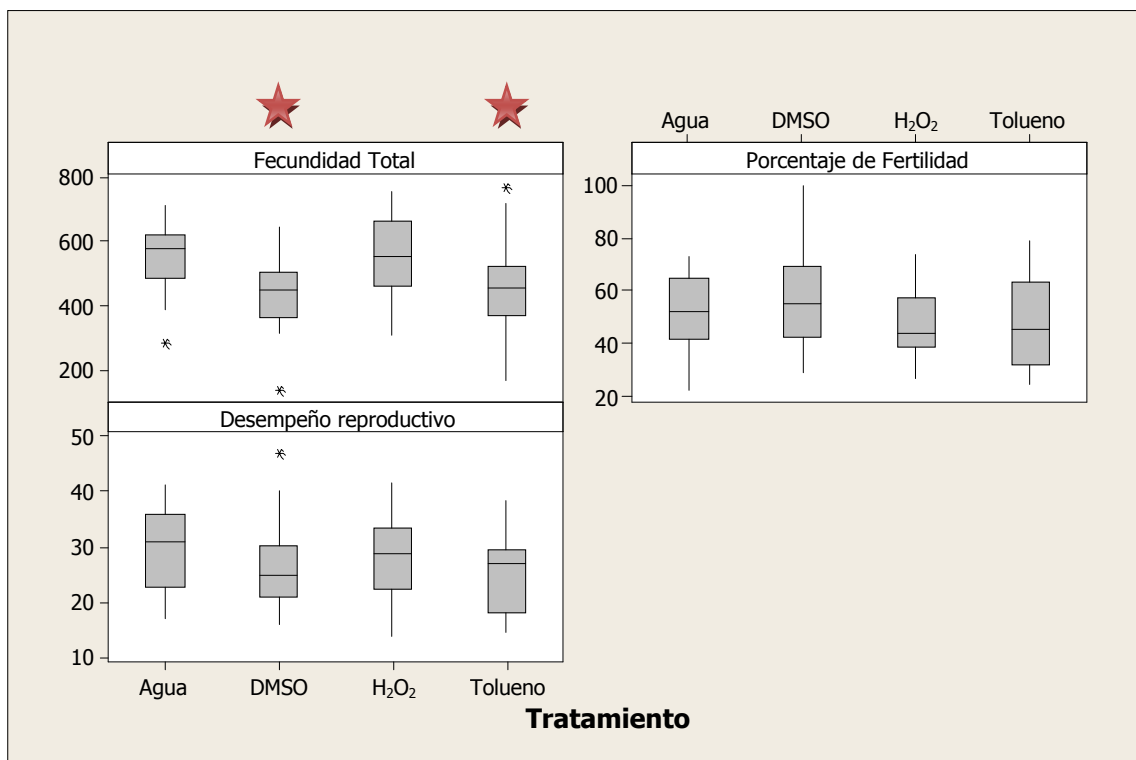


Fig. 12. Diagramas de caja de los experimentos realizados por tratamiento en los tres parámetros reproductivos evaluados. ★ Diferencias estadísticamente significativas según la prueba LSD.

El ANOVA indicó que sí existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($F= 4.56, p= 0.006$).

La prueba LSD indicó que las diferencias significativas corresponden a: H₂O₂-DMSO ($p=0.003431$), H₂O₂-tolueno ($p=0.035580$), agua-DMSO ($p=0.004468$) y agua-tolueno ($p=0.043912$).

Cuadro 18. Medidas descriptivas de la fecundidad total por tratamiento.

Tratamiento	Fecundidad total	Mediana
Agua	552.4 ± 106.3	577.0
DMSO	437.9 ± 107.0	555.0
H ₂ O ₂	555.9 ± 121.5	450.5
Tolueno	472.4 ± 150.5	457.5

- **Desempeño reproductivo**

En el caso del desempeño reproductivo, los cuatro compuestos presentaron medianas similares, el tolueno fue el compuesto que mostró mayor dispersión (Cuadro 19).

El ANOVA confirmó que no existieron diferencias significativas ($F=1.81$, $p=0.153$) entre los compuestos.

Cuadro 19. Medidas descriptivas del desempeño reproductivo por tratamiento.

Tratamiento	Desempeño reproductivo	Mediana
Agua	29.61 ± 7.82	31.00,
DMSO	26.42 ± 7.72	25.00
H ₂ O ₂	28.36 ± 7.03	28.85,
Tolueno	24.50 ± 6.98	27.15

- **Porcentaje de fertilidad**

En relación al porcentaje de fertilidad las medianas de agua y DMSO fueron similares y tuvieron los valores más altos. Mientras que, las medianas de H₂O₂ y tolueno fueron las más bajas. El DMSO fue el compuesto que presentó mayor dispersión, en cambio el H₂O₂ fue el que menor dispersión tuvo (Cuadro 24; Figura 13).

El ANOVA realizado no indicó diferencias estadísticamente significativas ($F= 27.00$ $p=74.30$) entre los compuestos.

Cuadro 20. Medidas descriptivas del porcentaje de fertilidad por tratamiento.

Tratamiento	% Fertilidad	Mediana
Agua	50.59	52.50
DMSO	57.23	55.35
H ₂ O ₂	47.08	44.15
Tolueno	47.79	45.40

Análisis por línea:

- **Fecundidad total**

En la figura 12 se observa que la fecundidad total en la línea *flare*³ tuvo una mediana con un valor mayor que la línea *Oregon-flare*³, sin embargo, *Oregon-flare*³ tuvo una mayor dispersión con un valor más alto de desviación estándar (Cuadro 21).

El ANOVA no mostró diferencias significativas ($F=0.98$, $p=0.326$) entre las líneas.

Cuadro 21. Medidas descriptivas de la fecundidad total por línea.

Línea	Fecundidad total	Mediana
<i>flare</i> ³	518.3 ± 125.9	523.0
<i>Oregon-flare</i> ³	491.0 ± 135.7	469.5

- **Desempeño reproductivo**

En la línea *flare*³ la mediana de los datos tuvo un valor mayor que la línea *Oregon-flare*³, mostrando también una mayor variación (Cuadro 22).

El ANOVA indicó que no hubo diferencias estadísticamente significativas ($F=0.36$ $p=0.553$) entre líneas.

Cuadro 22. Medidas descriptivas del desempeño reproductivo por línea.

Línea	Desempeño reproductivo	Mediana
<i>flare</i> ³	27.72 ± 7.42	28.35
<i>Oregon-flare</i> ³	26.73 ± 7.67	26.50

- **Porcentaje de fertilidad**

En la línea *flare*³ se observa una mediana mayor que en la línea Oregon-*flare*³ siendo ésta última la que presentó mayor dispersión en los datos (Cuadro 23).

Cuadro 23. Medidas descriptivas del porcentaje de fertilidad por línea.

Línea	% Fertilidad	Mediana
<i>flare</i> ³	49.95	51.05
Oregon- <i>flare</i> ³	51.39	49.40

El ANOVA indicó que no se encontraron diferencias significativas entre las líneas ($F=0.17$ $p= 0.679$).

9.4. FILIAL 1 (F1): EMERGENCIA

Análisis de la interacción línea-tratamiento:

En ésta generación, fue la línea *flare*³ la que presentó medianas con valores más altos y dispersos en todos los compuestos comparados con la línea Oregon-*flare*³ (Cuadro 24; Figura 13).

El ANOVA no mostró diferencias significativas ($F=0.85$, $p=0.450$) en la emergencia de F1.

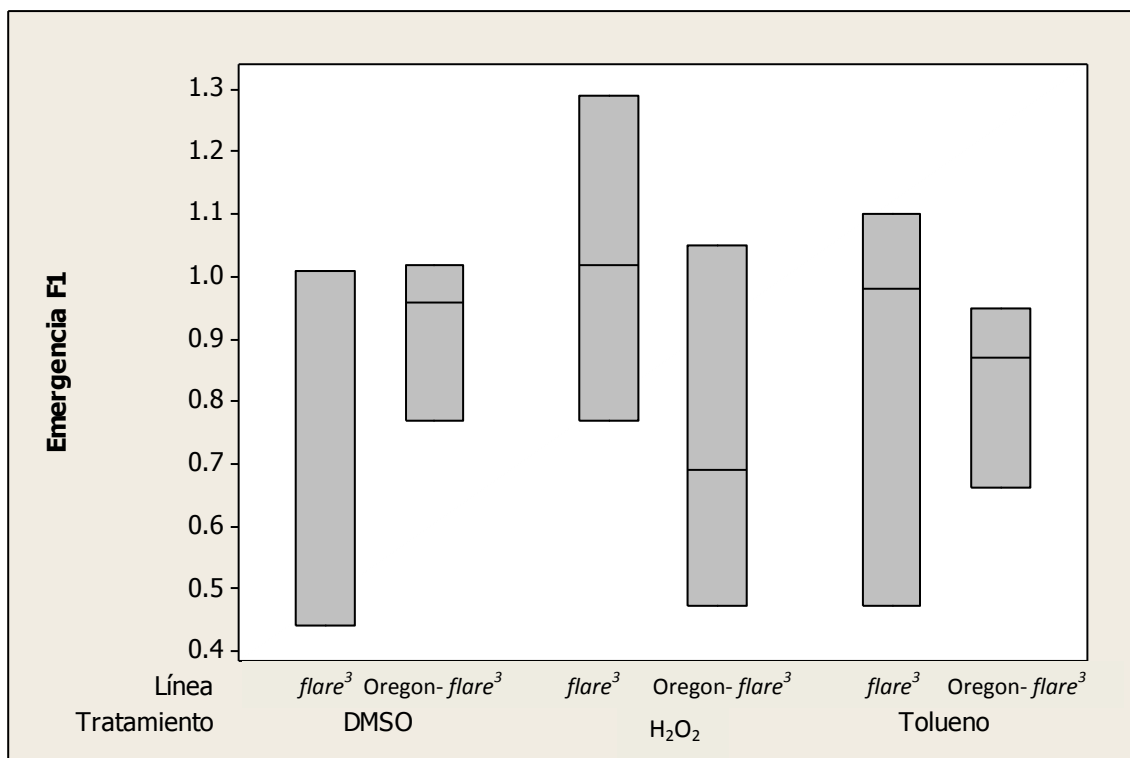


Fig. 13. Diagramas de caja de la emergencia de dos generaciones por cada línea y tratamiento.

Cuadro 24. Medidas descriptivas de la emergencia en la interacción línea-tratamiento de la F1.

Tratamiento	Línea	F1	Mediana
DMSO	<i>flare</i> ³	0.820 ± 0.329	1.010
	Oregon- <i>flare</i> ³	0.916 ± 0.130	0.960
H ₂ O ₂	<i>flare</i> ³	1.027 ± 0.260	1.020
	Oregon- <i>flare</i> ³	0.737 ± 0.293	0.690
Tolueno	<i>flare</i> ³	0.850 ± 0.335	0.980
	Oregon- <i>flare</i> ³	0.826 ± 0.149	0.870

Análisis por tratamiento:

Las medianas mostraron valores similares, sin embargo fue el H₂O₂ el tratamiento donde se observó mayor dispersión (Cuadro 25).

El ANOVA no mostró diferencias significativas (F=0.04, p=0.958) entre tratamientos en la emergencia de la F1.

Cuadro 25. Medidas descriptivas de la emergencia por tratamiento F1.

Tratamiento	F1	Mediana
DMSO	0.868 ± 0.230	0.985
H₂O₂	0.882 ± 0.294	0.895
Tolueno	0.838 ± 0.232	0.910

Análisis por línea:

La mediana tuvo un valor más alto y con mayor dispersión en la línea *flare*³ que en la *Oregon-flare*³ (Cuadro 26).

En el ANOVA no se encontraron diferencias significativas (F=0.34, p=0.570) entre líneas.

Cuadro 26. Medidas descriptivas de la emergencia por línea en F1.

Línea	F1	Mediana
<i>flare</i>³	0.8989 ± 0.2852	1.0100
<i>Oregon-flare</i>³	0.8267 ± 0.1933	0.8700

10. DISCUSIÓN

Testigos negativos

- **Agua**

Como se esperaba en este trabajo no se encontró ningún efecto del testigo negativo agua ni en la emergencia, ni sobre los parámetros reproductivos evaluados.

- **DMSO**

El DMSO es utilizado frecuentemente como solvente en estudios toxicológicos (Hallare *et al.*, 2004; Turan *et al.*, 2008), también se ha reportado que en ovocitos de *D. melanogaster* no causa ninguna clase de mutación al 2% (Traut, 1983) por lo que puede ser considerado un buen solvente en estudios de mutagénesis; sin embargo, en éste trabajo presentó mayor variación en algunos parámetros reproductivos, tales como fertilidad y desempeño reproductivo, asimismo se observaron alteraciones significativas en la fecundidad total, las cuales podrían estar relacionadas en cierta medida con un posible efecto citotóxico, tal y como lo reportaron Nazir y colaboradores (2003) quienes trabajaron con DMSO y encontraron que éste compuesto al 0.5% produjo alteraciones en el desarrollo y desempeño reproductivo en larvas de *D. melanogaster*, lo cual fue vinculado a un aumento en la expresión de *Hsp 70* (indicador de respuesta celular al estrés) en algunos tejidos; ese posible efecto también podría estar relacionado con la alteración en la proporción sexual observada, donde los machos tuvieron una proporción menor que las hembras, mientras que normalmente dicha proporción es 1:1 entre ambos sexos en testigos negativos, como se pudo confirmar con el testigo agua.

Testigo positivo: Tolueno

El tolueno es utilizado en la elaboración de combustibles para automóviles y aviones; como disolvente de pinturas, barnices, hules, gomas, ceras, aceites y resinas, entre otros. También se utiliza como materia prima en la elaboración de una gran variedad de productos como benceno, ácido benzoico, fenol, benzaldehído, explosivos (TNT), colorantes, productos farmacéuticos (por ejemplo, aspirina), adhesivos, detergentes, sacarinas, saborizantes y perfumes (Hoja de seguridad tolueno).

En este trabajo, éste compuesto afectó el ciclo de vida de *D. melanogaster* retrasando la emergencia de los imagos de 24 a 48h, alteró la proporción sexual y tuvo efecto en la fecundidad total. Dicho retraso ya había reportado por Singh y colaboradores (2009); se argumentó que el tiempo de demora en la emergencia indica que el desarrollo de los organismos fue afectado, lo cual puede ser debido a un aumento de ROS, puesto que al generarse en gran cantidad, pueden inducir apoptosis como ha sido demostrado en células tubulares de la línea LLC-PK1 a la concentración de 1mM, en las que además mostró causar citotoxicidad, fragmentación del DNA y reducción de viabilidad celular (Saeed *et al.*, 2004); el tolueno también ha sido relacionado con apoptosis en células de leucemia (Sarma *et al.*, 2011) y con el incremento de marcadores apoptóticos en diversos órganos de ratas (El-Nabi Kamel y Shehata, 2008).

Por otro lado, se ha demostrado que el tolueno a concentraciones entre 1-100 mM aumenta la actividad de CYP450s en larvas de *D. melanogaster* (Singh *et al.*, 2011), lo cual concuerda con los resultados del presente trabajo, ya que el tratamiento con tolueno también tuvo efectos en la fertilidad donde mostró diferencias entre la línea Oregon-*flare*³ y *flare*³. Debido a que el tolueno tuvo mayor afecto sobre la fertilidad de la línea *flare*³, se puede asumir que algunas isoformas de

CYP450s ayudan a la desintoxicación del tolueno, lo que coincide con lo descrito por Nakajima y colaboradores quienes en 1997 investigaron el metabolismo de tolueno en microsomas de hígado humano y encontraron que el tolueno puede ser metabolizado por algunas isoformas de CYP450s, principalmente CYP2E1, a benzil alcohol y este a su vez es convertido en ácido benzoico que es eliminado en la orina.

En resumen, es un hecho que el tolueno es un compuesto que afecta el desarrollo de *D. melanogaster* y se podría explicar, con reservas, que la actividad de CYP450s es importante para su metabolismo y efecto tóxico. Sin embargo, hacen falta más estudios para conocer específicamente su vía metabólica en insectos para poder hacer inferencias al respecto.

H₂O₂

Éste compuesto es utilizado en numerosos productos de uso cotidiano (ver Introducción) y ha sido usado con anterioridad como testigo oxidante (Hernández, 2012); también se ha reportado en varios trabajos como inductor de toxicidad en *D. melanogaster* (Le Bourg, 2007; Kawai y Furukawa., 1995; Furukawa *et al.*, 1993; Courgeon *et al.*, 1988) a pesar de esto, en éste trabajo se confirma por primera vez la toxicidad del compuesto en dicha especie. Además usar dos líneas de *D. melanogaster* que difieren en cuanto a la expresión de CYP450s, permite determinar que para matar a un 50 % de la población se requiere mayor concentración de H₂O₂ en la línea Oregon-*flare*³, entonces se puede deducir que estas enzimas participan en la desintoxicación de H₂O₂.

La concentración utilizada en este estudio para medir parámetros reproductivos, es una concentración establecida a partir de la CL₅₀ obtenida y que además se ha trabajado con anterioridad en el Laboratorio de Genética Toxicológica debido a que resulta ser subtóxica para *D. melanogaster*, lo que es conveniente para recuperar el número mínimo requerido estadísticamente de organismos tratados.

Se observó que el tratamiento con H_2O_2 produjo una alteración en el ciclo de vida de *D. melanogaster* lo cual se vio reflejado en el retraso de 24 a 48h en la emergencia de los imágos procedentes de larvas tratadas; también se observó alteración en la proporción sexual, afectando mayormente a los machos. Estas alteraciones se podrían atribuir a la producción excesiva de ROS por parte del tratamiento, ya que el H_2O_2 no solo es un generador de ROS, además el mismo es clasificado como una ROS y un productor de radicales libres, lo que conlleva a una alteración de la función celular (Halliwell y Gutteridge, 2007). Asimismo, se ha demostrado que el aumento de éstas especies ha sido relacionado con enfermedades que pueden afectar la reproducción y fertilidad en humanos (Agarwal y Allamaneni, 2004); algunos trabajos afirman que bajo diferentes condiciones de estrés la producción de ROS aumenta y tanto el desarrollo como la emergencia son alterados, por ejemplo, en un estudio realizado en 1994, la fertilidad en *D. melanogaster* fue modificada bajo condiciones de estrés calórico y la sobrevivencia resulto afectada con una disminución en un 44% en comparación con el testigo negativo (Krebs y Loeschcke, 1994).

La eliminación de tejidos dañados por medio de apoptosis o muerte celular programada es un mecanismo de defensa celular vinculado con éste compuesto, que sucede cuando la célula ha acumulado mucho daño (Siu *et al.*, 2009). Numerosos artículos muestran la relación del H_2O_2 con la apoptosis argumentando que las células usualmente se someten a ésta, cuando son expuestas a altos niveles de ROS, asimismo pueden entrar en estado de senescencia cuando el nivel de ROS es subletal. La senescencia celular hace referencia a un estado en el que las células pierden la capacidad de división debido a la detención del ciclo celular, lo cual es irreversible. De acuerdo con esto, un estudio elaborado en 2010 por Guo y colaboradores, reportó que la citotoxicidad causada por el H_2O_2 en células madre de ratón inhibe la adhesión y proliferación celular; cabe destacar que la anti-adhesión es el evento que precede a la

apoptosis y a la detención del ciclo celular. Asimismo se ha confirmado que el H_2O_2 altera la división celular en algunas líneas de linfocitos mediante efectos citotóxicos o apoptóticos (Barbouti *et al.*, 2002). Por otro lado, en fibroblastos de pulmón de hámster chino, se observó que bajas concentraciones de H_2O_2 ($<10\mu M$) estimulan la proliferación celular, concentraciones intermedias ($\sim 150\mu M$) causan senescencia y altos niveles ($>400\mu M$) inducen apoptosis rápidamente (Kim *et al.*, 2001). Resultados similares también han sido reportados en células musculares lisas (Tanivama *et al.*, 2003). En otro estudio realizado en miotubos, el H_2O_2 también provocó apoptosis, lo que fue evidente al encontrar fragmentación del DNA (Siu *et al.*, 2009).

Por lo anterior, se propone la apoptosis como posible explicación a lo ocurrido en los experimentos realizados, debido a que la concentración utilizada en este trabajo pudo generar un gran daño en las células, y estas pudieron entrar en apoptosis para así impedir que se replicaran las células dañadas.

Por otro lado, en éste trabajo los parámetros reproductivos medidos en P0 no fueron alterados por tal compuesto, contradiciendo aparentemente los estudios antes mencionados.

La falta de alteraciones en los parámetros reproductivos, podría deberse a que el modelo fue evaluado *in vivo*, lo que implica que existen mecanismos de reparación y de defensa celular, tales como la activación de enzimas antioxidantes que impiden o reducen la generación de ROS o reparan el daño por H_2O_2 , como son la catalasa, peroxidasa, superóxido dismutasa (SOD) y glutatión reductasa, que de acuerdo a lo que se ha reportado con anterioridad, son inducidas por este compuesto y además son marcadores de estrés oxidativo (Halliwell y Gutteridge, 2007). Ejemplos de esto, son los trabajos de Furukawa *et al.* (1993) y Kawai y Furukawa (1995) quienes realizaron la prueba SMART en ala de *D. melanogaster* y confirmaron que si bien el H_2O_2 no mostró un efecto

genotóxico, al medir la actividad enzimática de la catalasa observaron que los tratamientos con H_2O_2 presentaban mayor actividad que los testigos, lo que probablemente protegió del daño a los organismos, enmascarando el efecto real que el compuesto tiene sobre el DNA. Lo mismo pudo haber ocurrido en éste proyecto, donde el efecto tóxico pudo enmascarse por la respuesta celular al estrés del organismo.

11. CONCLUSIONES

- El DMSO no es una buena opción como solvente en estudios relacionados con la evaluación de parámetros reproductivos de *D. melanogaster*.
- Se confirmó que el tolueno es un compuesto que afecta el desarrollo de *D. melanogaster* y la actividad de CYP450s es importante para su metabolismo y eliminación.
- A la concentración utilizada, el H₂O₂ no afecta las células germinales de *D. melanogaster*, sin embargo altera la proporción sexual y el ciclo de vida de los organismos debido a la posible inducción de estrés oxidativo, que posteriormente pudo provocar un efecto apoptótico.
- El efecto del H₂O₂ en el ciclo de vida no traspasa generaciones como se observó en F1.

12. RECOMENDACIONES

- Es necesario hacer pruebas que reflejen el daño citotóxico a distintas concentraciones con DMSO, para conocer a detalle los efectos que puede ocasionar en *D. melanogaster* y si este compuesto puede seguir siendo considerado un buen solvente y testigo negativo como se ha manejado hasta ahora.
- Realizar estudios sobre la vía metabólica del tolueno por parte de CYP450s en *D. melanogaster*.
- Elaborar pruebas que confirmen el estado de estrés oxidativo inducido por el H₂O₂ a las concentraciones utilizadas, por medio de la cuantificación de actividad enzimática como catalasa o peroxidasa a fin de conocer el efecto específico que tienen estos sistemas de reparación antioxidante sobre el compuesto en *D. melanogaster*.
- Evaluar concentraciones menores de H₂O₂ con la finalidad de observar el posible efecto enmascarado en la apoptosis del compuesto.
- Realizar pruebas que confirmen que la apoptosis fue la vía tomada por las células a modo de defensa por medio de la detección de marcadores apoptóticos tales como la fragmentación del DNA o activación de caspasa 3 y 9.

13. LITERATURA CITADA.

- ✓ 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. 51pp.
- ✓ Agarwal, A. y Allamaneni, S. S. 2004. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reprod Biomed.* 9:338–347.
- ✓ Ashok, A., Sajala, G. y Sureshb, S. 2006. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 18(3): 325-332
- ✓ Avello, M. y Suwalsky, M. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea.* 494: 161-172.
- ✓ Ayed-Boussema, I., Zouhour, O., Bacha, H. y Abid, S. 2007. Toxicities induced in cultured cells exposed to zearalenone: Apoptosis or mutagenesis? *J. Biochem Mol Toxicol.* 21(3): 136-144.
- ✓ Bain, N. T, Madan, P. y Betts, D. H. 2011. The early embryo response to intracellular reactive oxygen species is developmentally regulated. *Reprod Fertil Dev.* 23(4):561-75.
- ✓ Baldry, M.G.C. 1983. The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *J Appl Microbiol.* 54 (3): 417–423.
- ✓ Barbouti, A., Doulias, P. T., Nousis, L., Tenopoulou, M., y Galaris, D. 2002. DNA damage and apoptosis in hydrogen peroxide-exposed jurkat cells: bolus addition versus continuous generation of H₂O₂. *Free Radical Biol Med.* 33 (5): 691–702.

- ✓ Benaiges, A. 2007. Tintes capilares. Evolución histórica y situación actual. *OFFARM*. 26 (10): 68-72.
- ✓ Bird, M. G., Wetmore, B. A., Letinski, D. J., Nicolich, M., Chen, M., Schnatter, A. R. y Whitman, F. T. 2010. Influence of toluene co-exposure on the metabolism and genotoxicity of benzene in mice using continuous and intermittent exposures. *Chem Biol Interact*. 184 (1-2):233-239.
- ✓ Botas, J. 2007. *Drosophila*, researches focus on human disease. *Nat Gen*. 39: 589-591.
- ✓ Castañeda P., L., Heres P., M. y Dueñas G., I. E. 2008. *Drosophila melanogaster*. Un modelo experimental. México, UNAM. 5-7 pp.
- ✓ Castañeda, L., Muñoz, E., Durán, A., Heres, E. y Dueñas, I. 2001. LD50 in *Drosophila melanogaster* fed on lead nitrate and lead acetate. *DIS*. 78: 160.
- ✓ Courgeon, A.M., Rollet, E., Becker, J., Maisonhaute, C. y Best-Belpomme, M. 1988. Hydrogen peroxide (H₂O₂) induces actin and some heat-shock proteins in *Drosophila* cells. *Eur. J. Biochem*. 171:163-170
- ✓ Cui, M. S., Wang, X. L., Tang, D. W., Zhang, J., Liu, Y., Zeng, S. M. 2011. Acetylation of H4K12 in porcine oocytes during in vitro aging: potential role of ooplasmic reactive oxygen species. *Theriogenology*. 75 (4): 638-46.
- ✓ Demerec, M. y Kaufmann, B.P. 1975. Guía de *Drosophila*. Introducción a la Genética y Citología de *Drosophila melanogaster*. 7ª ed. México, D.F. Instituto Nacional de Energía Nuclear. (Original en inglés 1961).
- ✓ Dueñas G., I.E. 2002. Efecto mutagénico y recombinogénico de la P-fenilenediamina mediante la prueba de mutación somática en

alas de *Drosophila melanogaster* cruzas E y AB. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. 79 pp.

- ✓ Dueñas G., I. E., Heres P., M.E., Castañeda P., L. y Graf, U. 2001. Easy raising of *Drosophila melanogaster* on a medium consisting of mashed potato flakes and a preservative production. *DIS*. 88:166.
- ✓ El-Nabi Kamel, M. A. y Shehata, M. 2008. Effect of toluene exposure on the antioxidant status and apoptotic pathway in organs of the rat. *Br J Biomed Sci*. 65(2):75-9.
- ✓ Espinoza-Navarro, O., Rodríguez, H., Rodríguez, M., Silva, E. y Luque, A. 2009. Alteración de los patrones reproductivos en *Drosophila melanogaster* por efectos de altas concentraciones de Boro en un medio de cultivo *in vitro*. *Int J Morphol*. 27(3):765-770.
- ✓ Fortunato, J. J., Feier, G., Vitali, A. M., Petronilho, F. C. y Dal-Pizzol, J. Quevedo. 2006. Malathion-induced oxidative stress in rat brain regions. *Neurochem Res*. 31: 671–678.
- ✓ Frölich, A. y Würgler, F. E 1989. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. *Mut Res*. 216 (3): 179-187.
- ✓ Furukawa, H., Kawai, K. y Miyazawa, T. 1993. Low-level chemiluminescence from *Drosophila melanogaster* fed with hydrogen peroxide. *Mut Res*. 292 (3): 263-264.
- ✓ Gayathri, M. V. y Krishnamurthy, N.B., 1981. Studies on the toxicity of mercurial fungicide Agallol3 in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Res*. 24: 89–95.
- ✓ Graf, U., Würgler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B. y Kale, P. G. 1984. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Env. Mut*. 6: 153-188.
- ✓ Grover, D., Ford, D., Brown, C., Hoe, N., Erdem, A., Hoe, N., Tavaré, S. y Tower, J. 2009. Hydrogen Peroxide Stimulates Activity

and Alters Behavior in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* 4 (10): e7580. doi:10.1371/journal.pone.0007580.

- ✓ Guo, Y., Chakraborty, S., Rajan, S. S., Wang, R. y Huang, F. 2010. Effects of oxidative stress on mouse embryonic stem cell proliferation, apoptosis, senescence and self-renewal. *Stem Cells Dev.* 19 (9): 1321-1331.
- ✓ Gupta, S., Choi, A., Yu, H.Y., Czerniak, S.M., Holick, E.A., Paoletta, L.J., Agarwal, A., y Combelles, C.M. 2011. Fluctuations in total antioxidant capacity, catalase activity and hydrogen peroxide levels of follicular fluid during bovine folliculogenesis. *Reprod Fertil Dev.* 23 (5): 673-80.
- ✓ Hallare, A.V., Köhler, H.R y Triebkorn, R. 2004. Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO. *Chemosphere.* 56 (7): 659-66.
- ✓ Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C. 2007. *Free radicals in biology and medicine.* 4th ed. Oxford University Press. 851 pp.
- ✓ Heres P., M. E., Dueñas G., I. E. y Castañeda P., M. L. 2006. Estudios de toxicidad y genotoxicidad con *D. melanogaster* en la FES Iztacala de la UNAM. En Pimentel, P. A. E., Ortiz, M. A. R. y Breña, V. M. Tópicos de Genética. (367- 387). Dirección de Difusión y Promoción de Investigación y los Estudios Avanzados. México.
- ✓ Hernández, G. A. 2012. Efecto del licopeno ante el uretano y el peróxido de hidrógeno en SMART en ala de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. FES Iztacala, UNAM 50pp.
- ✓ Herrera B., J. J. 2005. Efecto de concentraciones bajas de talidomida en la fertilidad de moscas (*Drosophila melanogaster*) expuestas durante el desarrollo larvario. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.

- ✓ UNAM, hoja de seguridad tolueno. Disponible en <http://www.quimica.unam.mx/IMG/pdf/17tolueno.pdf>. Consultado:20/04/12.
- ✓ Kawai, K. y Furukawa, H. 1995. Oxidative damage of *Drosophila melanogaster* fed with hydrogen peroxide. *Mut Res.* 334 (3): 385-427.
- ✓ Kim, B. Y., Han, M. J. y Chung, A. S. 2001. Effects of reactive oxygen species on proliferation of Chinese hamster lung fibroblast (V79) cells. *Free Radic Biol Med.* 30: 686-698.
- ✓ Krebs, R. A. y Loeschcke, V. 1994. Effects of exposure to short-term heat stress on fitness components in *Drosophila melanogaster*. *J Evol Biol.* 7: 39-49.
- ✓ Le Bourg, E. 2007. Hormetic effects on longevity of hydrogen peroxide in *Drosophila melanogaster* flies living on a poorly nutritious medium. *Biogerontology.* 8: 327–344
- ✓ Le Galliard, J.F., Massot, M., Landys, M.M y Meyland, S. 2006. Ontogenic sources of variation in sexual size dimorphism in a viviparous lizard. *J Evol Biol.* 19: 690-704.
- ✓ Lindsley, D .L. y Zimm G. G. 1992. The genome of *Drosophila*. Academic Press Inc. USA. 1132 pp.
- ✓ Lopes, S., Jurisicova, A., Sun, J. G. y Casper, R. F. 1998. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 13 (4): 896-900.
- ✓ Maeda, H. 2009. Controlling oxidative stress: therapeutic and delivery strategies. *Ad Drug Delivery Rev.* 61: 285-286.
- ✓ Mencías R. E. y Mayero-Franco, L. M. 2000. *Manual de toxicología básica*. Ediciones Madrid, Díez de Santos, 311-313 pp.
- ✓ Mendoza P., N. 2008. *Farmacología médica*. Editorial Médica Panamericana. 756 pp.

- ✓ Mitchell, I. y Combes, R. 1984. Mutation test with the fruit fly *Drosophila melanogaster*. Incluido en Mutagenicity testing: a practical approach. Edited by S. Venitt, J. M. Parry I. R. Press, UK, p.149-155.
- ✓ Montero, M. 1996. Los radicales libres y las defensas antioxidantes. Anales de la Facultad de Medicina. (57) 4: 1-6.
- ✓ Nakajima T., Wang, R., Elovaara, E., González, F., Gelboin, V., Raunio, H., Pelkonen, O., Vainiot, H., and Aoyamd, T. 1997. Toluene metabolism by cDNA-expressed human hepatic cytochrome P450. Biochem. Pharmacol. 53: 271-277.
- ✓ Nazir, A., Mukhopadhyay, I., Saxena, D. K. y Chowdhuri, D .K. 2003. Evaluation of the No Observed Adverse Effect Level of Solvent Dimethyl Sulfoxide in *Drosophila melanogaster*. *Toxicol Mech Methods*.13 (2): 147-52.
- ✓ Nazir, A. Mukhopadhyay, I. Saxena, D.K. y Kar Chowdhuri, D. 2001. Chlorpyrifos-Induced *hsp70* Expression and Effect on Reproductive Performance in Transgenic *Drosophila melanogaster* (*hsp70-lacZ*) Bg. *Earth Environ Sci*. 4 (41): 443-449
- ✓ Oehninger, S., Blackmore, P., Mahony M. y Hodgen G. 1995. Effects of hydrogen peroxide on human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet*. 12 (1): 41-47.
- ✓ Pandey, A. N., Tripathi, A., Premkumar, K. V., Shrivastav, T. G. y Chaube, S. K. 2010. Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene arrest in mammalian oocytes. *J Cell Biochem*. 11 (3): 521-8.
- ✓ Rico, M. G y L. Ruiz, F., 1990. *Tabaquismo. Repercusión en aparatos y sistemas*. España. Ed. Trillas 72-77pp.

- ✓ Saeed, S., Al-Ghamdi, Raftery, M. J. y Yaqoob. M. M. 2004. Toluene and *p*-Xylene Induced LLC-PK1 Apoptosis. *Drug Chem Toxicol.* 27 (4): 425-432.
- ✓ Sarma, S. N., Kim, Y. J., Song, M. y Ryu, J.C. 2011. Induction of apoptosis in human leukemia cells through the production of reactive oxygen species and activation of HMOX1 and Noxa by benzene, toluene, and o-xylene. *Toxicol.* 280 (3): 109-17.
- ✓ Silbergeld, E. K. Toxicología. En Stellman, J. M. 2001. *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo.* 3ª ed. España. O.I.T. Vol. 1 pp. 33.2-33.76.
- ✓ Singh, M. P., Mishra, M., Sharma, A., Shukla, A. K., Mudiam, M. K., Patel, D. K., Ram, K. R., y Chowdhuri, D. K. 2011. Genotoxicity and apoptosis in *Drosophila melanogaster* exposed to benzene, toluene and xylene: attenuation by quercetin and curcumin. *Toxicol Appl Pharmacol.* 253 (1): 14-30.
- ✓ Singh, M. P. Reddy, M. M. Mathur, N., Saxena, D.K., Kar Chowdhuri D. 2009. Induction of hsp70, hsp60, hsp83 and hsp26 and oxidative stress markers in benzene, toluene and xylene exposed *Drosophila melanogaster*: Role of ROS generation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 235: 226–243.
- ✓ Siu, P. M., Wang, Y. y Always, S. E. 2009. Apoptotic signaling induced by H₂O₂-mediated oxidative stress in differentiated C2C12 myotubes. *Life Sci.* 84 (13-14): 468-481.
- ✓ Spanó, M. A., y U. Graf. 1998. Segundo taller sobre SMART: un método para detectar las actividades mutagénica y recombinogénica en células somáticas de *Drosophila* en la Universidad Federal de Uberlandia, Brasil. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 14 (2): 111-114.

- ✓ Taniyama, Y. y Griending, K. K. 2003. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanism. *J. Hypertens.* 42: 1075-1081.
- ✓ Traut, H. 1983. The solvent dimethylsulfoxide (DMSO) does not induce aneuploidy in oocytes of *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen.* 5 (3): 273-7.
- ✓ Turan, N.N, Akar, F., Budak, B., Seren, M., Parlar, Al., Sürücü, S. y Ulus, A.T. 2008. How DMSO, a widely used solvent, affects spinal cord injury. *Ann Vasc Surg.* 22 (1): 98-105.
- ✓ Velázquez P., M., Prieto G., B., y Contreras P., R. 2004. El envejecimiento y los radicales libres. *Ciencias.* 75: 36-43.
- ✓ Watt, Bh. E., Proudfoot, A. T. y Vale, J. A. 2004. Hydrogen Peroxide Poisoning. *Toxicol Rev.* 23 (1): 51-57.
- ✓ Zapata L., Gerard, L., Davies, C., y Schwab, M. 2007. Estudio de componentes antioxidantes y actividad antioxidante en tomates. *Ciencia, docencia y tecnología.* 18 (35): 175-193.

14. ANEXOS

14.1. Dimorfismo sexual

El conjunto de características morfológicas (coloración, tamaño, forma, presencia o ausencia de estructuras) que permiten distinguir entre hembras y machos de una misma especie constituyen el dimorfismo sexual. Éstas se presentan en mayor o menor grado en los adultos de la mayoría de las especies (Le Galliard *et al.*, 2006).

En gran cantidad de especies de insectos las hembras son más grandes que los machos, lo cual sucede en las moscas hembra y macho de la especie *D. melanogaster*, que pueden distinguirse entre sí por diversas vías (Figura 14).

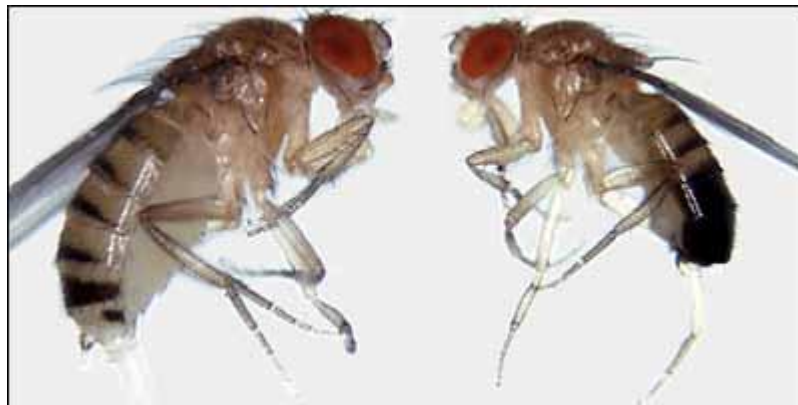


Fig. 14. Hembra (izq.) y macho (der.) de D. melanogaster
(Tomado de <http://www.topnews.in/usa/study-could-lead-new-ways-curtailling-reproduction-harmful-insects-27996>).

El extremo del abdomen es alargado en la hembra y redondeado en el macho. En muchas líneas incluyendo la silvestre, las bandas oscuras de los segmentos abdominales son lo suficientemente diferentes para hacer la distinción de los dos sexos y permitir su separación sobre estas bases. El abdomen de la hembra tiene siete segmentos que son fácilmente

visibles con bajo aumento, mientras que el abdomen del macho tiene solamente cinco.

El macho es más pequeño y los tres últimos segmentos abdominales están fusionados lo que da una apariencia de una mancha negra en la punta del abdomen (Figura 15).

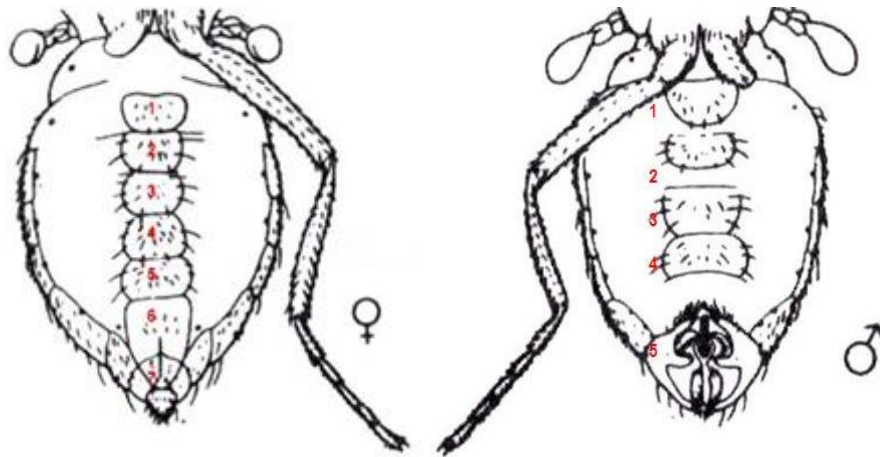
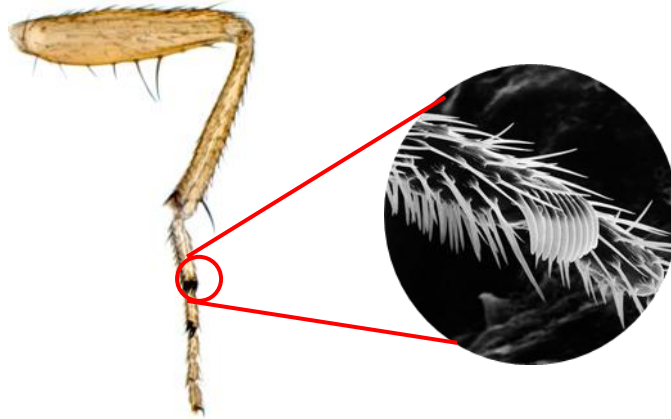


Fig. 15. Segmentos abdominales de hembras (izq) y machos (derecha)
(Tomado de <http://bios10.blogspot.com/2010/08/metodo-cientifico-drosophila.html>).

Tienen el peine sexual que consiste en una fila aproximadamente de diez cerdas gruesas en la superficie distal del segmento tarsal basal (superior) de la pata anterior. En la hembra faltan tales cerdas (Demerec y Kaufmann, 1975) (Ver Figura 16).



*Fig. 16. Pata delantera izquierda del macho donde se muestra peine sexual.
Fotografía en microscopio electrónico de barrido que muestra el peine sexual a
detalle (1000x)*

(Tomadas de

<http://www.cas.vanderbilt.edu/bsci111b/drosophila/supplemental.htm> y

<http://www.sciencephoto.com/media/369526/enlarge>)

14.2. Manejo y eliminación de residuos

Para el manejo adecuado de los residuos químicos se recomienda conocer las hojas de seguridad, a continuación se presenta un resumen de la información mínima necesaria para el manejo adecuado de cada compuesto utilizado para la realización de este trabajo.

DMSO

Efectos potenciales sobre la salud

Inhalación Puede ser nocivo si se inhala. Puede provocar una irritación en el tracto respiratorio.

Ingestión Puede ser nocivo si es tragado.

Piel Puede ser nocivo si es absorbido por la piel. Puede provocar una irritación de la piel.

Ojos Puede provocar una irritación en los ojos.

Tolueno

Efectos potenciales sobre la salud

Inhalación: Exposiciones a niveles mayores de 100 ppm provocan pérdida de coordinación por lo que aumenta la probabilidad de accidentes.

Si las exposiciones son a niveles mayores de 500 ppm, los efectos son narcosis, náusea, dolor de cabeza, adormecimiento y confusión mental.

Ingestión: Causa náusea, vómito y pérdida de la conciencia.

Piel: Causa irritación, resequedad y dermatitis. En algunas personas puede generar sensibilización de la zona afectada. Es absorbido a través de este medio.

Ojos: Causa irritación y quemaduras de cuidado si no se atiende a la víctima inmediatamente.

Niveles de toxicidad:

RQ: 1000

IDLH: 2000ppm

LD₅₀ (en ratones): 5300 ppm.

LD₅₀ (en piel de conejos): 14000 mg/Kg.

LD₅₀ (oral en ratas): 7.53 ml/Kg, 5000 mg/ Kg.

LDLo (oral en humanos): 50 mg/Kg.

LC₅₀ (por inhalación en ratones): 5320 ppm/8 h

Niveles de irritación a ojos: 300 ppm (humanos); 0.87 mg, leve y 2 mg/24 h, severa (conejos).

Niveles de irritación a piel de conejos: 435 mg, leve; 500 mg, moderada

H₂O₂

Efectos potenciales sobre la salud

Inhalación Puede ser nocivo si se inhala. El material es extremadamente destructivo para los tejidos de las membranas mucosas y las vías respiratorias superiores.

Ingestión Tóxico si se ingiere.

Piel Puede ser nocivo si es absorbido por la piel. Provoca quemaduras en la piel.

Ojos Provoca quemaduras en los ojos.

Manejo: En todos los casos fue necesario utilizar bata de algodón, guantes de látex y máscara contra gases como medida de seguridad personal. Además de realizar los experimentos bajo en una campana de extracción.

Procedimiento de eliminación de residuos

La eliminación de residuos de cualquier compuesto utilizado fue hecha en base a las normas establecidas en materia de Bioseguridad. En este caso se utilizó el procedimiento de neutralización: en un recipiente con agua de grifo, se disolvieron perlas de NaOH (hidróxido de sodio) con el fin de obtener un medio básico. Posteriormente se colocaron en éste medio, tanto los restos de las soluciones preparadas como el material en el cual se llevaron a cabo. Después de 72 h, dicho material fue transferido a detergente líquido para lavado manual (Extran MA 02 MERCK) libre de minerales, donde permaneció el mismo periodo de tiempo. Finalmente el medio fue neutralizado con HNO₃ (ácido nítrico) para poder desecharlo y el material fue lavado y esterilizado para su posterior uso.