



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Caracterización de la fecundidad como un marcador  
de resistencia en la respuesta genotóxica inducida por  
el uretano en *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:

NAYELLI MARICRUZ MEZA GONZÁLEZ



DIRECTOR DE TESIS:  
DOCTORA PATRICIA RAMOS MORALES  
2015

Ciudad Universitaria, D. F.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

1. Datos del alumno

Meza

González

Nayelli Maricruz

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

305080675

2. Datos del tutor

Dra.

Patricia

Ramos

Morales

3.-Datos del sinodal 1

Dra.

Regina Dorinda

Montero

Montoya

4.- Datos del sinodal 2

M. en C.

Alfonso José

Vilchis

Peluyera

5.-Datos del sinodal 3

Dr.

Rodolfo Omar

Arellano

Aguilar

6.-Datos de sinodal 4

Biól.

Blanca Rosa

Hernández

Bernal

7.-Datos del trabajo escrito

Caracterización de la fecundidad como un marcador de resistencia en la respuesta genotóxica inducida por el uretano en *Drosophila melanogaster*

85pp.

2015

## **DEDICATORIA**

### **A mis padres:**

*Cruz Meza Martínez  
Juana González Medina*

*Gracias por ser mis maestros que han dedicado su vida a transmitirme sus enseñanzas y sabiduría con la que he llegado hasta aquí. Gracias papá y mamá por darme su amor, cariño, apoyo, comprensión y sobre todo por ser la esencia de todos mis triunfos.*

### **A mis hermanas:**

*Mary Sharon Meza González  
Gabriela Pamela Meza González*

*Gracias por apoyarme y por estar conmigo siempre.*

### **A Miguel Ramírez Martínez**

*Gracias por tu paciencia y comprensión, por estar siempre a mi lado en cada momento, pero sobre todo por tu gran apoyo para seguir adelante, enseñándome a siempre dar lo mejor de mí.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A la Dra. Patrica Ramos Morales por las enseñanzas y todas las experiencias compartidas, por su gran apoyo, confianza y motivación. Muchas gracias por ser parte de mi formación profesional y por mostrarme el maravilloso mundo de la genética, así como tu forma tan linda y especial de enseñarme, que con esfuerzo y dedicación se pueden lograr grandes proyectos.*

*A la Dra. Adriana Muñoz, a la Biól. Blanca Hernández, al Biól. Hugo Rivas, por su gran ayuda y apoyo en cada momento, por sus enseñanzas, confianza y sobre todo su amistad que me brindaron siempre, muchas gracias.*

*A mis sinodales la Dra. Regina Montero, al M. en C. Alfonso Vilchis, al Dr. Omar Arellano y a la Biól. Blanca Hernández, por su apoyo, tiempo y la atención que me brindaron.*

*A mis compañeras y amigas del laboratorio que me apoyaron, y siempre estuvieron dándome ánimos, ayudándome desde el inicio, compartiendo muchos momentos y experiencias de desesperación, estrés, diversión y risas: Mariana Cavita, Abril Cristino, Estefanía García, Estefanía Arroyo, Yaneli Trujillo, Mayra Castillo, muchas gracias chicas.*

*Y por supuesto agradezco infinitamente a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por mi formación profesional.*



**Este proyecto fue realizado en el Laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental de la Facultad de Ciencias de la UNAM.**



Laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental

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



## INDICE

### RESUMEN

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
1.1. Toxicología Genética.....	10
1.2. Biomarcadores.....	11
1.2.1. Clasificación de los biomarcadores.....	12
1.2.2. Evaluación de los biomarcadores.....	14
1.2.3. Marcadores de daño reprotóxico.....	16
1.3. Uso de mutágenos para calibrar biomarcadores.....	16
1.3.1. Uretano (Etil carbamato).....	17
1.3.2. Usos.....	19
1.3.3. Metabolismo.....	20
1.4. <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo biológico.....	22
1.4.1. Generalidades.....	24
1.4.2. Fecundidad.....	24
1.4.3. Discos imagales.....	25
1.5. Inducción de Mutación Somática y Recombinación Mitótica (SMART).....	27
<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>30</b>
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>30</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
4.1 General.....	30
4.2 Particulares.....	31
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
5.1. Reactivos o sustancias.....	32
5.2. Cepas de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	32
5.3. Selección de cepas.....	33
5.4. Obtención de larvas.....	35
5.5. Tratamiento.....	35
5.6. Cepas no seleccionadas.....	37

5.6.1. Selección de concentraciones de uretano.....	37
5.7. Cepas seleccionadas.....	37
5.7.1. Progenie de moscas libres de inversiones (LI) y portadoras de inversiones (PI).....	37
5.8. Fijación y preparación de laminillas.....	41
5.9. Criterios de registro.....	41
5.10. Análisis estadístico.....	41
5.10.1. Índice de Supervivencia y Proporción Sexual.....	41
5.10.2. Frecuencia de Mutación Somática y Recombinación mitótica.....	42
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
6.1. Selección de cepas.....	44
6.2. Curva de concentración-efecto del uretano en cepas no seleccionadas.....	46
6.2.1. Índice de Supervivencia y Proporción Sexual.....	46
6.2.2. Inducción de mutación somática y recombinación mitótica.....	52
6.2.3. Selección de concentraciones de uretano.....	52
6.3. Genotoxicidad del uretano en cepas seleccionadas.....	57
6.3.1. Índice de Supervivencia y Proporción Sexual.....	57
6.3.2. Inducción de Mutación Somática y Recombinación Mitótica en cepas seleccionadas para alta y baja fecundidad (+ y -).....	59
6.4. Comparación de frecuencia de manchas totales inducidas por el uretano en cepas seleccionadas y no seleccionadas.....	64
6.5. Progenie de moscas libres de inversiones (LI) y portadoras de inversiones (PI).....	65
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>70</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>77</b>
<b>9. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>78</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>79</b>

## RESUMEN

*Drosophila melanogaster* es un organismo modelo que se ha utilizado para la evaluación de los efectos producidos por la exposición a genotóxicos. Las características de susceptibilidad y la resistencia ante la presión ambiental en sus poblaciones puede ser una estrategia para establecer una respuesta específica que incluye los aspectos genéticos y la intensidad de la exposición a un compuesto. La utilización de herramientas como los biomarcadores para conocer la respuesta inducida por factores ambientales en los sistemas biológicos permite avanzar en el conocimiento de los posibles riesgos, además de identificar factores que pueden ser clave en el comportamiento de diferentes niveles de organización ante una presión ambiental.

En este trabajo se tiene como objetivo determinar la respuesta de un organismo modelo como *Drosophila melanogaster* ante una presión ambiental como la exposición a un compuesto tóxico como el *uretano* en dos biomarcadores de diferente nivel de organización: fecundidad y frecuencia de mutación somática y recombinación mitótica en células de las alas. Se seleccionaron, de acuerdo con su progenie las cepas con los marcadores genéticos: *flr<sup>3</sup>* y *mwh* que son la base para la realización de la Prueba de Mutación Somática y Recombinación Mitótica (SMART).

Utilizando cepas no seleccionadas se obtuvo una curva de concentración-efecto del *uretano* para obtener una serie de concentraciones que permitieran la segunda parte del estudio. Así, con una selección disruptiva con base en la fecundidad se obtuvieron cepas seleccionadas de (+) y (-) fecundidad, las cuales fueron expuestas a *uretano* para obtener diferentes indicadores como Índice de Supervivencia, Proporción Sexual e Inducción de Mutación Somática y Recombinación Mitótica que permitieran la determinación de una respuesta, determinando además el mantenimiento de la capacidad reproductiva en los organismos una vez expuestos al compuesto.

La selección de organismos por su fecundidad permitió identificar una respuesta diferente en cada una de las cepas seleccionadas mostrando una frecuencia de mutación que determinó que entre estos dos marcadores biológicos podría existir una relación de forma directa, mostrando que en los organismos con baja fecundidad la frecuencia de

mutación somática y recombinación mitótica fue mayor que la de moscas con alta fecundidad; por lo anterior la respuesta de los organismos en relación a su capacidad reproductiva como puede ser la fecundidad podría ser un posible biomarcador a nivel población, representando un punto clave en la detección de la respuesta de los sistemas biológicos ante una presión ambiental lo que permitiría desarrollar biomarcadores alternativos en otros niveles de organización, así como un complemento importante para los estudios en toxicología.

## **1. INTRODUCCIÓN**

El estudio de la respuesta de los organismos ante la exposición a diferentes tipos de compuestos tóxicos incluye diversos aspectos que van desde las características fisicoquímicas de las sustancias, la forma y duración de la exposición, la susceptibilidad de los organismos, su metabolismo, edad y sexo, entre otros factores que van a dar lugar a una diversidad de respuestas en los individuos de una población.

La toxicología es una disciplina que se encarga del estudio de los efectos que ocasionan sustancias extrañas (xenobióticos) en los organismos, determinando los mecanismos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de los compuestos y evaluando los cambios biológicos causados por las sustancias (OPS, 1980; Peña, *et. al.*, 2001).

En los sistemas biológicos, los mecanismos de biotransformación de los xenobióticos implican la participación de un conjunto de reacciones químicas, mediante las que los compuestos son metabolizados para convertirlos en moléculas polares y que puedan ser solubles en agua para ser excretados fácilmente. Aunque también puede ocurrir que estos cambios deriven en bioactivación, en donde la toxicidad del xenobiótico aumenta por la generación de metabolitos que son más tóxicos que el compuesto original y pueden llegar a tener una actividad genotóxica (Timbrell, 2002; Peña *et. al.*, 2001).

### **1.1. Toxicología Genética**

La toxicología genética estudia la interacción entre los agentes químicos, físicos y biológicos con el ADN (genotóxicos) así como los procesos biológicos asociados con esta interacción y que pueden derivar en cambios reversibles o irreversibles. La relación entre los agentes y las alteraciones genéticas tanto en células germinales como en somáticas, puede llegar a tener efectos hereditarios o congénitos. Aunque algunos de los cambios puedan resultar benéficos para los organismos expuestos, otros pueden ser deletéreos y aún letales (Timbrell, 2002; Klaassen and Watkins, 2005).

Entre las alteraciones que provocan los genotóxicos al interactuar con biomoléculas como los ácidos nucleicos y las proteínas, se encuentran rupturas a la cadena de ADN, cambios a nivel de bases nitrogenadas o la formación de complejos entre los agentes

químicos y el ADN o las proteínas, lo cual interfiere con la organización y expresión de las biomoléculas, ocasionando lesiones que pueden convertirse en eventos de mutagénesis y carcinogénesis. Como parte de la respuesta de genotoxicidad, los mecanismos de reparación reducen gran parte del impacto de los genotóxicos, manteniendo la viabilidad y proliferación de las células, aunque en ocasiones pueden llegar a ser ineficientes y dar lugar a la muerte de las células afectadas (Griffiths, *et. al.*, 2002; Timbrell, 2002).

Las alteraciones en el material genético inducidas por genotóxicos pueden dividirse en tres tipos: 1) No disyunción, que implica errores en la segregación de cromosomas durante la mitosis o la meiosis, ya sea por alteración del aparato del huso o por daño a la región centromérica de los cromosomas lo que genera aneuploidías que se refiere a la adquisición o pérdida de cromosomas completos; 2) Deleción, que consiste en la pérdida o adición de partes de cromosomas; 3) Mutación puntual, que se caracteriza por cambios de una sola base nitrogenada, que puede originar sustitución de una base (transición ó transversión), así como también la pérdida o adición de una o unas cuantas bases, dando lugar al corrimiento del marco de lectura (Timbrell, 2002).

Para establecer el tipo de evento genético terminal que produce determinado genotóxico se utilizan aproximaciones experimentales con la finalidad de determinar las condiciones en las que el compuesto de interés provoca daño al material genético y el tipo de cambio o cambios provocados. Es de fundamental importancia poder traducir el impacto producido en términos cuantitativos para facilitar la evaluación e interpretación del impacto de las exposiciones y utilizar esta información para la toma de decisiones, como sustituir la sustancia por otra menos peligrosa o bien, definir las condiciones de seguridad asociadas a su uso.

## **1.2. Biomarcadores**

Los biomarcadores o también llamados marcadores biológicos son indicadores cuantificables de tipo bioquímico, fisiológico, conductual o morfológico que sirven como herramientas para la evaluación de la exposición a tóxicos en los sistemas biológicos, pues

permiten la determinación de los posibles riesgos de la exposición a contaminantes y los efectos en los organismos (EPA, 2014, Peña, *et. al.*, 2001).

Los marcadores biológicos permiten la evaluación de la presencia de contaminantes en el ambiente, las posibles consecuencias biológicas de la exposición, la identificación de organismos sensibles y resistentes de una población y la determinación del nivel de estudio, ya sea individual o poblacional. Además, la utilización de los biomarcadores da lugar a una serie de ventajas, ya que proporcionan información cuantitativa y permiten detectar de forma rápida los posibles riesgos de la exposición a tóxicos y aumentan la posibilidad de llevar una serie de repeticiones que puedan dar mayor precisión y contribuyen a detectar otros factores que pueden estar relacionados con la exposición (EPA, 2014; Peña, *et. al.*, 2001).

### **1.2.1. Clasificaciones de los biomarcadores**

Existen diferentes clasificaciones de los biomarcadores de acuerdo a su tipo, nivel de organización y especificidad (Peña, *et. al.*, 2001; Arango, 2012; Silbergeld, 2000; IPCS, 1993).

- ✓ **Tipo de biomarcador:** la relación del posible daño por la exposición a los tóxicos incluyendo los marcadores biológicos de:
  - \*Exposición: evalúa cuando la presencia de una sustancia exógena o su metabolito ha interactuado con una molécula como el ADN, las proteínas o una célula diana.
  - \*Efecto: proporcionan información que es registrable, ya que se da una alteración bioquímica y fisiológica debido a que el xenobiótico se encuentra dentro del organismo y se pueden cuantificar las concentraciones de éste, o sus posibles metabolitos por medios biológicos (sangre, orina, pelo, etc.).
  - \*Susceptibilidad: indican una limitación de la capacidad de los organismos para responder por medio de la desintoxicación, excreción o reparación cuando son

expuestos a una sustancia xenobiótica específica (Peña, *et. al.*, 2001; Arango, 2012; Silbergeld, 2000).

Tabla I. Tipos de biomarcadores (Modificado de Arango, 2012).	
TIPO	BIOMARCADOR
<b>Exposición</b>	-Excreción de metabolitos en orina -Aductos de ADN
<b>Efecto</b>	-Recuento de eritrocitos y leucocitos -Niveles de proteína en orina -Marcadores de citotoxicidad
<b>Susceptibilidad</b>	-Polimorfismos genéticos (de enzimas de metabolismo y de reparación)

- ✓ **Nivel de organización:** los marcadores biológicos pueden ser estudiados desde el nivel molecular hasta el más complejo que es el de ecosistema (Evenden and Depledge, 1997; Arellano-Aguilar, 2002).
- ✓ **Especificidad:** por la información que proporcionan y se dividen en (Arellano-Aguilar, 2002):
  - \*No específicos: que constituyen los de mayor jerarquía incluyendo organismo, población, comunidad y ecosistema y pueden detectar los efectos de los contaminantes sobre el ambiente.
  - \*Específicos: basados en moléculas, organelos, células, tejidos, y órganos, y proporcionan mayor información aunque son invasivos y costosos.

Los biomarcadores específicos permiten conocer información más detallada, principalmente los de nivel molecular debido a que se enfocan al conocimiento de la naturaleza de los compuestos, por la manera en que actúan, así como los mecanismos que están implicados en dichos procesos. Además de que informan de los cambios que se producen en la estructura del ADN y proteínas asociadas ocasionados por los genotóxicos,

por lo que los marcadores moleculares detectan de forma anticipada los efectos antes de que se evidencien cambios en niveles de organización superiores como poblaciones, comunidades o ecosistemas (Evenden & Depledge, 1997).

### **1.2.2. Evaluación de los biomarcadores**

La determinación de nuevos marcadores biológicos requiere de una serie de aspectos para su selección, considerando principalmente que sea de fácil manejo para la cuantificación durante la evaluación del estudio. Asimismo, es importante la elección de un organismo para la detección del posible marcador ya sea *in vitro* ó *in vivo* y la relación directa del nivel del marcador con la exposición; y que proporcione repetitividad, reproducibilidad, especificidad y sensibilidad (Peña, *et. al.*, 2001).

En los estudios de toxicología, la utilización de la selección de organismos con determinadas características ha sido importante para explicar cómo la resistencia y la susceptibilidad tienen bases genéticas utilizando la exposición de los organismos a xenobióticos (Islas, 2006). La consideración de ciertas condiciones ambientales como la exposición a contaminantes correlacionada con características de los organismos como marcadores biológicos puede permitir el conocimiento de la magnitud de las posibles respuestas en diferentes niveles de organización biológica (Hoffmann & Sgrò, 2004; Evenden & Depledge, 1997).

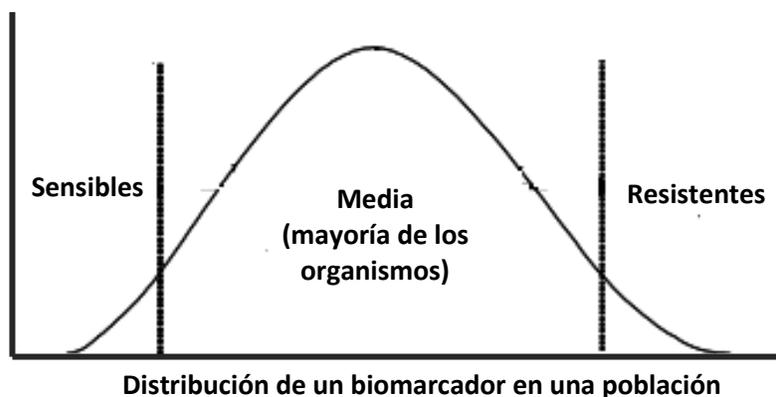
La selección de un biomarcador para genotoxicidad requiere de la determinación de la respuesta de un modelo de estudio no expuesto a genotóxicos, identificando los niveles que presenta el biomarcador en numerosos individuos, dando lugar a una distribución poblacional del biomarcador en reposo que incluirá a todo tipo de organismos: sensibles, medios y resistentes (Fig. 1a). El siguiente paso implica establecer el cambio en los niveles del biomarcador cuando la población es expuesta a factores conocidos por su actividad genotóxica (Fig. 1b).

Posteriormente se pueden seguir diversas estrategias para la aplicación del biomarcador, por ejemplo, seleccionar los niveles de la población media (evitando utilizar niveles extremos superior e inferior de la distribución), con lo cual se robustece el valor

promedio o característico del biomarcador en la población o bien, seleccionar a los individuos extremos para generar subpoblaciones de organismos que son especialmente sensibles en su respuesta, lo que dejará ver de manera más acentuada la forma en la que es afectada la población, ya que se eliminan las respuestas medias que son más numerosas.

Independientemente de la estrategia utilizada, la intención es construir parámetros de comparación para definir la respuesta de los organismos ante factores de presión como pueden ser cambios en la temperatura, la falta de alimento o a la exposición de un tóxico, entre otros (Pérez, 2008).

a)



b)



Fig. 1 Distribución de un biomarcador en una población a) en reposo y b) expuesta a un agente físico, químico o biológico.

### **1.2.3. Marcadores de daño reprotóxico**

La selección artificial, es un proceso en donde se elige un carácter de interés para ser aislado y generar poblaciones que presentan una característica deseable (Griffiths, *et. al.*, 2002). En estudios en donde los organismos son expuestos a factores de presión como compuestos tóxicos, se ha observado que entre los mecanismos que se ven afectados está su capacidad reproductiva, que es esencial para la permanencia de la especie. El desarrollo de marcadores de daño reprotóxico es fundamental, ya que para que los efectos en el material hereditario de los organismos tengan significado biológico, es necesario que los individuos expuestos mantengan la capacidad de reproducirse.

Los diferentes estudios realizados en organismos han mostrado, entre los cambios que afectan principalmente a la capacidad reproductiva, la muerte prematura de los organismos, modificaciones en la edad, la madurez, la capacidad física para aparearse, la fertilidad, la fecundidad así como la viabilidad de las crías, teniendo un amplio rango de complejidad cuando se tratan de estudiar estos cambios en los diferentes niveles de organización como son poblaciones, comunidades y ecosistemas (Evenden & Depledge, 1997; Pérez, 2008).

La evaluación de los marcadores de daño reprotóxico es compleja debido a que se tiene poco conocimiento acerca de la naturaleza y el grado de efectos adversos de las exposiciones a tóxicos en este nivel por lo que se requiere de la utilización de organismos modelo con numerosa progenie, que permitan el seguimiento de varias generaciones, y sobre todo que tengan un costo moderado, además de que los estudios se puedan llevar a cabo en un periodo de corta duración.

### **1.3. Uso de mutágenos para calibrar biomarcadores**

Para iniciar la caracterización de un posible biomarcador se recurre al uso de sustancias con actividad genotóxica probada, de manera que se pueden determinar las diversas respuestas ante diferentes formas e intensidades de la exposición y la forma en la que la respuesta genotóxica es modulada ante los cambios ambientales debido a características de los organismos utilizados, como viabilidad, metabolismo y conducta, que son fáciles de

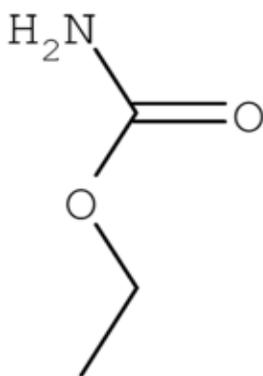
detectar proporcionando una amplia información que permita además la identificación de otros biomarcadores (Butterworth, *et. al.*, 2000).

### 1.3.1. Uretano (Etil Carbamato)

Entre los mutágenos más utilizados por su reactividad con el material hereditario se encuentran los agentes alquilantes, compuestos químicos que reaccionan con el ADN, por la adición de grupos alquilo tales como metil ( $\text{CH}_3^-$ ) y etil ( $\text{CH}_3 - \text{CH}_2^-$ ) en las bases de los nucleótidos, alterando la conformación y la función del ADN. Estos químicos reactivos son electrofílicos y actúan en átomos como el nitrógeno y oxígeno que son nucleofílicos por lo que pueden ser fácilmente alquilados (Klaassen and Watkins, 2005).

Los agentes alquilantes también pueden formar aductos en el ADN, en sitios vulnerables especialmente en la guanina, en  $\text{N}^7$  y  $\text{O}^6$ , aunque también el  $\text{N}^3$  y  $\text{N}^7$  de la adenina. Esto afecta la capacidad de las bases para formar enlaces provocando el apareamiento erróneo de las bases y dando lugar a mutaciones (Timbrell, 2002).

El uretano ó etil carbamato (Fig. 2), es un compuesto genotóxico que actúa como un alquilante y al ser metabolizado da lugar a la formación de aductos. Este compuesto ha sido probado desde hace algunos años en una gran cantidad de especies desde bacterias hasta mamíferos para evaluar la inducción de eventos teratogénicos, mutagénicos y carcinogénicos (IARC, 2010).



#### Uretano

Fórmula:  $\text{NH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$

Peso Molecular: 89.1 g/mol

Estado: sólido en forma de cristales columnares o en gránulos en polvo, incoloro e inodoro

Punto de fusión: 48-50 °C

Fig. 2 Molécula del uretano y sus propiedades (IARC, 2010).

En estudios experimentales en ratones, ratas y hámster tratados con el etil carbamato se ha observado la incidencia de adenomas, carcinomas, linfomas y leucemias, a diferentes concentraciones y por vías de administración oral, cutánea, subcutánea e intraperitoneal. Este compuesto se ha clasificado como un carcinógeno del grupo 2A que se refiere a un “*probable carcinógeno en humanos*” de acuerdo con la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (International Agency for Research on Cancer) (IARC, 2010, 2013).

**Tabla II. Genotoxicidad del uretano en diferentes organismos (Modificado de IARC, 2010)**

Organismo	Prueba	Resultado	Referencia
<i>Bacillus subtilis</i>	Toxicidad diferencial	(+)	Ashby & Kilbey, 1981
<i>Escherichia coli</i>	Toxicidad diferencial	(+)	Ashby & Kilbey, 1981
<i>Salmonella typhimurium</i>	Recombinación intracromosómica (DEL recombination)	+	Galli & Schiestl, 1998
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Recombinación mitótica	+	Sharp & Parry, 1981
<i>Aspergillus nidulans</i>	Aneuploidía	+	Crebelli <i>et. al.</i> , 1986
<i>Drosophila melanogaster</i>	*Prueba de letales recesivos ligados al sexo (SLRL)	+	Oster, 1958
	*Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART)	+	Frölich & Würzler, 1990; Graf & van Schaik, 1992
<i>Cricetulus griseus</i> (Hámster Chino)	Intercambio de cromátidas hermanas (SCE) en células <i>in vitro</i>	+	Abe & Sasaki, 1977
<i>Rattus norvegicus</i> (Sprague-Dawley)	Rompimiento de cadenas de DNA	+	Petzold & Swenberg, 1978
<i>Mus musculus</i>	*SCE de células somáticas y germinales <i>in vivo</i>	+	Roberts & Allen, 1980
	*Formación de micronúcleos en células de piel <i>in vivo</i>	+	He <i>et. al.</i> , 1991
	*Mutación Letal Dominante	+	Adler <i>et. al.</i> , 1996
<i>Homo sapiens</i>	*SCE en linfocitos <i>in vitro</i>	+	Csukas <i>et. al.</i> , 1979

+ Positivo; (+) débil positivo

En las pruebas realizadas para la determinación de los efectos genéticos del etil carbamato se ha obtenido un efecto positivo en la mayor parte de los experimentos (Tabla

II). En procariontes, el uretano es un mutágeno débil (Ashby & Kilbey, 1981), mientras que en los hongos la mutagenicidad depende de la cepa en que se pruebe. En estudios *in vivo* utilizando a *Drosophila melanogaster*, se ha determinado que es un promutágeno (Oster, 1958; Frölich & Würigler, 1990; Graf and van Schaik, 1992). Y en mamíferos se han realizado pruebas para determinar eventos como pérdida cromosómica y mutagenicidad, a nivel de células somáticas y germinales *in vitro* con resultados positivos en la utilización de altas dosis y en diferentes modelos experimentales como hámster, ratones, ratas y diferentes muestras de tejidos humanos (Abe & Sasaki, 1977; Petzold & Swenberg, 1978; Roberts & Allen, 1980; He *et. al.*, 1991; Adler *et. al.*, 1996; Csukas *et. al.*, 1979).

### **1.3.2. Usos**

El uretano es un compuesto sintético que comenzó a producirse aproximadamente en la primera mitad del siglo XX, y ha sido utilizado comercialmente desde 1944 en los Estados Unidos (Tariff Commision, 1945). Su uso ha ido dirigido principalmente a la industria textil, la producción de solventes, plaguicidas, acondicionadores de cabello, para la preparación de ácido sulfámico, extracción de hidrocarburos como el petróleo crudo, así como saborizante para algunos alimentos (IARC, 2010; Adams & Baron, 1965). Actualmente es utilizado para la producción de poliuretanos que son plásticos y pertenecen a una familia de polímeros importantes que forman parte de diversos productos (Tabla III).

Este compuesto era también utilizado en medicina como tranquilizante y agente hipnótico, además de ser un fármaco en el tratamiento de cánceres utilizando dosis de hasta 3g por día para el tratamiento de mieloma múltiple (Paterson, *et. al.*, 1946; Adams & Baron, 1965). En los últimos años no hay evidencias del uso como fármaco del etil carbamato en humanos. En medicina veterinaria es utilizado como anestésico en los animales de laboratorio (Hara & Harris, 2002).

El uretano se encuentra presente en muchos tipos de alimentos y bebidas alcohólicas que están relacionados con un proceso de fermentación (Tabla III). Su detección principalmente en las bebidas, inició desde 1985, por los altos niveles detectados. Los límites de dosis bajas de etil carbamato son de 0.3 mg/kg de peso corporal por día. Sin

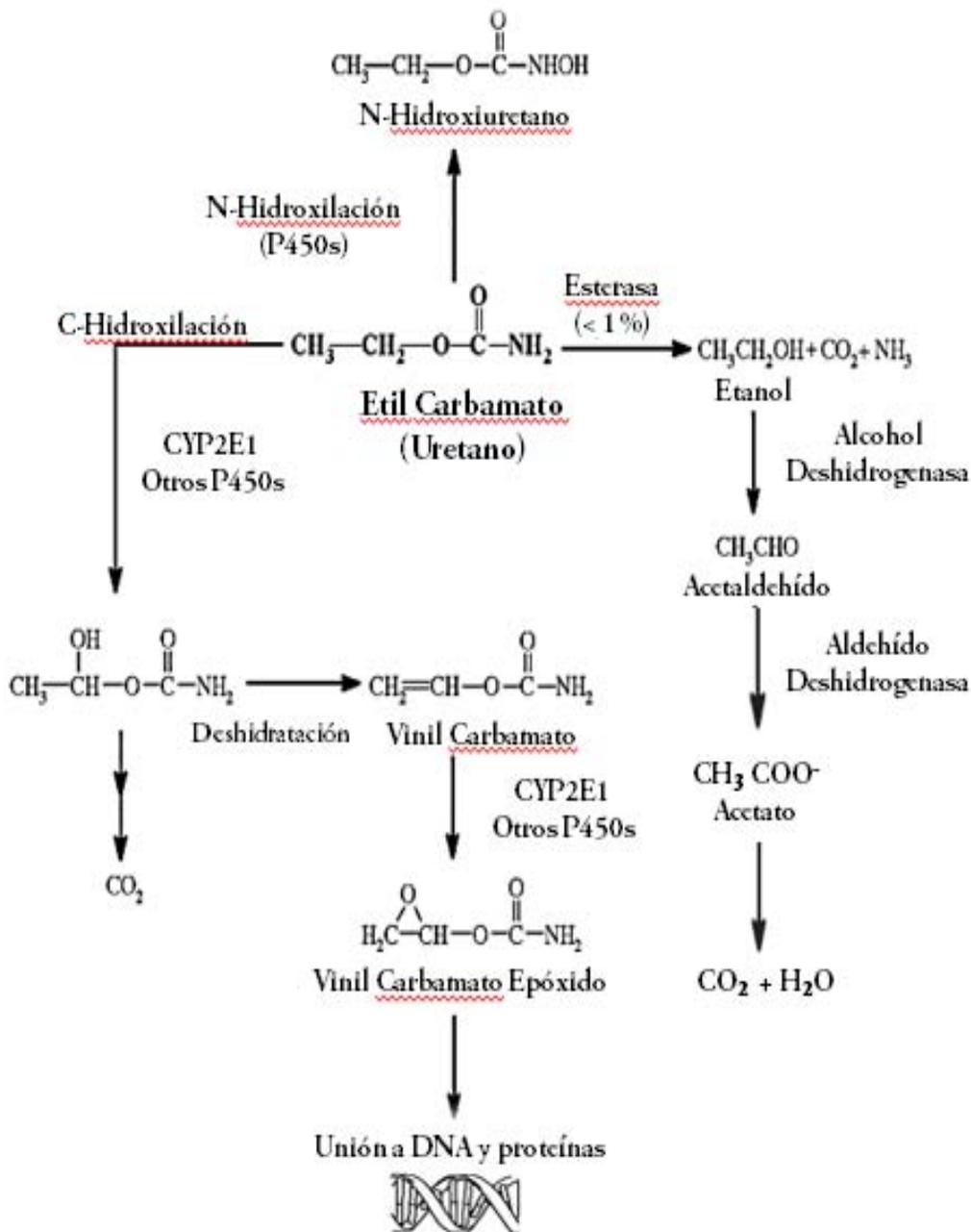
embargo, los niveles de uretano en las bebidas alcohólicas tienen un rango de 0.01 a 12 mg/L, dependiendo de la bebida. Por esta razón las bebidas alcohólicas son consideradas como una de las principales fuentes de este compuesto (Weber & Sharypov, 2009).

**Tabla III. Productos que contienen uretano (POLIOLES, 2013; IARC, 2010):**

<b>Industria</b>	<b>Productos</b>
<b>Automotriz</b>	Tableros, volantes, paneles interiores de techos y puertas, asientos, filtros y recubrimiento de cables.
<b>Aislamiento térmico de aparatos de uso doméstico</b>	Refrigeradores domésticos y comerciales, en calentadores de agua y boiler.
<b>Calzado</b>	Acojinamiento de calzado y ropa, así como para la producción de telas elásticas.
<b>Recubrimientos adhesivos, selladores, y elastómeros</b>	Elaboración de empaques flexibles y rígidos
<b>Construcción</b>	Aislantes
<b>Muebles</b>	Colchones y laminados textiles, bajo alfombras y artículos de consumo, como esponjas, rodillos, aplicadores de pintura.
<b>Alimentos y bebidas producidos por fermentación</b>	Pan, queso, yogurt, té, leche, mantequilla; y en algunos jugos de manzana, uva, cítricos, vegetales; y bebidas alcohólicas como vinos, cerveza, vodka, whisky.

### **1.3.3. Metabolismo**

La genotoxicidad que presenta el etil carbamato en los diferentes organismos es ocasionada por la activación metabólica que da lugar a su actividad carcinogénica. Su metabolismo ha sido estudiado principalmente en roedores y en humanos. Se ha determinado que el uretano presenta tres vías metabólicas (Fig. 3), una de ellas es por medio de la enzima esterasa que conduce a la producción de etanol, CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub> (Nomeir, *et. al.*, 1989). Por una reacción de hidroxilación se producen metabolitos como N-hidroxiuretano y N-acetil-N-hidroxiuretano los cuales son excretados por la orina (Boyland & Nery, 1965).



**Fig. 3 Vías metabólicas del etil carbamato (Modificado de Ghanayem, 2007)**

La otra vía metabólica, involucra el metabolismo oxidante del uretano en donde participan las enzimas CYPs que dan lugar a la bioactivación del uretano; se ha propuesto que la formación de un derivado epóxido es el que tiene actividad carcinogénica (Leithäuser, *et. al.*, 1990). Las CYPs, principalmente las CYP2E1 son las responsables de la

vía de bioactivación del vinil carbamato para la formación del vinil carbamato epóxido (Guengerich & Kim, 1991).

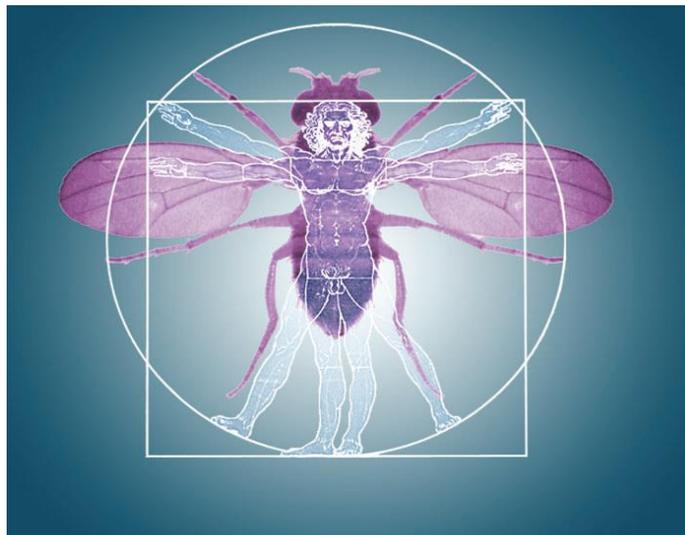
La vía de epoxidación es la que conduce a la genotoxicidad y carcinogénesis del compuesto debido a que se generan aductos de DNA como lo es el vinil carbamato epóxido. Las CYPs llevan al etil carbamato a una oxidación del grupo etilo y a la posterior deshidratación para dar lugar al vinil carbamato que posteriormente se convertirá en el epóxido, que es el último metabolito electrofílico responsable de la genotoxicidad (Ghanayem, 2007; Guengerich y Kim, 1991).

#### **1.4. *Drosophila melanogaster* como modelo biológico**

*Drosophila melanogaster* es un organismo modelo que se ha utilizado durante más de 100 años, ya que presenta características que han impulsado el estudio de la biología y principalmente de la genética, pues facilita la detección de diferentes eventos como mutaciones puntuales, deleciones, duplicaciones, daño a cromosomas y aneuploidías, tanto en células somáticas como germinales. Además, se ha convertido en un organismo experimental clave *in vivo* e *in vitro* en estudios de biología del desarrollo, bioquímica, biología molecular, evolución y conducta (Venitt, *et. al.*, 1984).

También este organismo ha sido considerado un buen modelo biológico por su capacidad metabólica, el amplio conocimiento que se tiene acerca de los genes que participan a lo largo de su desarrollo embrionario, además de ser el primer organismo complejo en tener la secuenciación de su genoma completo, lo que ha impulsado el desarrollo de distintos estudios (Graf, *et. al.*, 1983; Adams, *et. al.*, 2000).

*Drosophila melanogaster* ha permitido un acercamiento más directo al estudio de mecanismos asociados a enfermedades humanas, debido a que varias características fisiológicas y neurológicas se han conservado entre esta mosca y los mamíferos (Fig. 4). Esto permite tener una amplia visión con relación a la utilización de la mosca para el descubrimiento de fármacos terapéuticos para enfermedades de tipo neurodegenerativas como diabetes, desórdenes metabólicos y cáncer, teniendo un mayor entendimiento de la biología humana (Pandey & Nichols, 2011; Botas, 2007).



**Fig. 4 *Drosophila melanogaster* como organismo modelo en el estudio de enfermedades humanas (Tomado de Botas, 2007).**

En las investigaciones de toxicología y genética esta mosca ha sido un modelo biológico base para la evaluación de los efectos producidos por la exposición a xenobióticos, ya que el manejo de este organismo *in vivo*, no necesita de un sistema metabólico exógeno debido a que sus actividades enzimáticas, las cuales son muy similares a las de los mamíferos, son encontradas en larvas de tercer estadio y en adultos (Venitt, *et. al.*, 1984).

En pruebas de mutagénesis, este organismo ha sido utilizado debido a que su metabolismo tiene la capacidad para activar promutágenos permitiendo realizar estudios *in vivo*, para la determinación de la farmacocinética, pues es capaz de captar xenobióticos a través de diferentes rutas, metabolizando los compuestos y activando o desintoxicando el compuesto original (Graf *et. al.*, 1983).

La biotransformación de los xenobióticos en la mosca se debe a los citocromos p450 que se expresan en las larvas en el tubo digestivo y los cuerpos grasos, mientras que en los adultos éstos se encuentran en los aparatos reproductores y en los tubos de Malpighi, realizando una serie de reacciones enzimáticas. En el genoma de *Drosophila melanogaster*, se han identificado 90 genes de la superfamilia de los citocromos p450, lo que ha permitido un amplio estudio de las funciones de p450 en relación al metabolismo de compuestos (Tijet, *et. al.*, 2001; Feyereisen, 1999).

#### **1.4.1. Generalidades**

Las ventajas de este sistema biológico son precedidas por la facilidad para mantenerla en condiciones de laboratorio, ya que son organismos pequeños que miden entre 2 y 3 mm, y tienen un ciclo de vida corto que dura entre 10 y 12 días a 25°C, además de que su descendencia es abundante por lo que facilita el análisis de su progenie. Su mantenimiento es de costo reducido y requiere espacios pequeños (Ramos-Morales, *et. al.*, 1993).

Presentan un dimorfismo sexual claramente evidente en los adultos, diferenciando a las hembras (♀) por ser ligeramente más grandes que los machos, así como la ausencia de la fusión de los segmentos en el abdomen y con una terminación puntiaguda y la placa genital en posición dorso-ventral. Mientras que los machos (♂) tienen una fusión de segmentos en la parte terminal del abdomen con una fuerte melanización, una terminación redondeada y posición ventral de la placa genital; además de la presencia de peines sexuales que son una serie de cerdas cortas de color negro en el primer par de patas, específica de los machos.

Su número cromosómico es bajo ( $2n=8$ ) pues tienen tres pares de cromosomas autosómicos y un par sexual. Y es un organismo que cuenta con una gran cantidad de líneas mutantes que permiten el análisis de diferentes mecanismos genéticos (Ramos-Morales, *et. al.*, 1993).

#### **1.4.2. Fecundidad**

En *Drosophila melanogaster*, la fecundidad es una característica que está relacionada con una serie de procesos que dependen de las características de las hembras y de los machos. El aumento de la fecundidad de las hembras se debe a la presencia de los machos y el desarrollo del cortejo. La maduración sexual se alcanza a las pocas horas de haber emergido, básicamente en cuanto las moscas secan sus alas (Ramos-Morales, *et. al.*, 1993).

La puesta de huevos usualmente tiene una duración de 4 a 15 días en donde las condiciones como el alimento son una fuente fundamental. Las hembras llegan a poner

hasta 100 huevos por día, y entre 700 a 1000 huevos aproximadamente a lo largo de su vida. Mientras que los machos pueden llegar a tener de progenie entre 10, 000 o 14, 000 a lo largo de su vida (Ashburner *et. al.*, 2005).

Las condiciones ambientales son también un factor que influye en la fecundidad, debido a que estos organismos son muy sensibles a la temperatura y humedad, pues valores bajos de temperatura (p ej. 15 °C) producen la disminución de la puesta de huevos, ya que la temperatura óptima es de 25°C; también la densidad de población influye de manera inversa, por la competencia, la disponibilidad del alimento y de componentes como la levadura que estimulan la oviposición (Ashburner, *et. al.*, 2005).

### 1.4.3. Discos imagales

*Drosophila melanogaster* es un organismo holometábolo, es decir que presenta a lo largo de su desarrollo una metamorfosis completa con diferentes estadios como: huevo, larva, pupa y la formación de un imago o adulto (Fig. 5). A largo de estos estadios se presentan una serie de procesos como la diferenciación de linajes celulares, presentando células conocidas como larvarias y las células imagales (Gardner, 1998).

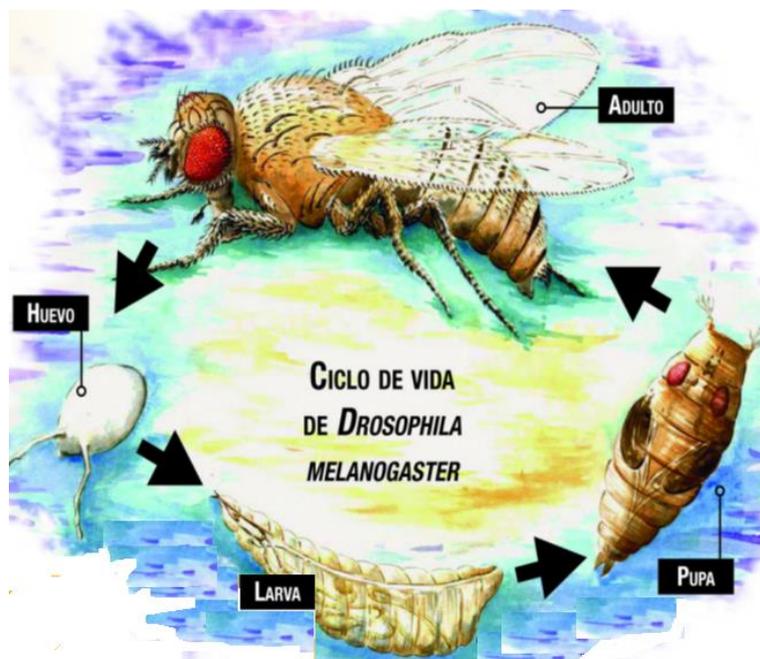
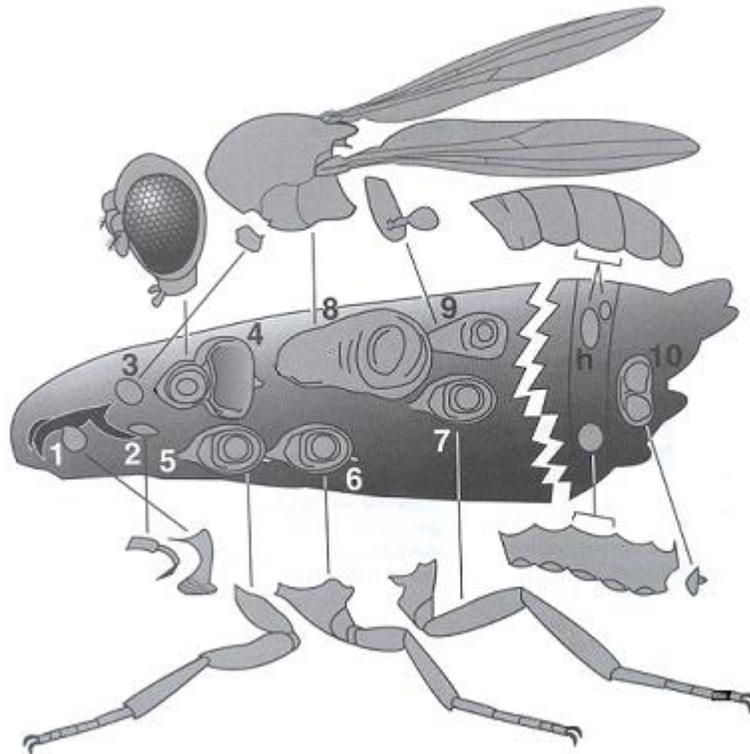


Fig. 5 Ciclo de Vida de *Drosophila melanogaster* (Tomado de UNAMirada a la ciencia, 2012).

Las células imagales se caracterizan por ser pequeñas, tener una composición cromosómica diploide y principalmente por ser células determinadas genéticamente pero no diferenciadas, ya que este proceso ocurrirá hasta que la larva entra en metamorfosis. Estas células no diferenciadas se encuentran en estructuras que son llamadas discos imagales, los cuales darán lugar a las diferentes estructuras de la mosca adulta. Las larvas presentan 9 pares de discos que forman parte de la cabeza al tórax, más un disco que forma los genitales, teniendo un total de 19 discos imagales (Fig. 6) (Lewis, 2002).



**Fig. 6** Esquema de los 19 discos imagales de *Drosophila melanogaster*. 1) Labial; 2) Clipeolabral; 3) Humeral; 4) Ojo-Antena; 5) 1° Par de Patas; 6) 2° Par de Patas; 7) 3° Par de Patas; 8) Ala; 9) Halterio; 10) Genital; h) Histoblastos. (Modificado de Lewis, 2002).

Aproximadamente 24 células dan inicio a los discos imagales de las alas, entre las 9-10 h después de la puesta del huevo. Estas células comenzarán a dividirse por mitosis durante el desarrollo, por lo que las larvas recién eclosionadas (24h) contienen alrededor de 40 células en los discos de las alas, y en los diferentes estadios las células se van

dividiendo de forma exponencial. Así en la etapa de pupa, cada disco del ala contiene entre 49, 000 y 52, 000 células (Lewis, 2002; Bate & Martínez, 1993; García-Bellido & Merriam, 1971). Las alas de los organismos adultos están conformadas por dos monocapas celulares (ventral y dorsal) que presentan un desarrollo independiente, y en donde cada monocapa del ala presenta 26, 000 células aproximadamente, cada una de las cuales dará origen a un pelo o tricoma (García-Bellido & Merriam, 1971).

### **1.5. Inducción de Mutación Somática y Recombinación Mitótica (SMART)**

En *Drosophila*, el uso de marcadores fenotípicos para los tricomas de las alas se utiliza para determinar si a lo largo del proceso de formación del adulto se presentaron factores que modifican la información genética de las células de las alas.

La exposición de los organismos en etapa larvaria produce que las células de los discos imagales al sufrir una alteración, den lugar a una estirpe celular con características diferentes, lo que se traducirá en el adulto en una mancha mutante detectable en el contexto silvestre del ala de la mosca (García-Bellido & Merriam J. R., 1971). La utilización de las alas para este sistema se apoya en la existencia de mutantes de *Drosophila melanogaster* que modifican la diferenciación regular de los tricomas, por lo que son utilizados como marcadores genéticos (García-Bellido & Merriam J. R., 1971; Graf *et. al.*, 1984).

El sistema de prueba para medir mutación somática y recombinación mitótica (Somatic Mutation & Recombination Test, SMART) detecta la actividad mutagénica y recombinogénica de diferentes compuestos químicos en *Drosophila melanogaster*, y fue propuesta por Graf *et. al.*, 1984. De esta forma, la exposición de células somáticas en la etapa larvaria del organismo ante un compuesto tóxico que ocasione una mutación será detectable al dar lugar a clones celulares que formarán manchas mutantes en la mosca adulta (Graf *et. al.*, 1984). Esta metodología presenta una serie de ventajas, debido a que es un sistema de prueba que permite la utilización de estructuras como las alas facilitando el manejo para la realización de preparaciones permanentes, manteniendo así el material original y permitiendo la verificación de resultados. Además de que se utilizan los

organismos *in vivo*, y se obtienen resultados en poco tiempo debido al manejo de una sola generación.

Los marcadores genéticos utilizados son *mwh* (*multiple wing hair*) y *flr<sup>3</sup>* (*flare*), ambos marcadores autosómicos recesivos que se ubican en el cromosoma 3 a 0.0 y 39.0 unidades de mapa (um), respectivamente. Los eventos genéticos que pueden dar origen a manchas en las alas son: mutación puntual, no disyunción, pérdida parcial y recombinación genética.

Los eventos genéticos como mutación puntual, no disyunción, pérdida parcial y recombinación genética (entre los marcadores *flr<sup>3</sup>* y *mwh*) darán lugar a una mancha simple, es decir formada por sólo alguno de los marcadores genéticos utilizados *mwh* ó *flr<sup>3</sup>*. Mientras que los eventos de recombinación entre el marcador proximal *flr<sup>3</sup>* y el centrómero originarán una mancha gemela que se expresa fenotípicamente en las alas como una mancha formada por tricomas *mwh* y *flr<sup>3</sup>* (Fig. 7) (Graf *et. al.*, 1984).

Las manchas en las alas indican los eventos genéticos ocurridos y de acuerdo al tamaño y número representan las células que han sido afectadas, estimando el momento en el que se ocasionó el daño durante el desarrollo del organismo. Esta metodología permite además explorar la susceptibilidad de los organismos de la población, con base en el número de manchas encontradas en cada mosca. Se ha observado que en moscas expuestas al mismo tratamiento, algunas muestran un alto número de manchas, mientras que otras presentan pocas o ninguna mancha (Ramos-Morales, *et. al.*, 2000).

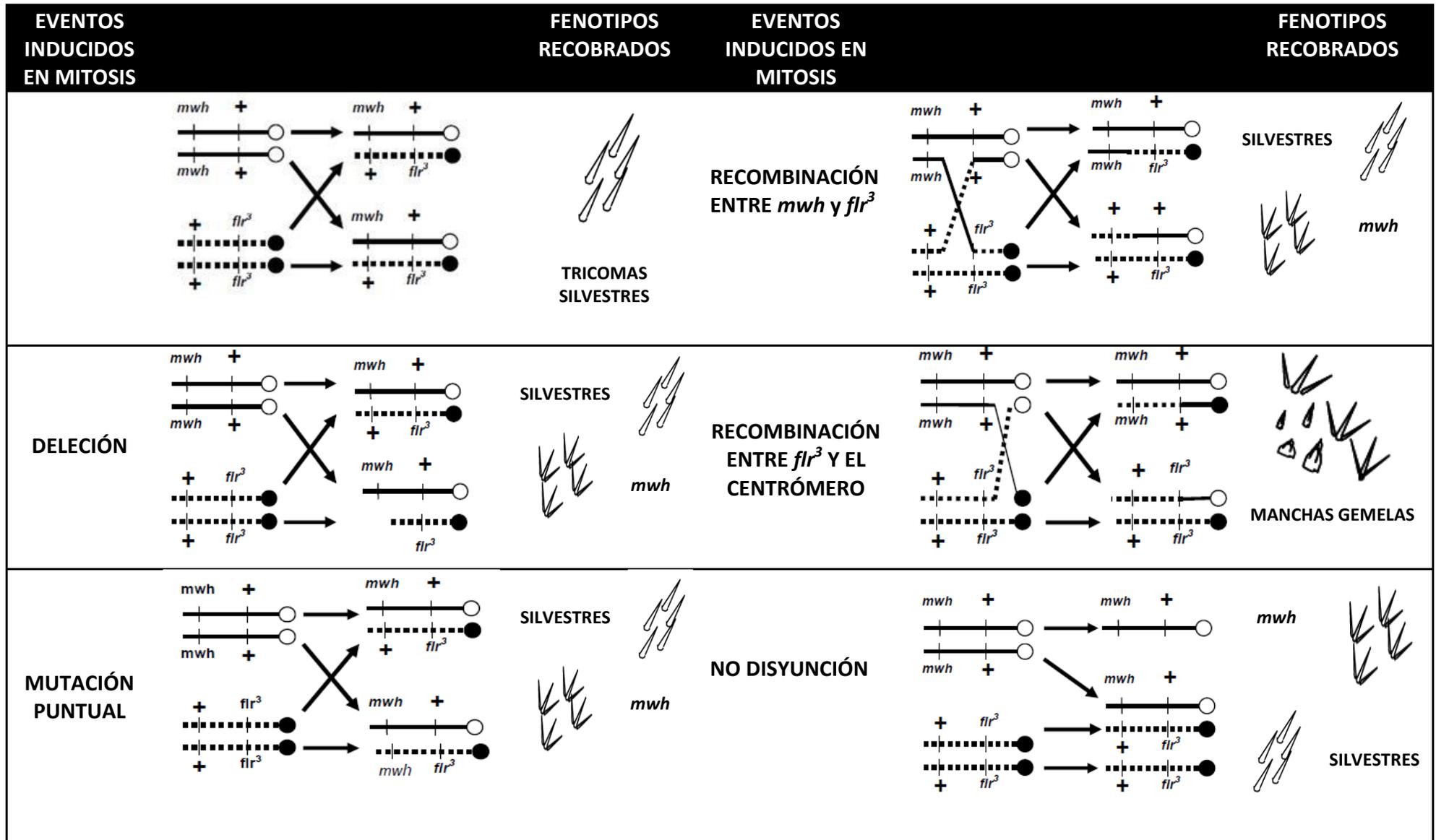


Fig. 7 Esquema de los eventos genéticos que se detectan en SMART  
(Modificado de Graf *et. al.*, 1984)

## **2. JUSTIFICACIÓN**

La evaluación de biomarcadores en términos cuantitativos facilita la evaluación de los posibles riesgos por la exposición a contaminantes en los sistemas biológicos. El desarrollo de este tipo de estudios en organismos *in vivo* que muestren lo que ocurre en condiciones ambientales naturales y que brinden repetitividad, reproducibilidad, especificidad y sensibilidad ha sido escaso debido al grado de complejidad que representa, por lo que la utilización de marcadores biológicos ya validados podría permitir la búsqueda de nuevos biomarcadores, que además se puedan evaluar de manera simultánea. Así, condiciones ambientales desfavorables como la exposición a contaminantes, correlacionadas con características conocidas de los organismos como marcadores biológicos, pueden ayudar a conocer la magnitud de las respuestas en diferentes niveles de organización biológica.

Considerando que la búsqueda de nuevos biomarcadores es compleja, el presente estudio representa una base importante en la construcción de un biomarcador relacionado con la capacidad reproductiva (fecundidad) que en un futuro permita estimar el riesgo biológico por la exposición a compuestos tóxicos en diferentes niveles de organización.

## **3. HIPÓTESIS**

¿La respuesta genotóxica sería diferente en organismos que han sido seleccionados con base en su fecundidad?

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 General**

Determinar si hay diferencia en la respuesta genotóxica de la frecuencia de mutación somática y recombinación mitótica como un biomarcador validado en cepas de *Drosophila melanogaster* con diferente fecundidad.

#### **4.2 Particulares**

- ✓ Obtener fecundidad de las cepas parentales aplicando selección disruptiva para obtener cepas con alta (+) y baja (-) fecundidad.
- ✓ Obtener la curva concentración-efecto de la genotoxicidad por el uretano en células somáticas de *Drosophila melanogaster*.
- ✓ Evaluar la respuesta genotóxica inducida por la exposición a uretano en las células somáticas de las poblaciones de baja (-) y alta (+) fecundidad de *Drosophila melanogaster*.
- ✓ Comparar la respuesta genotóxica de cepas no seleccionadas y cepas seleccionadas.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Reactivos o sustancias

Como mutágeno de referencia se utilizó el compuesto uretano ó etil carbamato (Sigma-Aldrich®) (CAS, 51-79-6) y sacarosa al 5%.

### 5.2. Cepas de *Drosophila melanogaster*

Se empleó la craza estándar modificada (Muñoz-Hernández, *et. al.*, 2008) para la evaluación de la inducción de mutación somática y recombinación mitótica en las alas de las moscas. Las cepas mutantes de *Drosophila melanogaster* son:  $flr^3/In(3LR)TM3,y^+ ri$   $p^Psep bx^{34e} e Bd^S$  y  $mwh,e/mwh,e$ . Estas cepas tienen marcadores fenotípicos que nos ayudan a la identificación de los tipos de progenie obtenida.

#### I) Hembras $flr^3/In(3LR)TM3,y^+ ri p^Psep bx^{34e} e Bd^S$

El marcador  $flr^3$  (*flare*) se encuentra en el cromosoma 3 a 39.0 um, es un gen autosómico recesivo que modifica el aspecto de los tricomas (pelos) de las alas de las moscas. Su expresión es variable por lo que el tricoma puede aparecer como un depósito de quitina en la superficie del ala, o la forma de una flama, de donde recibe su nombre. Este gen es letal en condición homocigota por lo que para su mantenimiento se requiere de un cromosoma balanceador  $TM3, Bd^S$ , el cual porta múltiples inversiones y el marcador letal  $Bd^S$  (*Beaded Serrate*) que se manifiesta como una muesca en el borde de las alas de las moscas portadoras de inversiones. La presencia de este cromosoma evita que las moscas entren en homocigosis.

#### II) Machos $mwh e/mwh e$

El marcador  $mwh$  (*multiple wing hair*) se encuentra en el cromosoma III a 0.0 um. Es un gen autosómico recesivo que produce una alteración en la cantidad de tricomas (más de 2) por célula en las alas de los adultos, a diferencia de las moscas de tipo silvestre en las que se produce un tricoma por célula. El marcador  $e$  (*ebony*), es un gen autosómico recesivo que produce color del cuerpo ébano; se utiliza para garantizar la correcta clasificación de la progenie.

La cruce progenitora  $flr^3/ln(3LR)TM3, y^+ ri p^P sep bx^{34e} e Bd^S \times mwh,e/mwh,e$  da lugar a dos tipos de progenie: moscas libres de inversión y portadoras de inversiones que en la etapa larvaria no se distinguen fenotípicamente por lo que son tratadas de manera simultánea. En la etapa adulta, las moscas pueden ser diferenciadas por la forma de las alas: las moscas libres de inversiones (LI) ( $+flr^3/mwh,e,+$ ) tienen alas silvestres y el color del cuerpo es pardo (silvestre), mientras que las portadoras de inversiones (PI) ( $TM3, Bd^S/mwh,e, +$ ) tienen muescas en el borde de las alas, además de que muestran el color de cuerpo ébano, ya que son homocigotas para el marcador de color de cuerpo (el cromosoma balanceador lleva un alelo de  $e$ ) (Fig. 8) (Lindsley & Grell, 1972; Ashburner *et. al.*, 2005; Graf *et. al.*, 1983).

En la determinación de la toxicidad de las concentraciones se utilizó como referencia a hembras vírgenes y machos de la cepa silvestre Canton-S (CS) como línea testigo, lo que permite evaluar el impacto de los marcadores de la cruce  $flr^3/TM3, Bd^{Ser} \times mwh,e/mwh,e$ .

### 5.3. Selección de cepas

A partir de las cepas  $flr^3/TM3, Bd^S \times mwh,e/mwh,e$  se obtuvieron dos cepas seleccionadas con base en el número de hijos que producían. Para la selección se utilizaron 20 tubos homeopáticos con medio estándar para cada cepa. Se colocó una hembra y un macho en cada tubo, después de cinco días se sacaron a los padres y se dejó que la progenie continuara su desarrollo.

Una vez obtenidos a los adultos se registró la cantidad de progenie producida por cada pareja y se seleccionaron las familias de moscas con mayor y menor cantidad de progenie ((+) y (-) fecundidad) para producir la siguiente generación. El procedimiento se repitió por cinco generaciones, después de lo cual, se obtuvieron las cepas seleccionadas que se indica:

$flr^3/TM3, Bd^S (+)$

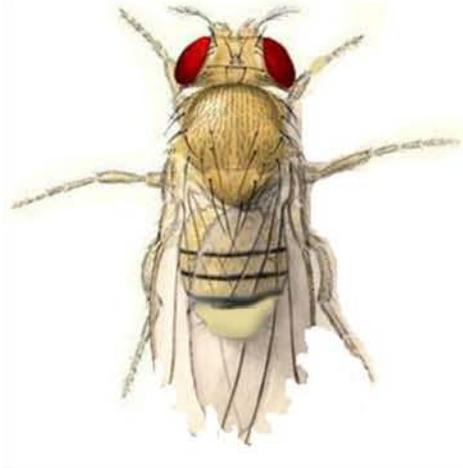
$flr^3/TM3, Bd^S (-)$

$mwh e/mwh e (+)$

$mwh e/mwh e (-)$

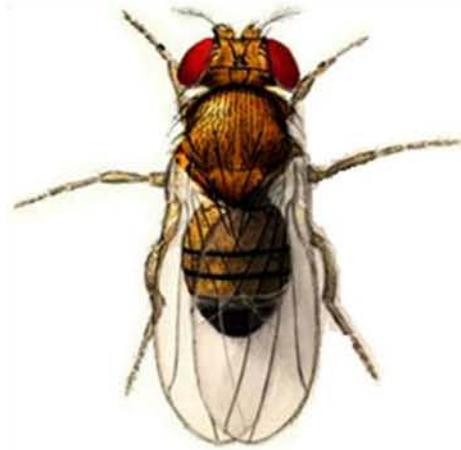
**P**

♀♀  
*flr<sup>3</sup>/In(3LR)TM3,y<sup>+</sup>ri p<sup>P</sup>sep bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>S</sup>*



Alas con tricomas silvestres y  
muecas en el borde

♂♂  
*mwh,e/mwh,e*

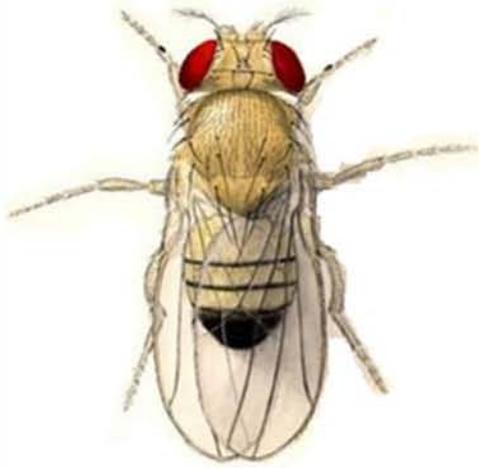


Alas con tricomas múltiples, sin  
muecas en el borde y cuerpo ébano

**X**

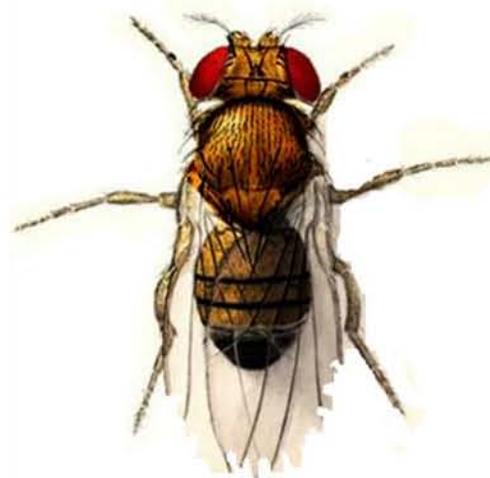
**F<sub>1</sub>**

*+flr<sup>3</sup>/mwh e,+*



Moscas libres de inversiones  
Alas sin muecas en el borde y cuerpo  
silvestre

*TM3,Bd<sup>S</sup>/mwh e,+*



Moscas portadoras de inversiones  
Alas con muecas en el borde y cuerpo  
ébano

Fig. 8 Cepas de *Drosophila melanogaster* utilizadas para la realización de la cruce progenitora

Obtenidas estas moscas se mantuvieron en frascos con medio de cultivo fresco, para que las cepas seleccionadas se homogeneizaran.

Para cada experimento se prepararon las cruzas progenitoras experimentales, utilizando hembras vírgenes de no más de 3 días de edad y machos de máximo 3 días de edad (Fig. 9):

Cruza (+): Hembras:  $flr^3/TM3, Bd^S (+)$  X machos  $mwh e/mwh e (+)$

Cruza (-): Hembras:  $flr^3/TM3, Bd^S (-)$  X machos  $mwh e/mwh e (-)$

#### 5.4. Obtención de larvas

Para los experimentos, se sincronizan los individuos, de manera que la respuesta de los organismos al tratamiento sea lo más homogénea posible y que la edad no interfiera en los resultados. De esta forma, tres días después de realizar las cruzas de las diferentes poblaciones, los progenitores se colocaron en frascos con medio de cultivo fresco durante ocho horas para la colecta de los huevos. A los tres días, las larvas de  $72 \pm 4$  h fueron extraídas por medio del procedimiento de Nöthinger (1970), que consiste en separar las larvas del medio de cultivo por flotación con una solución concentrada de sacarosa al 20%. La solución de sacarosa que contenía a las larvas fue vertida en un embudo de separación de 3-4 mm de  $\emptyset$  y las larvas fueron recuperadas con una malla de nylon. Con una espátula se colocaron grupos de aproximadamente 100 larvas en tubos homeopáticos para administrar el tratamiento (Graf *et al.*, 1984).

#### 5.5. Tratamiento

La exposición de los organismos al compuesto fue por un tratamiento agudo que consistió en la alimentación, durante 6 horas, de las larvas de  $72 \pm 4$  h de edad. En este tratamiento se utilizaron tubos homeopáticos que contenían una gasa de nylon por un extremo para que las larvas tuvieran contacto con el compuesto y por el otro un tapón de hule espuma, para evitar la salida de éstas. Los tubos fueron colocados en vasos pequeños (20ml) que contenían 0.2 g de celulosa en polvo y 1.5 ml de la solución de uretano a probar ó sacarosa al 5% como testigo (Graf, *el al.*,1983).

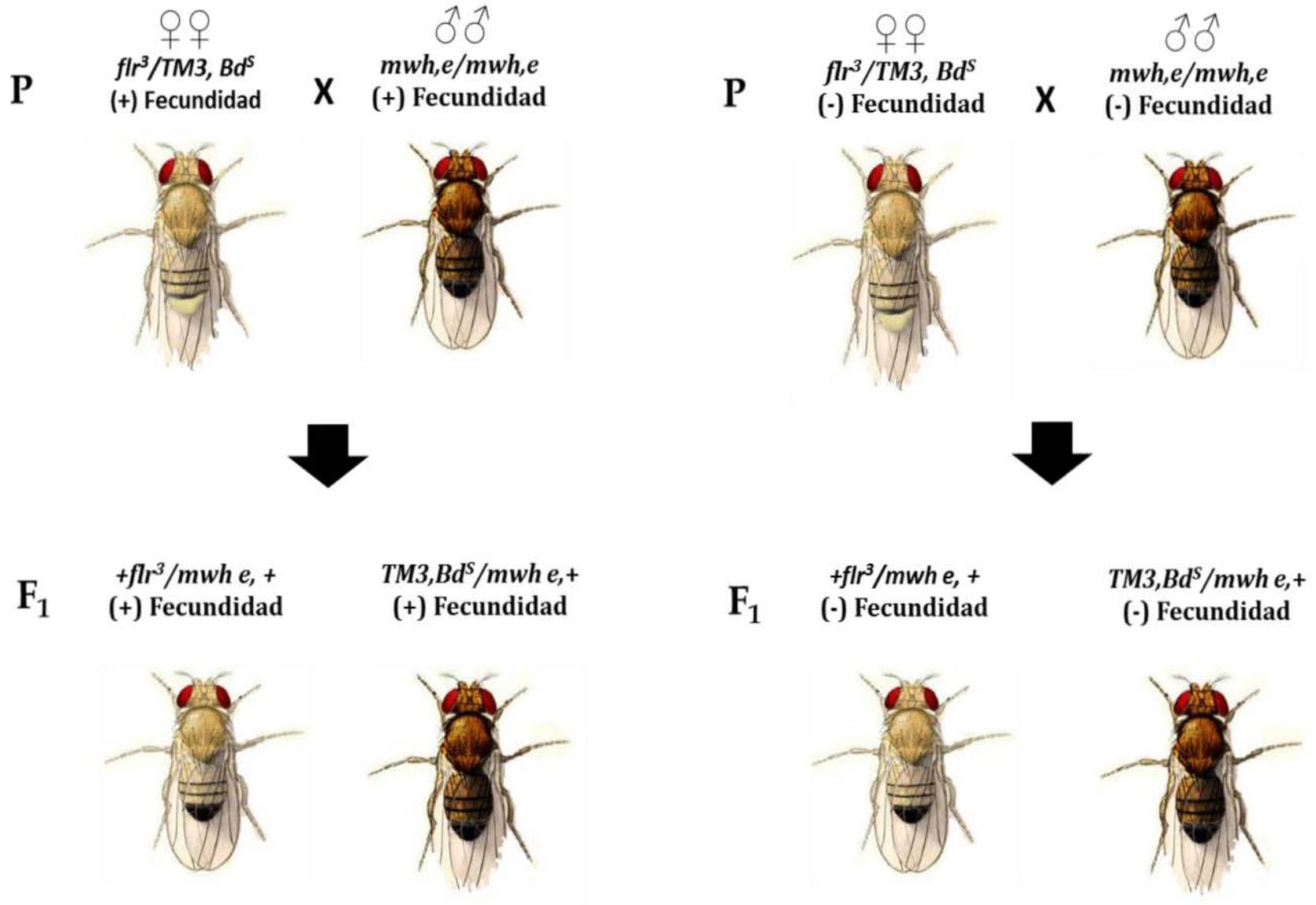


Fig. 9 Cruzas realizadas con los organismos seleccionados con (+) y (-) Fecundidad

Terminada la exposición, se retiraron los tubos homeopáticos y las larvas se enjuagaron con agua corriente para eliminar los residuos de celulosa, y colocarlas en frascos con medio de cultivo para que continuaran su desarrollo (Fig. 10).

## **5.6. Cepas no seleccionadas**

### **5.6.1. Selección de concentraciones de uretano**

En esta primera etapa de experimentos preliminares se utilizó un rango de  $2.00E+1$  a  $2.00E-14$  mM, para la determinación de las concentraciones a utilizar en la siguiente parte de experimentos. Las larvas utilizadas fueron Canton-S y provenientes de la cruce de hembras vírgenes *flr<sup>3</sup>/TM3*, *Bd<sup>S</sup>* y machos *mwh e/mwh e* de organismos no seleccionados. Las soluciones del compuesto se obtuvieron por medio de diluciones sucesivas a partir de la mayor concentración a probar.

## **5.7. Cepas Seleccionadas**

En esta etapa se utilizaron las cepas seleccionadas obtenidas con respecto a su cantidad de progenie. Para cada cruce estándar modificada, se tomaron hembras vírgenes *flr<sup>3</sup>/TM3*, *Bd<sup>Ser</sup>*, de mayor número de progenie (+) y se cruzaron con los machos *mwh e/mwh e*, de mayor número de progenie (+). También se realizó la cruce correspondiente con las cepas seleccionadas con un menor número de progenie. Las dos diferentes cruces experimentales (alta (+) y baja (-) fecundidad) se trataron con sacarosa al 5 % ó con alguna de las concentraciones seleccionadas en la primera etapa [ $2.00E-14$ ,  $9.00E-12$ ,  $2.00E-06$  y  $7.81E-02$ mM].

### **5.7.1. Progenie de moscas libres de inversiones (LI) y portadoras de inversiones (PI)**

Para confirmar si las moscas mantenían su capacidad reproductiva (+ progenie y - progenie), se realizó una última cruce entre los organismos de las cruces experimentales que habían sido expuestas al tratamiento con uretano.

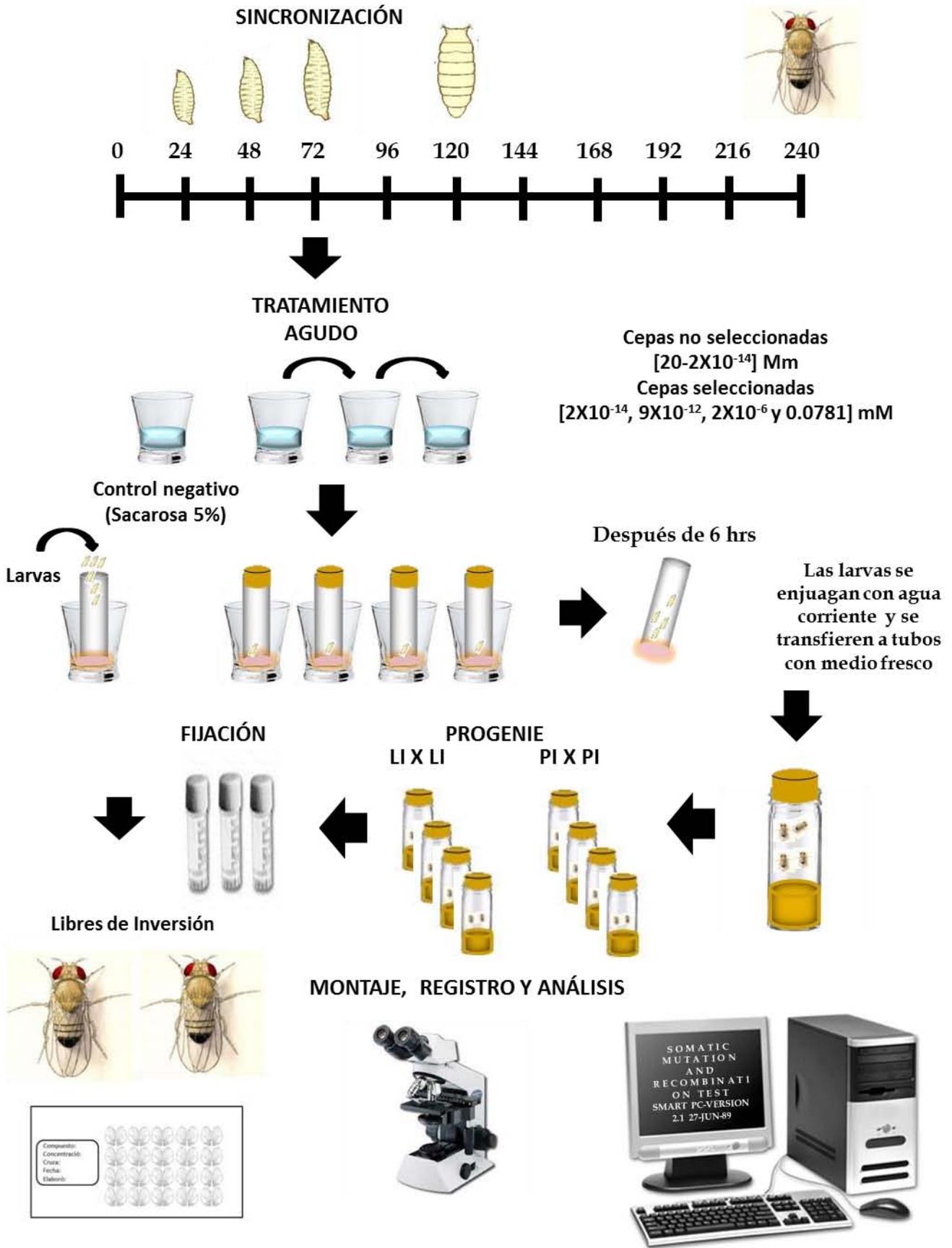


Fig. 10 Esquema del método utilizado

De esta forma una vez que los organismos expuestos al compuesto emergieron se seleccionaron 15 parejas de moscas libres de inversiones ( $\text{♀} \text{♀} +flr^3/mwh\ e,+ \times \text{♂} \text{♂} +flr^3/mwh\ e,+$ ) y 15 parejas portadoras de inversiones ( $\text{♀} \text{♀} TM3,Bd^S/mwh\ e,+ \times \text{♂} \text{♂} TM3,Bd^S/mwh\ e,+$ ), en todos los casos se utilizaron hembras vírgenes y se sembraron un total de 60 parejas para cada concentración y tipo de progenie, realizando la siembra de cada pareja en un tubo homeopático con medio de cultivo fresco.

Cuando en los tubos homeopáticos se observaron huevos y larvas (5 días), los progenitores fueron retirados, fijados en alcohol al 70 % y se prepararon laminillas con sus alas. El resto de la progenie se dejó para que continuara su desarrollo y una vez que emergieron, se contó la progenie recobrada tanto para las moscas libres de inversión como para las portadoras de inversiones (Fig. 11). Con base en el genotipo de las moscas sembradas se esperaban las siguientes proporciones:

$$flr^3/mwh,e \times flr^3/mwh,e$$

	$flr^3$	$mwh,e$
$flr^3$	$flr^3/flr^3$	$flr^3/mwh,e$
$mwh,e$	$flr^3/mwh,e$	$mwh,e/mwh,e$

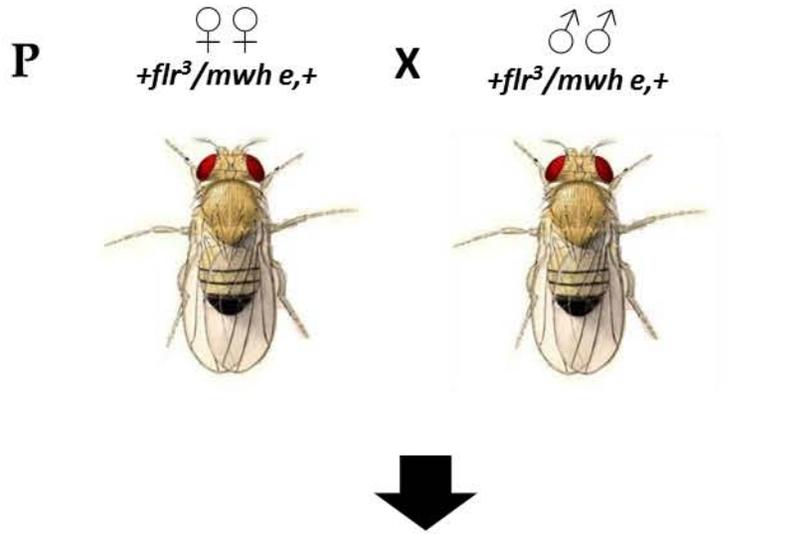
2 silv: 1 e

$$TM3,Bd^S/mwh,e \times TM3,Bd^S/mwh,e$$

	$TM3,Bd^S$	$mwh,e$
$TM3,Bd^S$	$TM3,Bd^S / TM3,Bd^S$	$TM3,Bd^S/mwh,e$
$mwh,e$	$TM3, Ser/mwh,e$	$mwh,e/mwh,e$

2 Ser-e: 1 e

### Libres de Inversiones (LI)

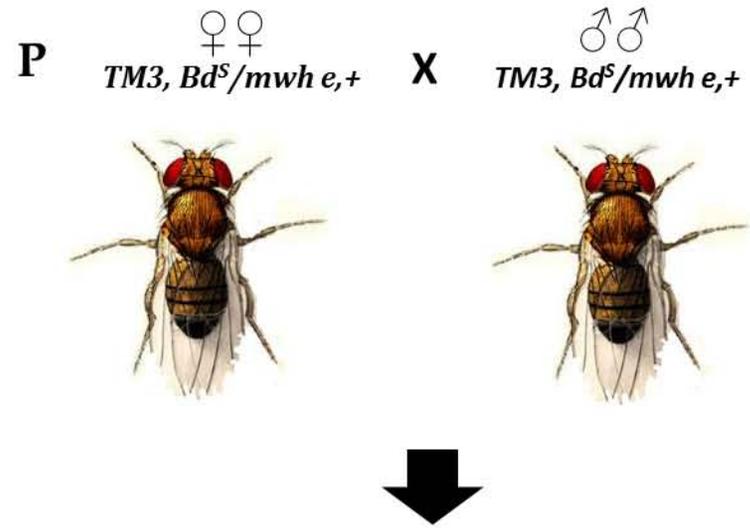


**F<sub>1</sub>**  $+flr^3/mwh\ e,+$  Alas sin muescas en el borde y cuerpo *silvestre*  
 $mwh,e/mwh,e$  Alas sin muescas en el borde y cuerpo ébano



2silv:1e

### Portadoras de Inversiones (PI)



**F<sub>1</sub>**  $TM3, Bd^S/mwh\ e,+$  Alas con muescas en el borde y cuerpo ébano  
 $mwh,e/mwh,e$  Alas sin muescas en el Borde y cuerpo ébano



2Ser-e:1e

Fig. 11 Cruzas realizadas de moscas LI X LI y PI X PI y la progenie de cada cruz

## 5.8. Fijación y preparación de laminillas

Una vez obtenidos los adultos se sacrificaron por exceso de anestesia (éter) y se fijaron en etanol al 70%. Para realizar el montaje de las alas, se separaron las alas de cada uno de los organismos con ayuda de unas pinzas de relojero y se colocaron en un portaobjetos con solución Fauré (Graf *et al.*, 1984). El montaje de las laminillas consistió en colocar en cada portaobjetos 20 pares de alas: 10 de hembras y 10 de machos, ambos libres de inversión. Se preparó una laminilla de cada experimento (3 laminillas en total). Las alas fueron revisadas con un microscopio óptico a un aumento de 40X y se registró: el número de manchas encontradas en cada una de las secciones que componen el ala, el número de células que forman la mancha y su fenotipo (*mwh*, *flr* o ambos) (Fig. 10).

## 5.9. Criterios de registro

Los criterios para el registro de las manchas se basaron en Graf, *et. al.*, 1984. Las manchas simples están formadas por tricomas con el marcador *flr*<sup>3</sup> ó *mwh*, mientras que las manchas gemelas tienen tricomas con los dos tipos de marcadores formando la mancha. En el caso de las manchas *mwh*, éstas se cuantifican sólo cuando al menos una célula de la mancha presenta tres o más tricomas debido a que células con dos tricomas se pueden dar por alguna otra alteración independiente a la mutación *mwh*, por lo que éstas no se toman en cuenta (Graf *et al.*, 1984). Dos manchas son independientes si se separan entre sí por tres o más hileras de tricomas regulares (tipo silvestre), y representan dos eventos independientes.

## 5.10. Análisis Estadístico

### 5.10.1. Índice de Supervivencia y Proporción Sexual

Como un indicador preliminar se obtuvo la Supervivencia promedio por tubo, para hembras, machos y el total de moscas silvestres, libres de inversión y las portadoras de inversiones tanto en las cepas no seleccionadas como las seleccionadas. La Proporción Sexual promedio es informativa de si el tratamiento provoca un efecto diferente en uno de los sexos y se obtuvo mediante:

**$\Sigma$  Número total de ♀ ó ♂ (Testigo ó Experimental) /  $\Sigma$  Número total de organismos (♀y ♂) Testigo ó Experimental= Proporción Sexual**

Para comparar el efecto del tratamiento en las moscas CS, LI y PI, se obtuvo el Índice de Supervivencia (IS) para las moscas CS, LI y PI sin seleccionar y seleccionadas como (Arellano-Aguilar, 2002):

$$\sum_{i=1}^n \text{Experimental} / \sum_{i=1}^n \text{Testigo} = \text{Índice de Supervivencia (i)x}$$

(i)= Índice de Supervivencia para ♀ ó ♂

(x)=en cada dilución probada

### **5.10.2. Frecuencia de Mutación Somática y Recombinación Mitótica**

Para el análisis estadístico, la frecuencia de manchas en las series experimentales de cepas no seleccionadas y seleccionadas por su fecundidad fueron comparadas con su correspondiente testigo, con ayuda del programa de cómputo SMART (Frei & Würgler, 1988) que se basa en la prueba no paramétrica  $X^2$  y el procedimiento de decisión múltiple con un nivel de significancia del 5% (Graf *et. al.*,1984; Frei & Würgler, 1988). En este análisis se prueban dos posibles hipótesis para establecer si existen diferencias en la frecuencia de manchas entre las series testigo y las series tratadas (Frei & Würgler, 1988, 1995).

*Hipótesis nula ( $H_0$ ):* ( $H_0$ :  $f_c = f_e$ ) establece que no existe diferencia en la frecuencia de manchas entre las series testigo y las series tratadas.

*Hipótesis alternativa ( $H_a$ ):* ( $H_a$ :  $m f_c = f_e$ ) postula que la frecuencia de manchas en las series tratadas es igual a **m** veces la frecuencia de las series testigo. Debido a que **m** representa un múltiplo que se selecciona de acuerdo con el tipo de manchas a comparar, se utiliza **m=2** para las manchas chicas y totales que son relativamente más frecuentes y **m=5** para manchas grandes y gemelas que son eventos raros (Frei & Würgler, 1988).

El análisis estadístico de la comparación del total de manchas puede llevar a cuatro posibles resultados:

- 1) Positivo (+)
- 2) Débil positivo (w)
- 3) Indeterminado (i)
- 4) Negativo (-)

**Tabla IV. Análisis estadístico del procedimiento de decisión múltiple de Frei & Würzler (1988)**

<b>Hipótesis</b>	<b>No se rechaza <math>H_0</math></b>	<b>Se rechaza <math>H_0</math></b>
<b>No se rechaza <math>H_0</math></b>	Indeterminado (i)	Negativo (-)
<b>Se rechaza <math>H_0</math></b>	Positivo (+)	Débil positivo (w)

La determinación de la frecuencia de mutación somática y recombinación mitótica se evaluó a partir de:

- \*Frecuencia de manchas totales
- \*Tamaño de la mancha
- \*Número de manchas por mosca.

En el caso de la frecuencia de manchas totales se determinó por el tipo de mancha: chica (1-2 células), grande (> 2 células) o gemela (fenotipo *flr<sup>3</sup>* y *mwh*). Para la evaluación del tamaño de la mancha se comparó cuantitativamente la distribución del número de células que forman las manchas, de los organismos tratados en relación con el testigo, y el número de manchas por mosca se determinó para identificar la susceptibilidad de los organismos (Ramos-Morales *et. al.*, 2000).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Selección de cepas

A partir de una población inicial de 7 familias independientes (P Inicial), con un promedio de  $22 \pm 6.09$  hijos se realizó la primera selección de las familias con mayor y menor número de hijos ( $43.5 \pm 3.47$  y  $9 \pm 1.52$  hijos, respectivamente), para continuar de la misma manera en las siguientes generaciones ( $G_{1,2,3,4}$  y  $5$ ). En la Figura 12 y 13, P0 corresponde al promedio de hijos de la primera selección. Durante las primeras generaciones se presentó una respuesta variable a la selección, siendo mayor en el caso de la cepa  $flr^3/TM3, Bd^S$ , lo que se explica en parte por la presencia del sistema de letales balanceados.

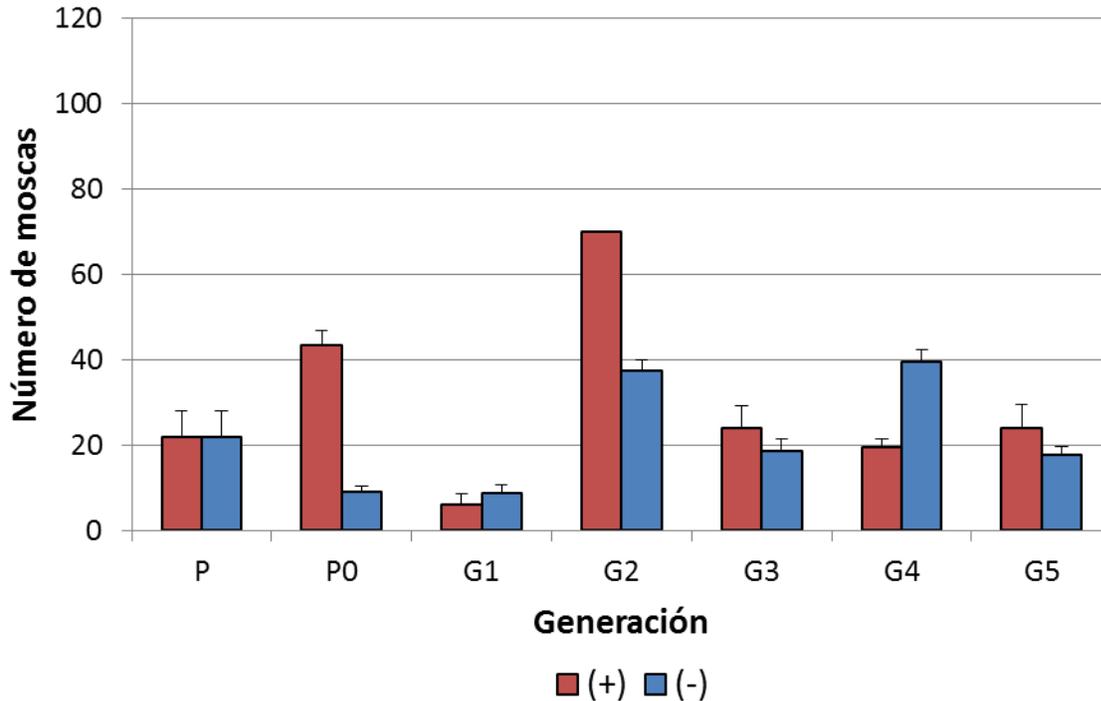


Fig. 12 Progenie promedio por tubo de la cepa  $flr^3/TM3, Bd^S$  para la selección de cepas por fecundidad.

En el caso de la cepa  $flr^3/TM3, Bd^S$ , a lo largo de las diferentes generaciones se observó que las moscas de (+) fecundidad predominaron claramente en la segunda generación, pero no en la tercera y cuarta. Mientras que en las moscas de (-) fecundidad, el número de hijos en algunas generaciones fue mayor al de la generación

inmediata anterior. En la G<sub>5</sub>, se observó la diferencia esperada en el número de progenie en ambas cepas seleccionadas. A partir de esta generación se integraron a todas las familias con mayor cantidad de progenie para homogeneizar a la cepa seleccionada y a partir de la siguiente generación se iniciaron las cruzas experimentales.

En la cepa *mwh e/mwh e*, la respuesta fue menos variable ya que en las generaciones 4 y 5 se obtuvo una diferencia significativa entre las cepas seleccionadas con más (+) y con menos (-) progenie, por lo que se decidió tomar la respuesta de estas cepas como referencia. A partir de la generación 5 se integraron las familias para homogeneizar a las cepas seleccionadas y en la siguiente generación se iniciaron las cruzas experimentales para la siguiente etapa (Fig. 13).

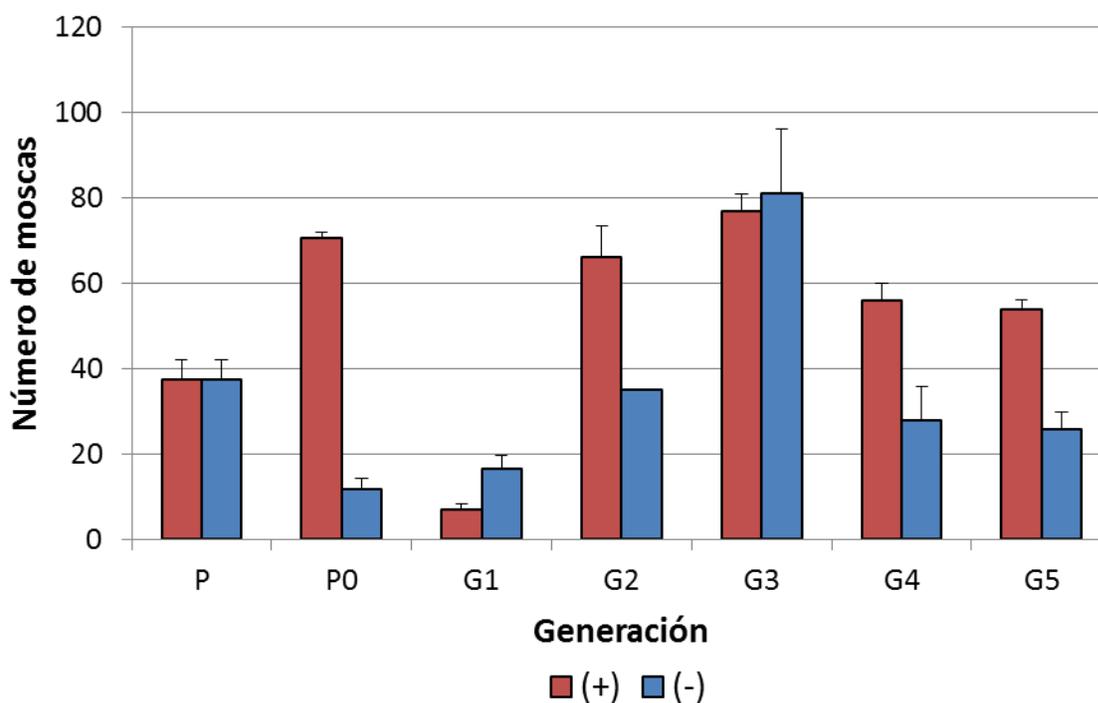


Fig. 13 Progenie promedio por tubo de la cepa *mwh e/mwh e* para la selección de cepas por fecundidad.

## **6.2. Curva de concentración-efecto del uretano en cepas no seleccionadas**

### **6.2.1. Índice de Supervivencia y Proporción Sexual**

Se utilizaron 16 concentraciones más el testigo (sacarosa al 5%). Con base en las moscas recobradas se obtuvieron dos indicadores de toxicidad: la Supervivencia (S) y la Proporción Sexual (PSx). La supervivencia muestra la cantidad de organismos que se recobran en las diferentes concentraciones y en el testigo.

En la Tabla V se muestran los valores obtenidos de S y PSx de las moscas utilizadas: CS, y la progenie de la cruce estándar modificada: moscas libres de inversión (LI) y moscas portadoras de inversiones (PI) para las diferentes concentraciones probadas (2.00E-14 a 2.00E+01 mM) y el testigo de sacarosa al 5%.

En general, la respuesta obtenida no es lineal, mostrando fluctuaciones similares en los tres tipos de moscas y la menor concentración probada resultó ser la más tóxica. En la cepa CS la supervivencia en las series experimentales fue menor a la del lote testigo (59.75), excepto en las concentraciones 1.25E+00 y 2.00E+01 (62.50 y 70.50, respectivamente) en las que se recobró un número de moscas similar o mayor. La Figura 14 muestra la supervivencia corregida como Índice, para lo cual la supervivencia del lote testigo y los lotes experimentales se dividen entre la supervivencia del lote testigo; de esta manera, el testigo toma el valor de 1.00 para cada una de los tipos de moscas, CS, LI y PI).

En el caso de las moscas libres de inversiones (LI) y las portadoras de inversiones (PI), la respuesta de éstas es similar ante las diferentes concentraciones, además la tendencia a lo largo del rango de las concentraciones probadas es que se recuperaron más organismos en las concentraciones más altas probadas. La comparación de la supervivencia entre las tres líneas de moscas muestra diferencias significativas entre las moscas LI y las PI con respecto a las CS (ANOVA de dos vías, postest Prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ).

La Proporción Sexual se calculó para determinar si el compuesto tiene influencia de manera particular en alguno de los sexos, observando que las cepas CS, LI y PI no se ven afectadas, por lo que la proporción de hembras y machos (Fig. 15) tienen la misma tendencia en las diferentes concentraciones, para todas las líneas (ANOVA de dos vías  $p > 0.05$ ). En general se observó que la fluctuación en la proporción de sexos mostró

diferente desviación con respecto al valor 0.5 (esperado por el mecanismo genético de determinación del sexo en *Drosophila*). Las moscas CS se ubican más cercanas al 0.5, seguidas por las LI y finalmente las PI, que se alejan más. Para comparar la variación entre las tres líneas, en la Figura 16 se presentan los Coeficientes de Variación de la proporción de sexos para las moscas CS, LI y PI.

**Tabla V. Supervivencia (promedio  $\pm$  ee) y Proporción Sexual (promedio  $\pm$  ee) de moscas tratadas con uretano en donde se observa que la Supervivencia en concentraciones altas probadas presenta mayor número de organismos, mientras que la PS no se ve afectada por el uretano.**

[ ] mM	CS				LI				PI			
	N	Promedio* $\pm$ ee	Proporción Sexual		N	Promedio* $\pm$ ee	Proporción Sexual		N	Promedio* $\pm$ ee	Proporción Sexual	
			♀	♂			♀	♂			♀	♂
0	239	59.75 $\pm$ 18.67	0.55 $\pm$ 0.03	0.45 $\pm$ 0.03	99	33.00 $\pm$ 4.51	0.45 $\pm$ 0.03	0.55 $\pm$ 0.03	119	39.67 $\pm$ 5.90	0.47 $\pm$ 0.08	0.53 $\pm$ 0.08
2.00E-14	141	35.25 $\pm$ 11.92	0.52 $\pm$ 0.06	0.48 $\pm$ 0.06	49	16.33 $\pm$ 4.33	0.53 $\pm$ 0.04	0.47 $\pm$ 0.04	33	16.50 $\pm$ 3.50	0.52 $\pm$ 0.02	0.48 $\pm$ 0.02
1.00E-13	162	40.50 $\pm$ 8.54	0.53 $\pm$ 0.04	0.47 $\pm$ 0.04	44	14.67 $\pm$ 6.94	0.49 $\pm$ 0.11	0.51 $\pm$ 0.11	62	20.67 $\pm$ 9.53	0.60 $\pm$ 0.08	0.40 $\pm$ 0.08
1.00E-12	139	34.75 $\pm$ 3.75	0.51 $\pm$ 0.06	0.49 $\pm$ 0.06	56	18.67 $\pm$ 7.13	0.56 $\pm$ 0.13	0.44 $\pm$ 0.13	26	13.00 $\pm$ 8.00	0.66 $\pm$ 0.14	0.34 $\pm$ 0.14
9.00E-12	168	42.00 $\pm$ 7.84	0.49 $\pm$ 0.03	0.51 $\pm$ 0.03	46	15.33 $\pm$ 9.02	0.37 $\pm$ 0.20	0.63 $\pm$ 0.20	58	19.33 $\pm$ 10.53	0.66 $\pm$ 0.17	0.34 $\pm$ 0.17
7.00E-11	182	45.50 $\pm$ 10.87	0.54 $\pm$ 0.03	0.46 $\pm$ 0.03	59	19.67 $\pm$ 7.45	0.48 $\pm$ 0.10	0.52 $\pm$ 0.10	67	22.33 $\pm$ 13.09	0.34 $\pm$ 0.17	0.66 $\pm$ 0.17
6.00E-10	136	34.00 $\pm$ 9.81	0.54 $\pm$ 0.06	0.46 $\pm$ 0.06	58	19.33 $\pm$ 6.06	0.46 $\pm$ 0.09	0.54 $\pm$ 0.09	64	21.33 $\pm$ 10.84	0.38 $\pm$ 0.07	0.62 $\pm$ 0.07
5.00E-09	145	36.25 $\pm$ 12.25	0.49 $\pm$ 0.08	0.51 $\pm$ 0.08	64	21.33 $\pm$ 4.91	0.52 $\pm$ 0.04	0.48 $\pm$ 0.04	71	23.67 $\pm$ 3.28	0.47 $\pm$ 0.02	0.53 $\pm$ 0.02
4.00E-08	184	46.00 $\pm$ 12.90	0.42 $\pm$ 0.09	0.58 $\pm$ 0.09	81	27.00 $\pm$ 9.17	0.44 $\pm$ 0.01	0.56 $\pm$ 0.01	62	31.00 $\pm$ 19.00	0.60 $\pm$ 0.16	0.41 $\pm$ 0.16
3.00E-07	136	34.00 $\pm$ 8.07	0.52 $\pm$ 0.06	0.48 $\pm$ 0.06	71	23.67 $\pm$ 9.13	0.44 $\pm$ 0.09	0.56 $\pm$ 0.09	73	24.33 $\pm$ 12.00	0.41 $\pm$ 0.05	0.59 $\pm$ 0.05
2.00E-06	230	57.50 $\pm$ 10.44	0.56 $\pm$ 0.03	0.44 $\pm$ 0.03	60	20.00 $\pm$ 5.86	0.49 $\pm$ 0.10	0.51 $\pm$ 0.10	97	32.33 $\pm$ 5.78	0.42 $\pm$ 0.02	0.58 $\pm$ 0.02
2.00E-05	167	41.75 $\pm$ 12.83	0.51 $\pm$ 0.06	0.49 $\pm$ 0.06	53	17.67 $\pm$ 2.96	0.50 $\pm$ 0.05	0.50 $\pm$ 0.05	81	27.00 $\pm$ 6.24	0.50 $\pm$ 0.10	0.50 $\pm$ 0.10
3.00E-04	187	46.75 $\pm$ 10.70	0.54 $\pm$ 0.03	0.46 $\pm$ 0.03	57	19.00 $\pm$ 2.52	0.39 $\pm$ 0.06	0.61 $\pm$ 0.06	71	23.67 $\pm$ 1.20	0.36 $\pm$ 0.06	0.64 $\pm$ 0.06
4.90E-03	197	49.25 $\pm$ 17.62	0.49 $\pm$ 0.03	0.51 $\pm$ 0.03	93	31.00 $\pm$ 4.73	0.50 $\pm$ 0.04	0.50 $\pm$ 0.04	97	32.33 $\pm$ 2.33	0.45 $\pm$ 0.03	0.55 $\pm$ 0.03
7.81E-02	198	49.50 $\pm$ 11.00	0.50 $\pm$ 0.02	0.50 $\pm$ 0.02	75	25.00 $\pm$ 4.04	0.56 $\pm$ 0.04	0.44 $\pm$ 0.04	74	24.67 $\pm$ 2.33	0.53 $\pm$ 0.05	0.47 $\pm$ 0.05
1.25E+00	250	62.50 $\pm$ 20.65	0.53 $\pm$ 0.05	0.47 $\pm$ 0.05	106	35.33 $\pm$ 4.91	0.44 $\pm$ 0.07	0.56 $\pm$ 0.07	92	30.67 $\pm$ 4.91	0.43 $\pm$ 0.06	0.57 $\pm$ 0.06
2.00E+01	282	70.50 $\pm$ 15.42	0.49 $\pm$ 0.02	0.51 $\pm$ 0.02	81	27.00 $\pm$ 2.31	0.42 $\pm$ 0.07	0.58 $\pm$ 0.07	102	34.00 $\pm$ 5.86	0.47 $\pm$ 0.07	0.53 $\pm$ 0.07

\*Promedio por tubo

CS (Moscas Silvestres); LI (moscas Libres de Inversión); PI (moscas Portadoras de Inversión)

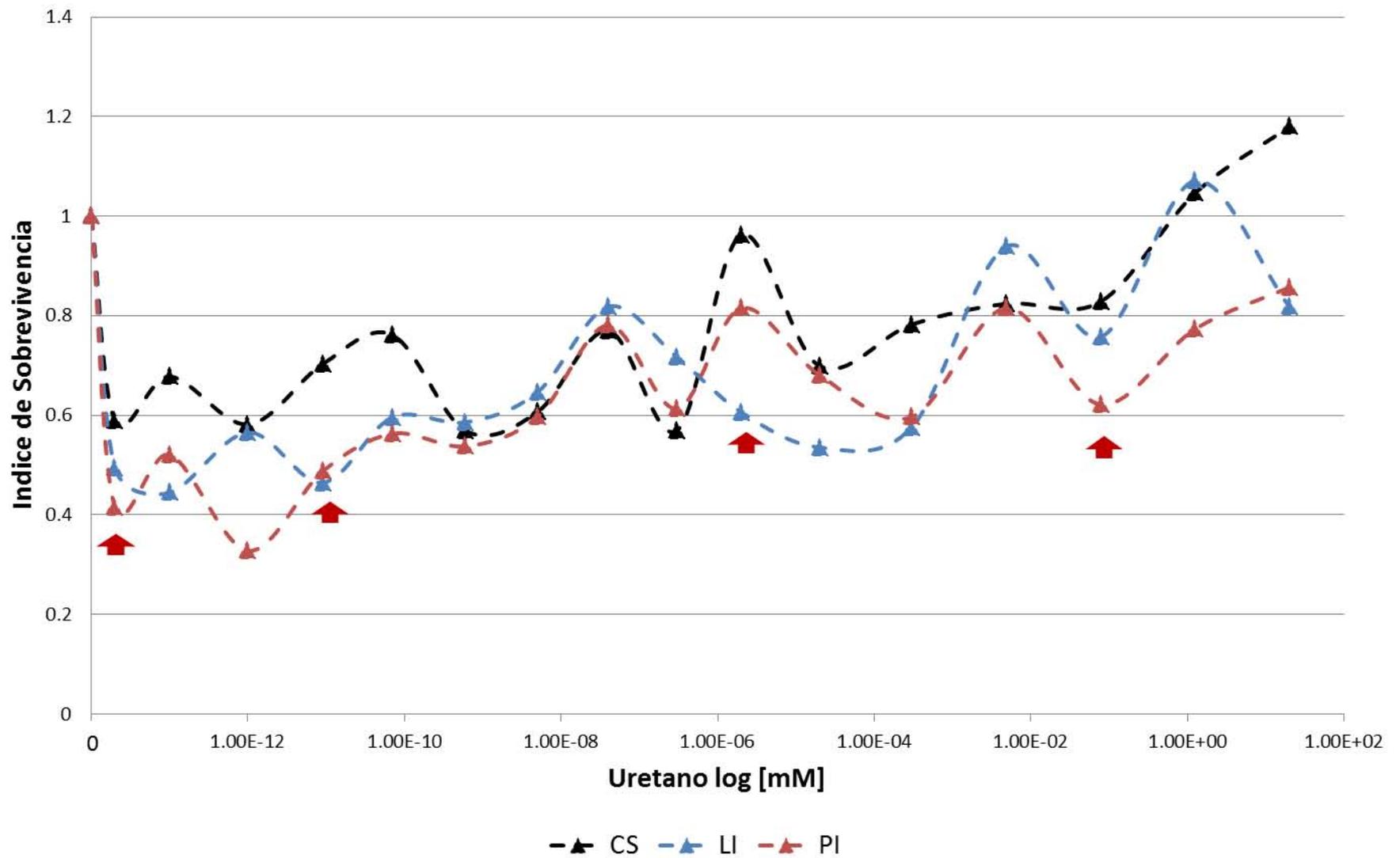


Fig. 14 Índice de Supervivencia de las moscas CS, LI y PI tratadas con uretano, que muestra una fluctuación a lo largo de las diferentes concentraciones probadas para las tres líneas (las flechas señalan las concentraciones seleccionadas para la siguiente etapa experimental).

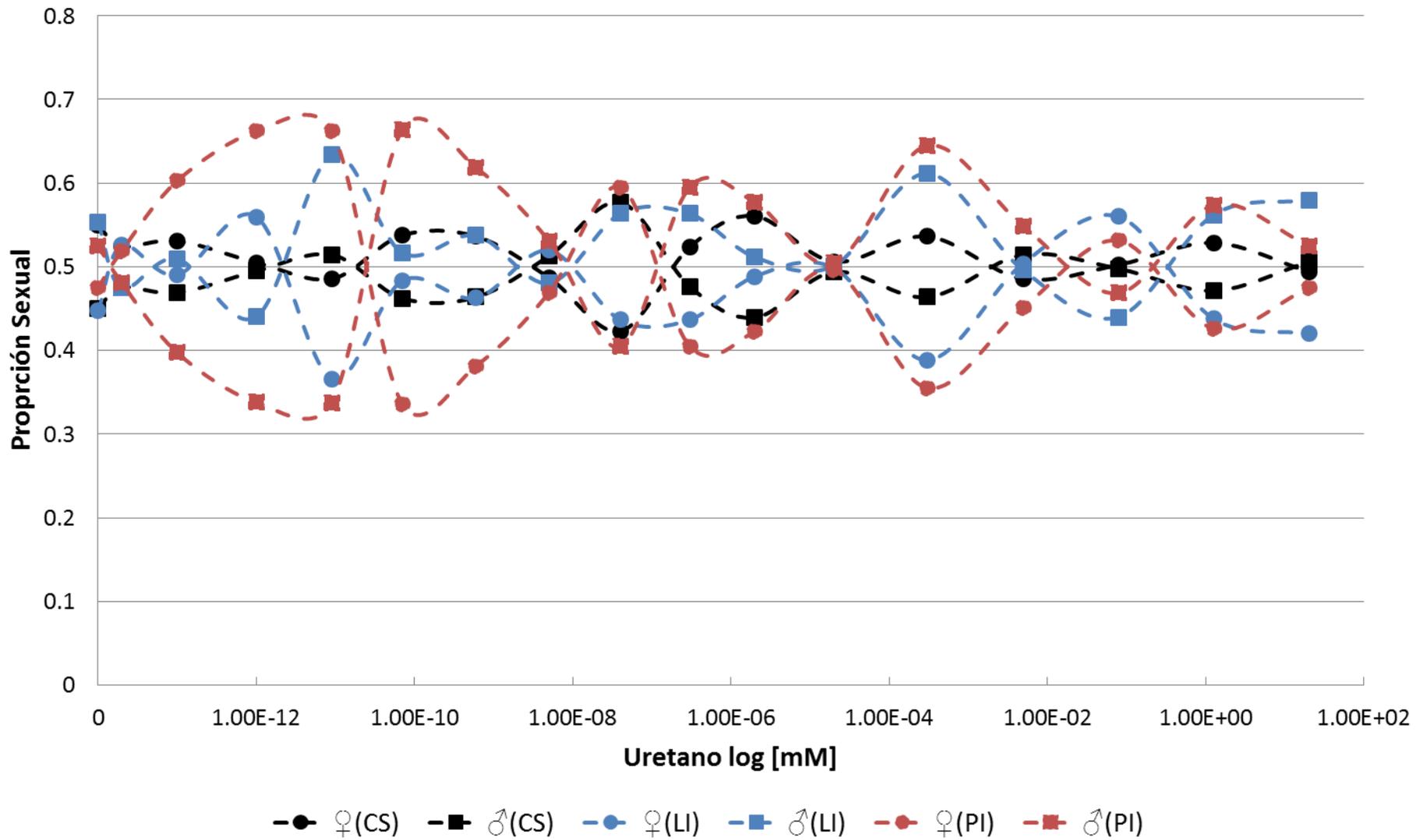


Fig. 15 Proporción Sexual de moscas CS, LI y PI tratadas con uretano, que muestra que este compuesto no afecta a un sexo en particular.

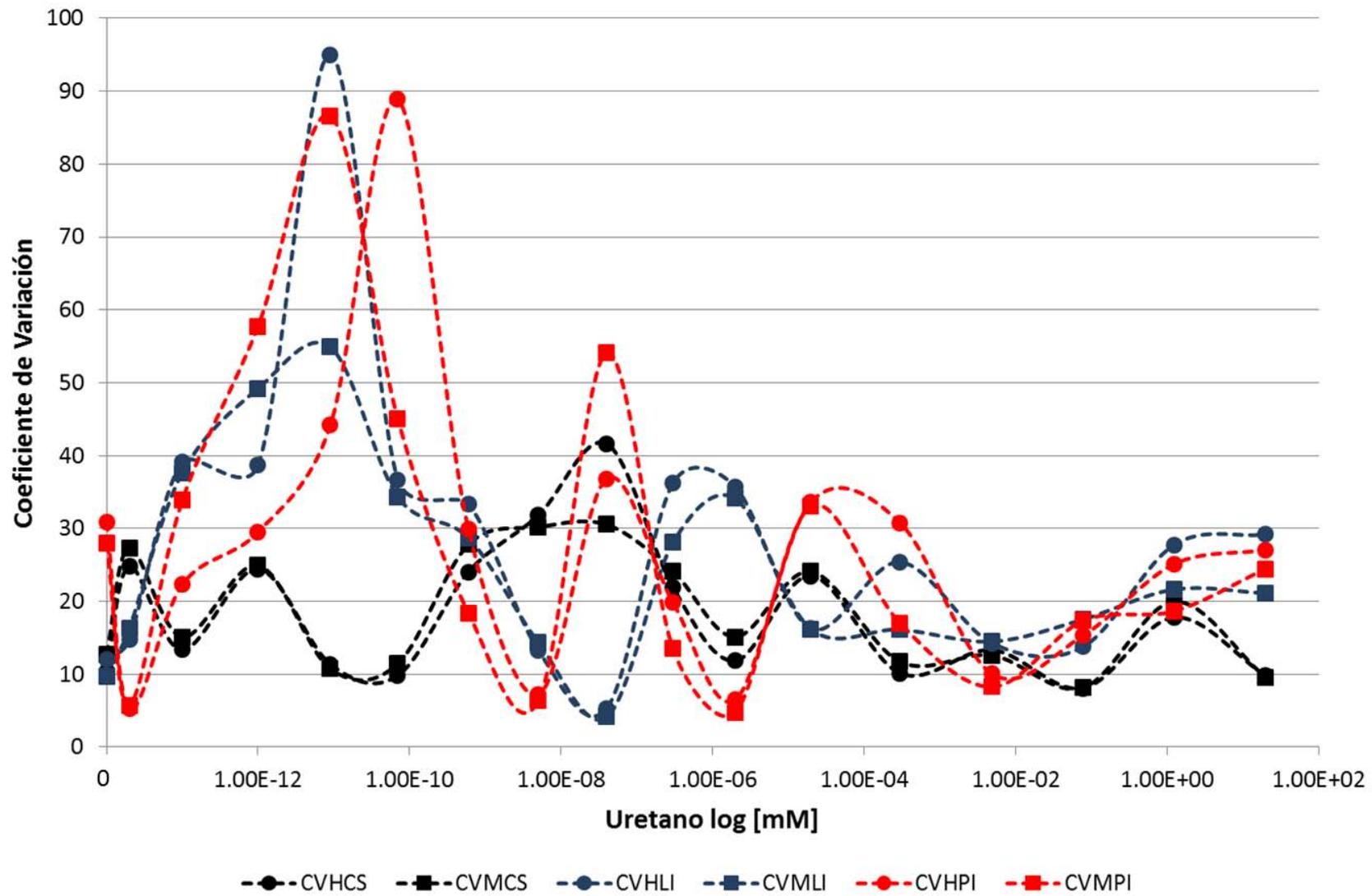


Fig. 16 Coeficiente de variación de la Proporción Sexual de moscas CS, LI y PI tratadas con uretano.

### 6.2.2. Inducción de Mutación Somática y Recombinación Mitótica

En las moscas libres de inversión (LI) de las cepas no seleccionadas se incrementó la frecuencia de manchas chicas y totales ( $p < 0.05$ ) en la mayoría de las concentraciones probadas, excepto la concentración de  $7.81E-02$  y la más alta de  $2.00E+01$  mM, como se muestra en la tabla VI.

**Tabla VI. Frecuencia de manchas de las alas de moscas libre de inversión, tratadas con uretano que muestran un resultado positivo.**

[ ] mM	N° de Alas	Manchas chicas (1-2 células)		Manchas grandes (> 2 células)		Manchas gemelas		Totales	
		m=2		m=5		m=5			
		Frecuencia	*	Frecuencia	*	Frecuencia	*	Frecuencia	*
0	118	0.19		0.08		0		0.26	
2.00E-14	40	0.47	(+)	0.05	(-)	0.03	(i)	0.55	(+)
1.00E-13	78	0.41	(+)	0.04	(-)	0.04	(i)	0.49	(+)
1.00E-12	38	0.5	(+)	0.05	(-)	0	(i)	0.55	(+)
9.00E-12	78	0.42	(+)	0.09	(-)	0.01	(i)	0.53	(+)
7.00E-11	116	0.35	(+)	0.04	(-)	0	(i)	0.4	(+)
6.00E-10	80	0.43	(+)	0.05	(-)	0.04	(i)	0.51	(+)
5.00E-09	80	0.35	(+)	0.11	(-)	0.01	(i)	0.47	(+)
4.00E-08	78	0.41	(+)	0.05	(-)	0	(i)	0.46	(+)
3.00E-07	120	0.39	(+)	0.03	(-)	0.01	(i)	0.43	(+)
2.00E-06	78	0.33	(+)	0.12	(-)	0.03	(i)	0.47	(+)
2.00E-05	80	0.44	(+)	0.04	(-)	0.03	(i)	0.5	(+)
3.00E-04	80	0.41	(+)	0.05	(-)	0.03	(i)	0.49	(+)
4.90E-03	120	0.39	(+)	0.07	(-)	0.03	(i)	0.48	(+)
7.81E-02	120	0.26	(i)	0.07	(-)	0.02	(i)	0.34	(-)
1.25E+00	120	0.37	(+)	0.05	(-)	0.03	(i)	0.45	(+)
2.00E+01	80	0.28	(i)	0.1	(-)	0.01	(i)	0.39	(i)

\*Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (Mutation Res., 203 (1988) 297-308): (+)= positivo; (-)=negativo; (i)=indeterminado. (m)=factor múltiple, nivel de probabilidad:  $\alpha=0.05$ .

### 6.2.3. Selección de concentraciones de uretano

Para la obtención de la curva de concentración-efecto fue tomado como referencia el IS y la inducción de mutación somática y recombinación mitótica evaluada a través de la

frecuencia de manchas totales, el tamaño de la mancha y el número de manchas por mosca.

En la Figura 17 se muestra la frecuencia de manchas totales en donde se aprecia que la respuesta no es lineal, teniendo variación en el rango de las diferentes concentraciones utilizadas ( $2.00E-14$  a  $2.00E+01$ mM). En comparación con el testigo de sacarosa al 5%, se observó que la frecuencia de manchas totales obtenidas fue alta en todas las concentraciones probadas, aunque el mayor número de manchas se obtuvo en las concentraciones más bajas:  $2.00E-14$ ,  $1.00E-12$ ,  $9.00E-12$  y  $6.00E-10$ . En la Figura 17, las flechas señalan las concentraciones seleccionadas para la siguiente etapa experimental.

En la distribución de la frecuencia de células por mancha de la Figura 18, se muestran manchas de mayor tamaño comparadas con el testigo en las concentraciones de  $9.00E-12$ ,  $2.00E-6$ ,  $2.00E-5$ ,  $4.90E-03$ ,  $7.81E-02$  y  $2.00E+01$ mM. La mayoría de las manchas que se encontraron eran chicas para todas las concentraciones, con una mayor frecuencia comparada con el testigo. Las flechas señalan las concentraciones seleccionadas para la siguiente etapa experimental.

En la distribución del número de manchas por mosca (Fig. 19) se observó que en todas las concentraciones se encontraron moscas que no presentan ninguna mancha aunque en todas es menor la frecuencia comparada con el testigo. Además se muestran organismos que presentan mayor número de manchas/mosca en las concentraciones:  $1.00E-13$ ,  $9.00E-12$ ,  $7.00E-11$ ,  $4.00E-08$ ,  $3.00E-07$ ,  $2.00E-05$  y  $1.25E+00$  mM con cuatro manchas por mosca. Aunque en un número bajo, se registraron moscas con 6 manchas en la concentración  $2.00E-06$ . Las flechas señalan las concentraciones seleccionadas para la siguiente etapa experimental.

Se seleccionaron cuatro concentraciones:  $2.00E-14$ ,  $9.00E-12$ ,  $2.00E-06$  y  $7.81E-02$  que fueron la base para el experimento con las cepas seleccionadas con (+) y (-) fecundidad, debido a que las diferentes respuestas obtenidas en los distintos parámetros presentaron comportamientos similares (concentraciones seleccionadas señaladas en la Fig. 17, 18 y 19).

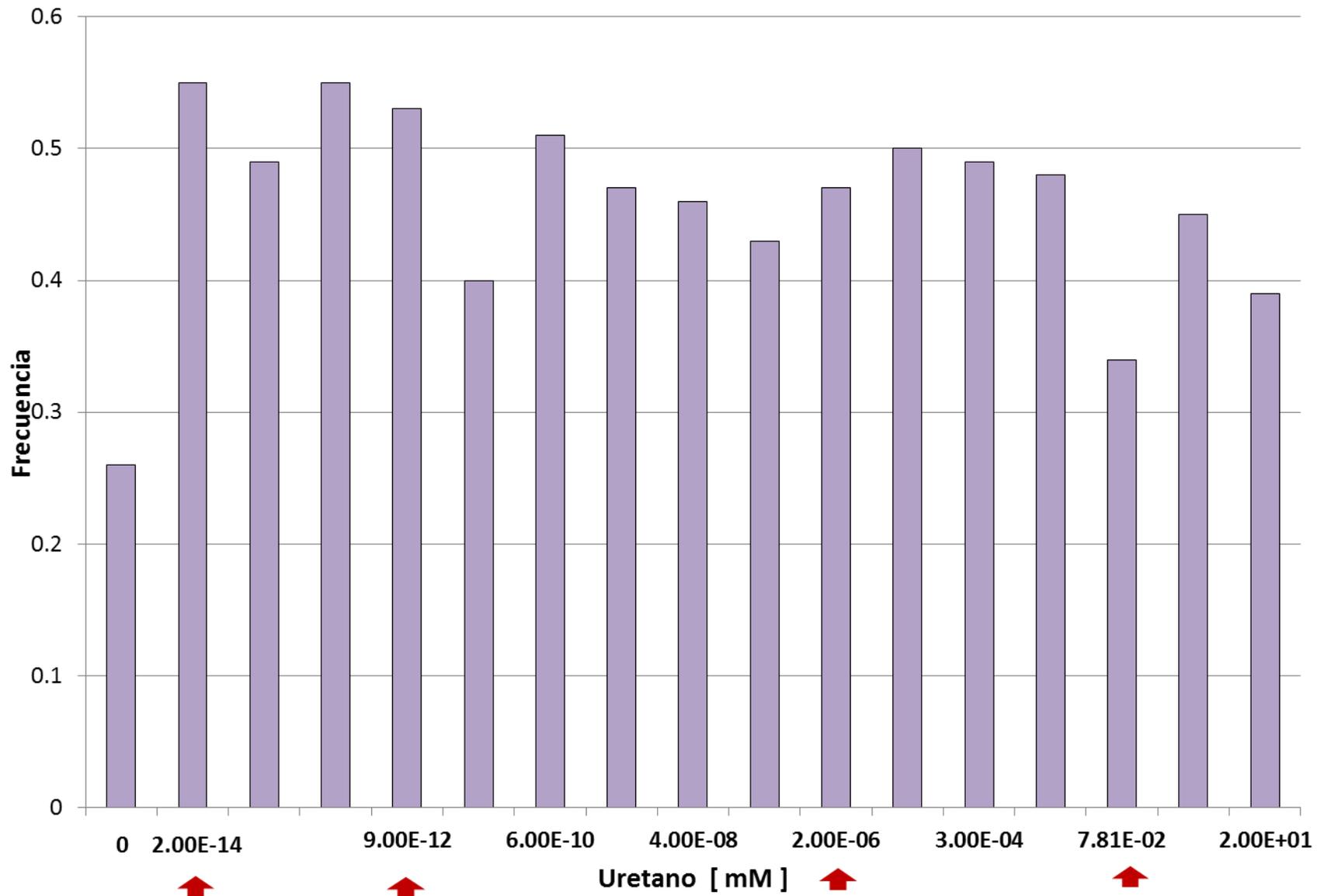


Fig. 17 Inducción de mutación somática y recombinación mitótica en moscas LI tratadas con uretano, con una respuesta no lineal y afectando a concentraciones bajas probada (las flechas señalan las concentraciones seleccionadas para la siguiente etapa experimental).

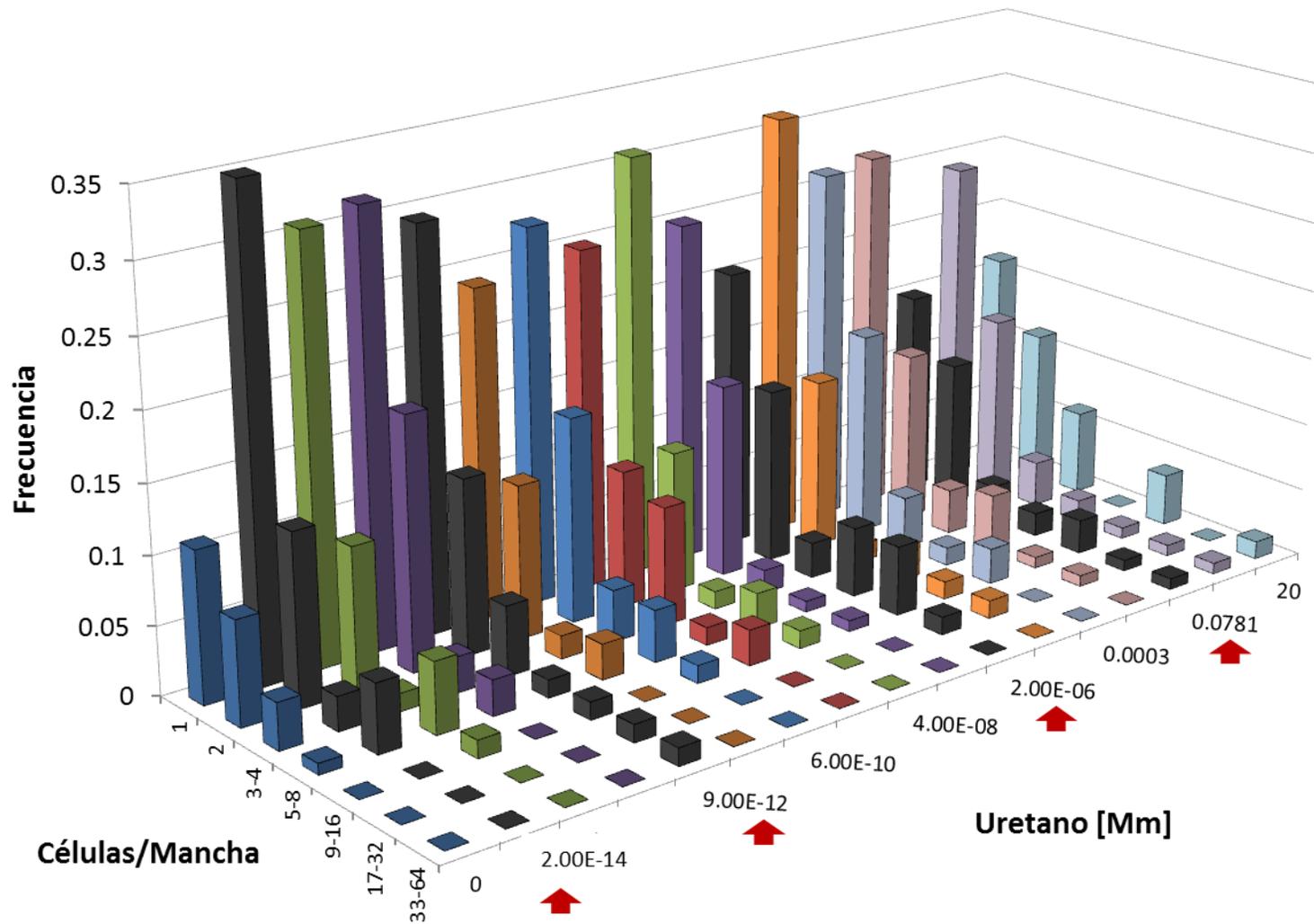


Fig. 18 Distribución de la frecuencia de células por mancha en moscas LI tratadas con uretano, donde se observa la presencia de un mayor número de manchas chicas en todas las concentraciones probadas (las flechas señalan las concentraciones seleccionadas para la siguiente etapa experimental)

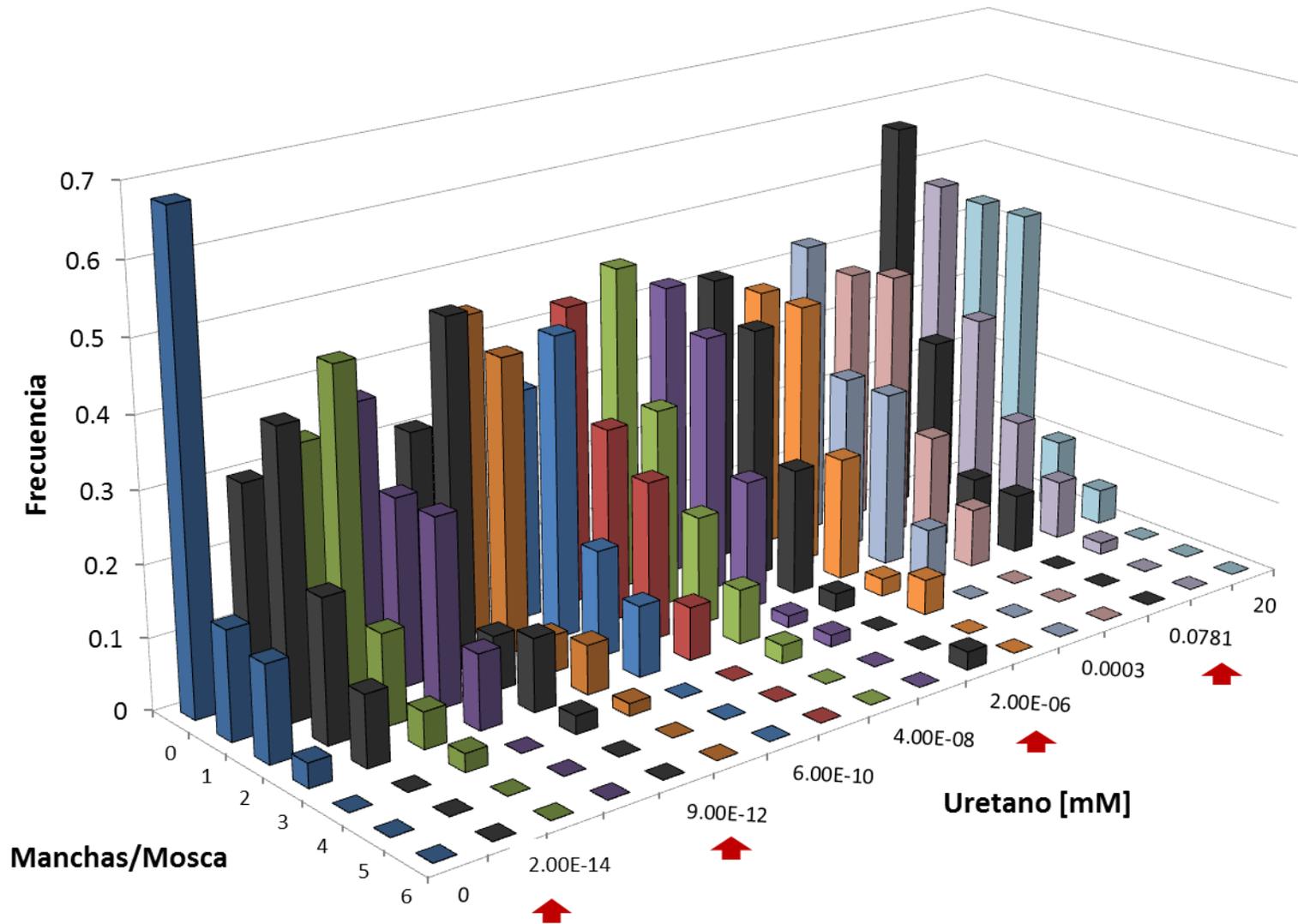


Fig. 19 Distribución de la frecuencia de manchas por mosca en moscas LI tratadas con uretano, que nos muestra la susceptibilidad de los organismos, por presentar moscas sin manchas en todas las concentraciones y moscas con cuatro o seis manchas en diferentes concentraciones (las flechas señalan las concentraciones seleccionadas para la siguiente etapa experimental).

### 6.3. Genotoxicidad del uretano en cepas seleccionadas

#### 6.3.1. Índice de Supervivencia y Proporción Sexual

En las cepas seleccionadas también se obtuvo el Índice de Supervivencia y la Proporción Sexual para las cepas con (+) y (-) fecundidad, en la tabla VII y VIII se presentan estos valores de cada una de las concentraciones probadas 2.00E-14, 9.00E-12, 2.00E-06, 7.81E-02mM y el testigo de sacarosa al 5%. En las moscas con (+) y (-) fecundidad, la supervivencia de las LI y las PI tiene una tendencia similar en las diferentes concentraciones probadas comparadas con el testigo. Un aspecto interesante es que en ambas cruza, se recobraron más moscas PI en todas las concentraciones, aunque la diferencia no fue significativa ( $p > 0.05$ ).

Con la finalidad de comparar la toxicidad del tratamiento en ambos tipos de moscas se obtuvo el Índice de Supervivencia para lo cual, la supervivencia de cada concentración se dividió entre la supervivencia del testigo, de esta manera, en ambos tipos de cruza, el testigo tiene el valor de 1 (Fig. 20). Aunque no hay diferencias significativas, hay un comportamiento opuesto, en relación al total de las moscas de (+) y (-) fecundidad en el Índice de Supervivencia, ya que se recuperan menos moscas en la cruza de (+) fecundidad en las concentraciones 9.00E-12 y 2.00E-06, mientras que se recuperan más moscas en las mismas concentraciones en la cruza de (-) fecundidad.

En el caso de la Proporción Sexual para las moscas LI y PI de las cepas seleccionadas para (+) y (-) fecundidad, se observó una misma tendencia en todas las concentraciones tanto en hembras como machos (Tabla VII y VIII).

**Tabla VII. Supervivencia (promedio  $\pm$  ee) y Proporción Sexual (promedio  $\pm$  ee) de moscas LI y PI (+) fecundidad tratadas con uretano, en donde en la Supervivencia para ambas moscas muestran una misma tendencia, mientras que en la Proporción Sexual no se ve afectada**

[ ] mM	LI						PI							
	N	Promedio* $\pm$ ee		Proporción Sexual				N	Promedio* $\pm$ ee		Proporción Sexual			
				♀		♂					♀		♂	
0	168	28.00	$\pm$ 7.28	0.46	$\pm$ 0.06	0.54	$\pm$ 0.06	168	28.00	$\pm$ 5.17	0.45	$\pm$ 0.04	0.55	$\pm$ 0.05
2.00E-14	151	25.17	$\pm$ 6.09	0.47	$\pm$ 0.02	0.53	$\pm$ 0.02	187	31.17	$\pm$ 5.65	0.48	$\pm$ 0.02	0.52	$\pm$ 0.02
9.00E-12	139	23.17	$\pm$ 4.47	0.47	$\pm$ 0.06	0.53	$\pm$ 0.06	157	26.17	$\pm$ 4.11	0.44	$\pm$ 0.03	0.56	$\pm$ 0.04
2.00E-06	129	21.50	$\pm$ 5.49	0.58	$\pm$ 0.09	0.42	$\pm$ 0.09	165	27.50	$\pm$ 6.32	0.48	$\pm$ 0.03	0.52	$\pm$ 0.03
7.81E-02	159	26.50	$\pm$ 3.92	0.48	$\pm$ 0.03	0.52	$\pm$ 0.03	175	29.17	$\pm$ 4.20	0.43	$\pm$ 0.03	0.57	$\pm$ 0.03

\*Promedio por tubo

Tabla VIII. Supervivencia (promedio  $\pm$  ee) y Proporción Sexual (promedio  $\pm$  ee) de moscas LI y PI (-) fecundidad tratadas con uretano, en donde también se presenta en Supervivencia una misma tendencia para ambas moscas y la PS no se ve afectada.

[ ] mM	LI					PI				
	N	Promedio* $\pm$ ee	Proporción Sexual		N	Promedio* $\pm$ ee	Proporción Sexual			
			♀	♂			♀	♂		
0	99	19.80 $\pm$ 4.75	0.43 $\pm$ 0.04	0.57 $\pm$ 0.04	105	21.00 $\pm$ 5.87	0.51 $\pm$ 0.06	0.49 $\pm$ 0.05		
2.00E-14	93	18.60 $\pm$ 3.87	0.51 $\pm$ 0.03	0.49 $\pm$ 0.03	102	20.40 $\pm$ 3.46	0.44 $\pm$ 0.06	0.56 $\pm$ 0.07		
9.00E-12	105	21.00 $\pm$ 4.58	0.50 $\pm$ 0.06	0.50 $\pm$ 0.06	117	23.40 $\pm$ 4.76	0.40 $\pm$ 0.05	0.60 $\pm$ 0.06		
2.00E-06	97	19.40 $\pm$ 2.66	0.42 $\pm$ 0.07	0.58 $\pm$ 0.07	107	21.40 $\pm$ 3.99	0.51 $\pm$ 0.04	0.49 $\pm$ 0.03		
7.81E-02	75	15.00 $\pm$ 1.79	0.54 $\pm$ 0.08	0.46 $\pm$ 0.08	101	20.20 $\pm$ 2.33	0.38 $\pm$ 0.04	0.62 $\pm$ 0.07		

\*Promedio por tubo

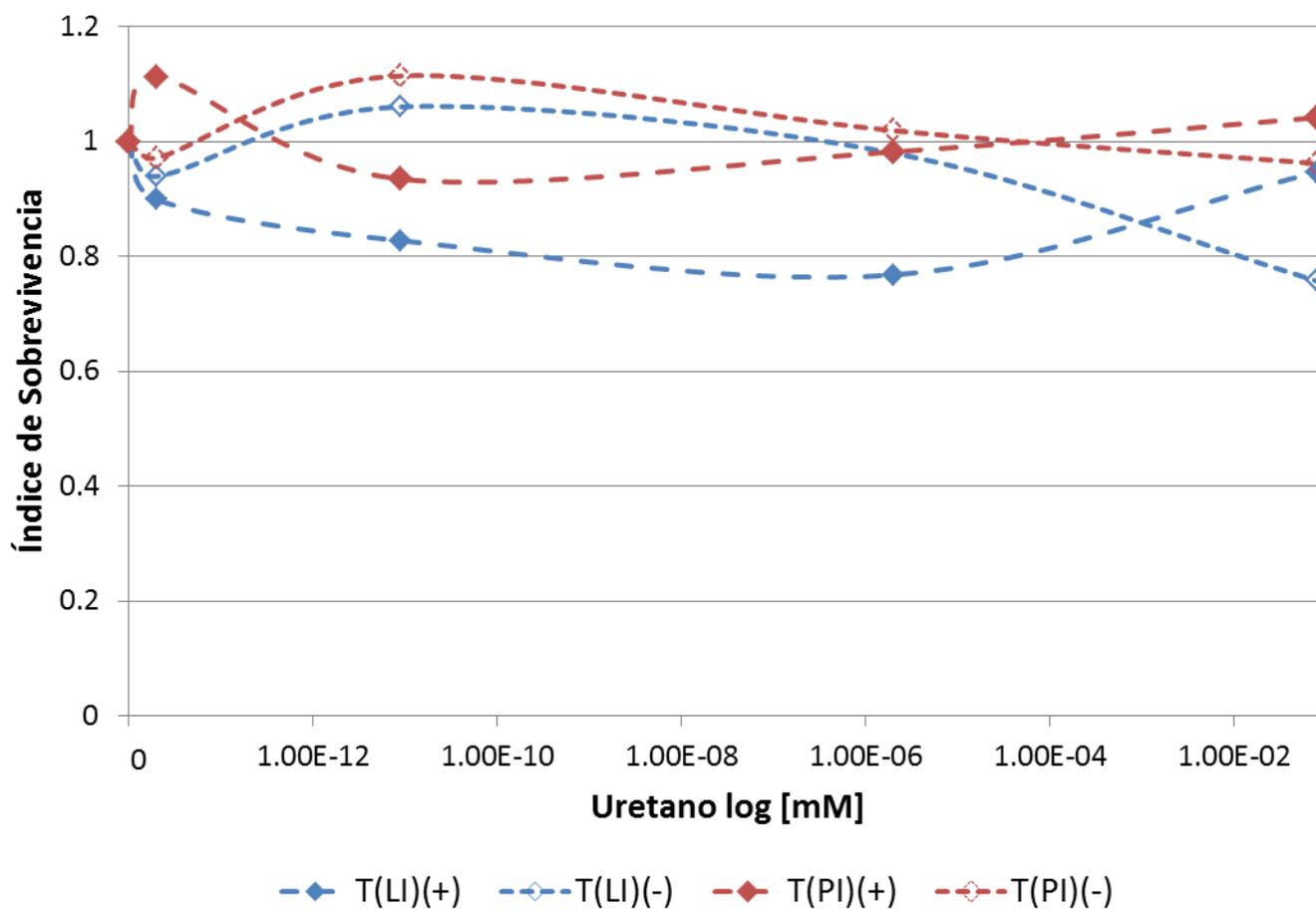


Fig. 20 Índice de Supervivencia de moscas de moscas seleccionadas LI y PI tratadas con uretano, que muestra un comportamiento opuesto entre las moscas de (+) fecundidad y (-) fecundidad.

### 6.3.2. Inducción de Mutación Somática y Recombinación Mitótica en cepas seleccionadas para alta y baja fecundidad (+ y -)

Para la determinación de la respuesta de genotoxicidad del uretano en relación con la fecundidad, se realizaron dos cruza experimentales, una con las cepas seleccionadas para alta fecundidad y la otra con las cepas seleccionadas para baja fecundidad. En las tablas IX y X se muestra la frecuencia de manchas obtenidas para ambas cruza experimentales. En la cruza de (+) fecundidad no se obtuvo ningún resultado positivo y sólo en la concentración 2.00E-14, se encontró mayor número de manchas totales comparadas con las demás concentraciones, lo que dio lugar a un único resultado indeterminado (i) en la concentración más baja utilizada (Tabla IX).

En la Tabla X, al comparar la frecuencia de manchas totales en la cruza con baja fecundidad, se muestra que la concentración de 2.00E-06, es la que presenta una mayor frecuencia, dando lugar a un resultado positivo (+) para el compuesto, además de que en las concentraciones 2.00E-14, 9.00E-12 y 7.81E-02 fueron muy similares aunque no dieron resultados positivos.

**Tabla IX. Frecuencia de manchas obtenidas en las alas de moscas con alta (+) fecundidad que solo mostró un resultado indeterminado**

[ ] mM	N° de Alas	Manchas chicas (1-2 células)		Manchas grandes (> 2 células)		Manchas gemelas		Totales	
		m=2		m=5		m=5			
		Frecuencia	*	Frecuencia	*	Frecuencia	*	Frecuencia	*
0	120	0.35		0.04		0.01		0.4	
2.00E-14	120	0.45	(-)	0.08	(i)	0.02	(i)	0.54	(i)
9.00E-12	120	0.38	(-)	0.04	(-)	0.01	(-)	0.43	(-)
2.00E-06	118	0.31	(-)	0.05	(-)	0.03	(-)	0.39	(-)
7.81E-02	120	0.38	(-)	0.04	(-)	0.01	(-)	0.43	(-)

\*Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (Mutation Res., 203 (1988) 297-308): (+)= positivo; (-)=negativo; (i)=indeterminado. (m)=factor múltiple, nivel de probabilidad:  $\alpha=0.05$ .

**Tabla X. Frecuencia de manchas obtenidas en las alas de moscas con baja (-) fecundidad en donde se obtuvo un resultado positivo**

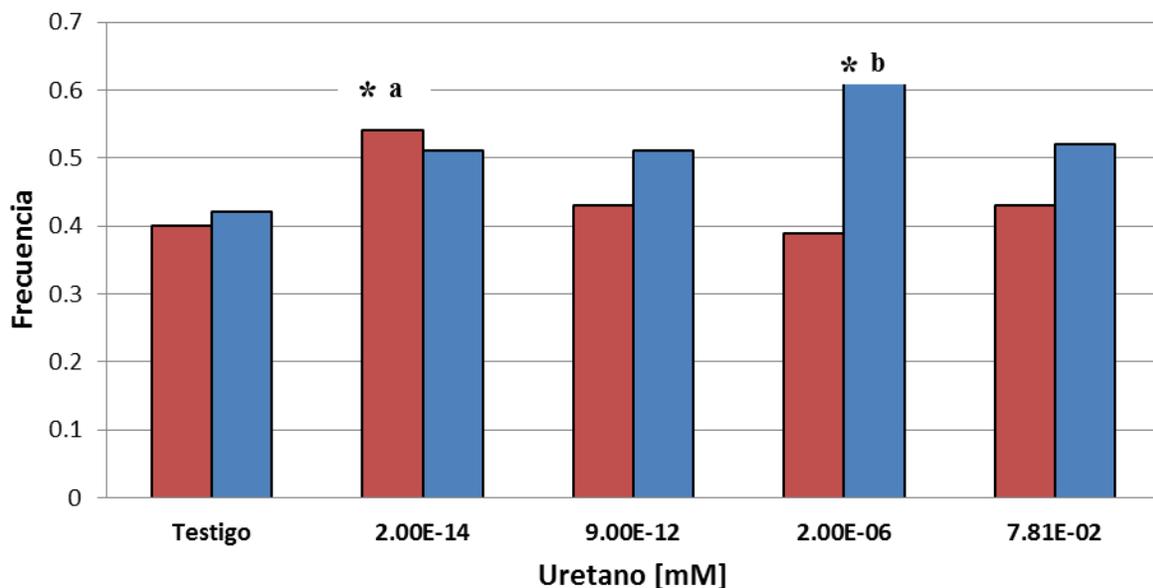
Al	[ ] mM	N° de Alas	Manchas chicas (1-2 células)		Manchas grandes (> 2 células)		Manchas gemelas		Totales	
			m=2		m=5		m=5			
			Frecuencia	*	Frecuencia	*	Frecuencia	*	Frecuencia	*
	0	120	0.33		0.06		0.03		0.42	
	2.00E-14	120	0.41	(-)	0.07	(-)	0.03	(-)	0.51	(-)
	9.00E-12	118	0.4	(-)	0.09	(-)	0.02	(-)	0.51	(-)
	2.00E-06	118	0.5	(+)	0.09	(-)	0.02	(-)	0.61	(+)
	7.81E-02	120	0.42	(-)	0.07	(-)	0.04	(-)	0.52	(-)

\*Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (Mutation Res., 203 (1988) 297-308): (+)= positivo; (-)=negativo; (i)=indeterminado. (m)=factor múltiple, nivel de probabilidad:  $\alpha=0.05$ .

Al comparar gráficamente la frecuencia de manchas totales de las cruces experimentales para alta y baja fecundidad (Fig. 21) encontramos una respuesta diferente. En el caso de las de (+) fecundidad la única concentración que es significativa en comparación con el testigo es 2.00E-14 que fue la más baja probada, y que muestra un mayor número de manchas totales ( $p < 0.05$ ).

La cepa de (-) fecundidad muestra un mayor número de manchas principalmente en la concentración de 2.00E-06, siendo significativo en comparación con el testigo ( $p < 0.05$ ), mientras que las concentraciones 2.00E-14, 9.00E-12 y 7.81E-02 presentan una tendencia similar pero no son significativas ( $p > 0.05$ ).

En la comparación se encontraron diferencias significativas en la respuesta de genotoxicidad de las dos cruces en las concentraciones 2.00E-14 y 2.00E-06 (Prueba Z,  $p < 0.05$ ) en donde las moscas de (+) fecundidad presentan menor número de manchas comparadas con las de (-) fecundidad que tienen una mayor frecuencia.



\* Diferente respuesta con respecto al testigo

<sup>a</sup> <sup>b</sup> Diferencia entre las moscas de (+) y (-) fecundidad    ■ (+)    ■ (-)

**Fig. 21** Comparación de la frecuencia de manchas totales de las moscas de (+) y (-) fecundidad en donde se observa que las cepas de alta fecundidad muestran menor número de manchas, mientras que las cepas de baja fecundidad muestran un mayor número de manchas.

En la distribución del tamaño de las manchas (células por mancha) en las cruces experimentales, se encontró que la distribución del tamaño de la mancha muestra diferencias. En el caso de la cruce de (+) fecundidad la concentración  $2.00E-14$  presenta un mayor número de manchas chicas comparada con el testigo. Se recobraron manchas de mayor tamaño en las concentraciones:  $2.00E-14$ ,  $2.00E-06$  y  $7.81E-02$ , comparadas con el testigo de sacarosa al 5% (Fig. 22).

En la Figura 23, la frecuencia de células por mancha en moscas de (-) fecundidad es significativo el número de manchas chicas en todas las concentraciones, mientras que la presencia de manchas grandes es más visible en  $9.00E-12$ ,  $2.00E-06$  y  $7.81E-02$ , comparadas con el testigo y con la población de (+) fecundidad.

En la distribución de la frecuencia de manchas por mosca se observa que en las moscas de (+) fecundidad (Fig.24), se recobraron organismos que no presentaron ninguna mancha en todas las concentraciones, pero también moscas que mostraron de dos a cinco manchas por individuo, siendo más evidente en concentraciones como  $9.00E-12$ ,  $2.00E-06$  y  $7.81E-02$ mM, en relación con el testigo.

En las moscas de (-) fecundidad (Fig.25) se observa que en todas las concentraciones se presentaron organismos sin manchas aunque en la concentración más baja ( $2.00E-14$ ) fue mayor el número de moscas con esta característica. Mientras que en las concentraciones de  $9.00E-12$ ,  $2.00E-06$  y  $7.81E-02$ , se recobraron organismos que presentan un mayor número de manchas con respecto al testigo y también a la población de (+) fecundidad.

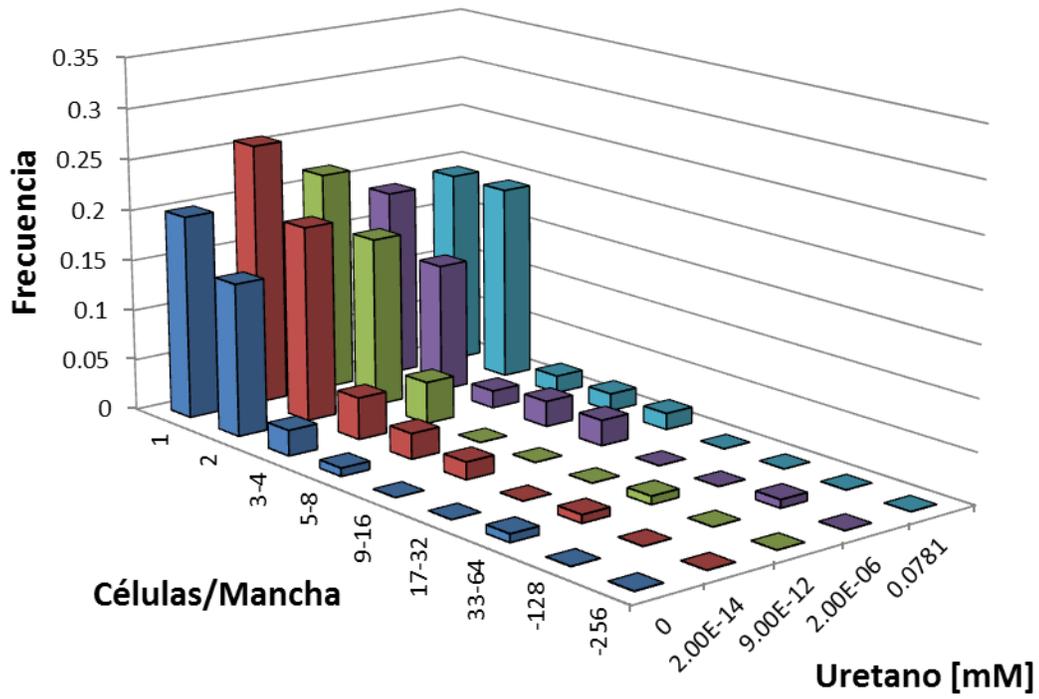


Fig. 22 Distribución de la frecuencia de células por mancha de las moscas de (+) fecundidad.

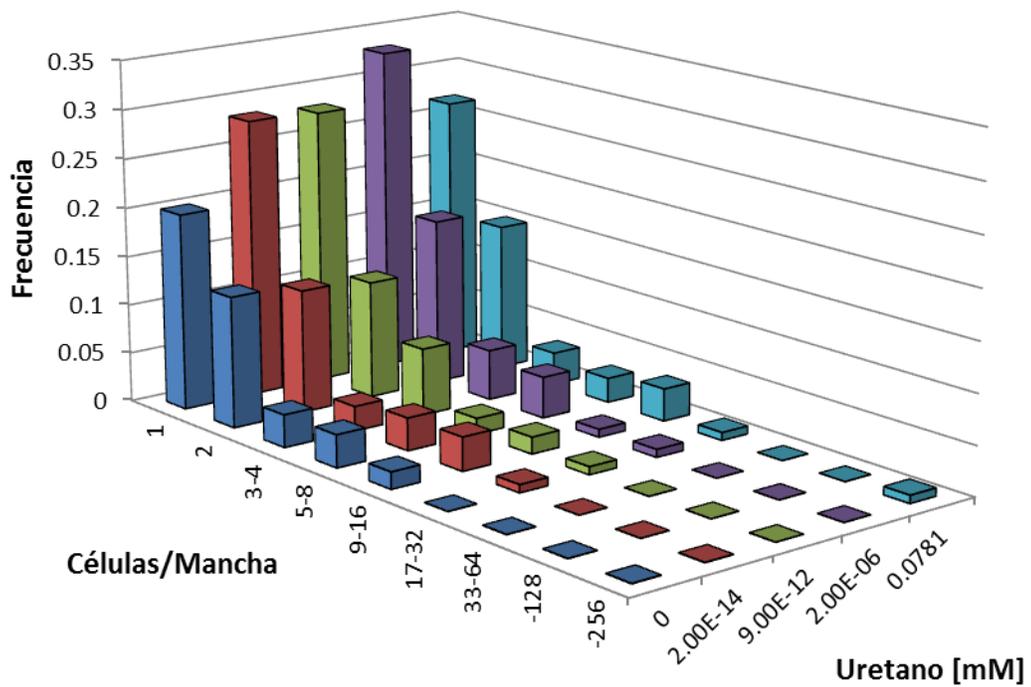


Fig. 23 Distribución de la frecuencia de células por mancha de las moscas de (-) fecundidad.

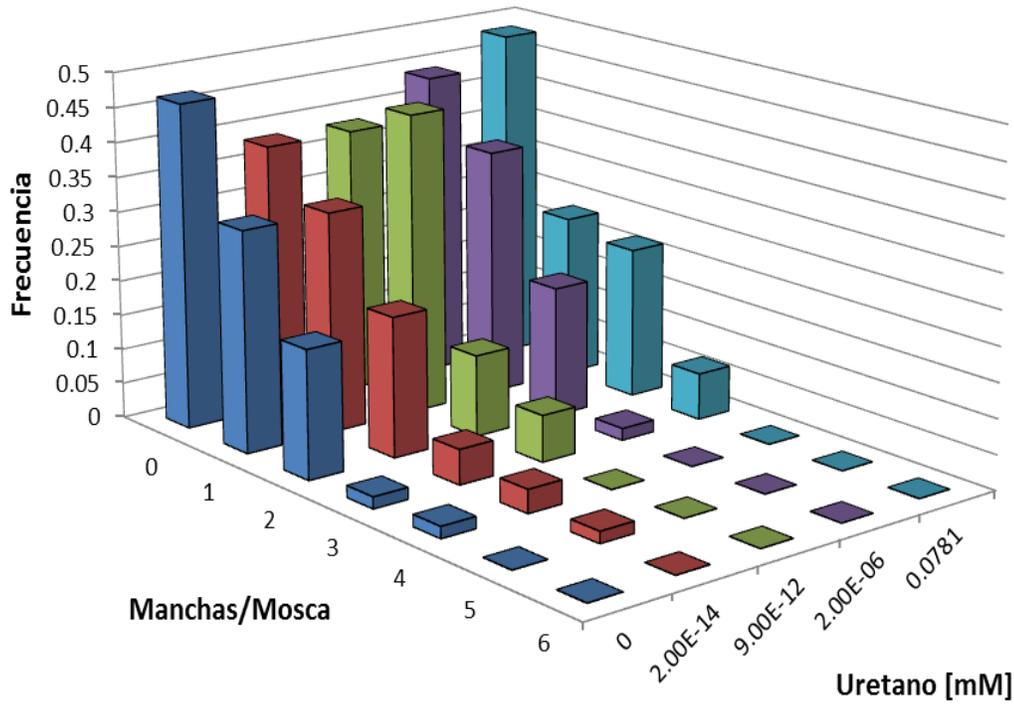


Fig. 24 Distribución de la frecuencia de manchas por mosca de la cepa seleccionada de (+) fecundidad.

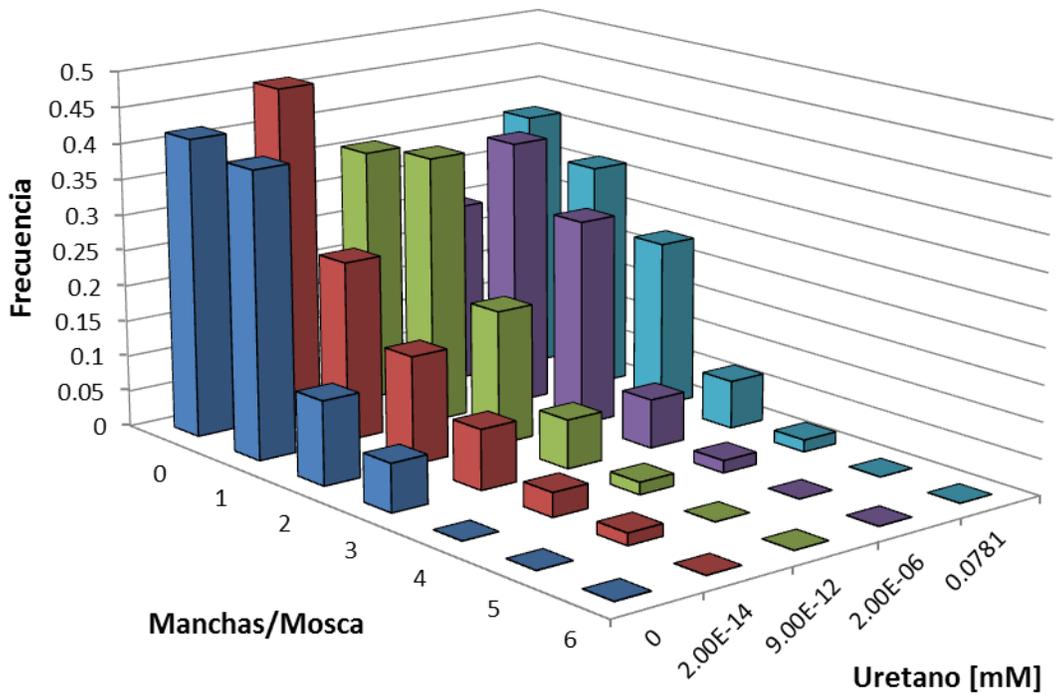
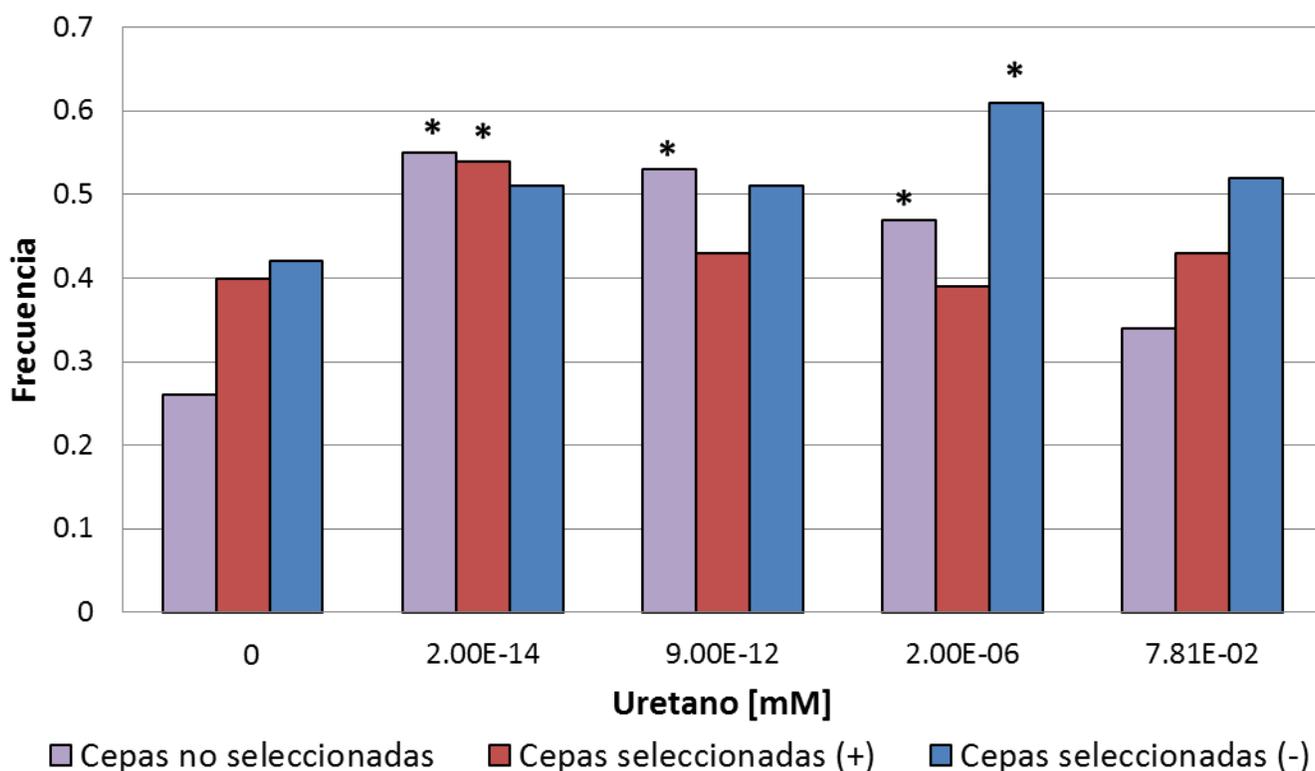


Fig. 25 Distribución de la frecuencia de manchas por mosca de la cepa seleccionada de (-) fecundidad.

#### 6.4. Comparación de la frecuencia de manchas totales inducidas por el uretano en cepas no seleccionadas y seleccionadas

En la Figura 26 se compara la frecuencia de manchas totales de cuatro concentraciones  $2.00E-14$ ,  $9.00E-12$ ,  $2.00E-06$  y  $7.81E-02$  que fueron las concentraciones seleccionadas en la primera parte, incluyendo al testigo de sacarosa al 5%. En esta se muestra la respuesta de las cepas no seleccionadas y las cepas seleccionadas por su fecundidad, tratadas con uretano. En la cruce con cepas no seleccionadas, la frecuencia de manchas totales es significativa con respecto al testigo, encontrando que en concentraciones bajas como  $2.00E-14$  y  $9.00E-12$ , se obtuvo una mayor frecuencia y conforme la concentración



\* Diferente respuesta con respecto al testigo

aumenta la frecuencia disminuye pero sigue siendo significativa ( $p < 0.05$ ).

**Fig. 26 Comparación de la frecuencia de manchas totales en cepas no seleccionadas y seleccionadas observando una tendencia diferente entre las cepas no seleccionadas y las cepas de (+) y (-) fecundidad.**

Al comparar la frecuencia de las cepas se observa que desde el testigo, las cepas seleccionadas tienen un comportamiento diferente. Las cruces experimentales para alta y

baja fecundidad ((+) y (-)) tienen una tendencia opuesta a lo largo de todas las concentraciones. Para la cruce con alta (+) fecundidad, 2.00E-14 es la concentración con la mayor frecuencia encontrada y a partir de ésta, la frecuencia es menor y similar al testigo. En contraste, en la cruce con baja (-) fecundidad, la frecuencia de manchas en las distintas concentraciones es mayor al testigo, pero sólo significativa en 2.00E-06 ( $p < 0.05$ ).

### 6.5. Progenie de moscas libres de inversiones (LI) y portadoras de inversiones (PI)

Para continuar el seguimiento de las cepas seleccionadas ya tratadas con uretano en relación al número de hijos, se recobró la progenie de las moscas LI y PI para cruces con alta y baja fecundidad. Los resultados observados para las LI (+) y (-) se muestran en las Figuras 27 y 28.

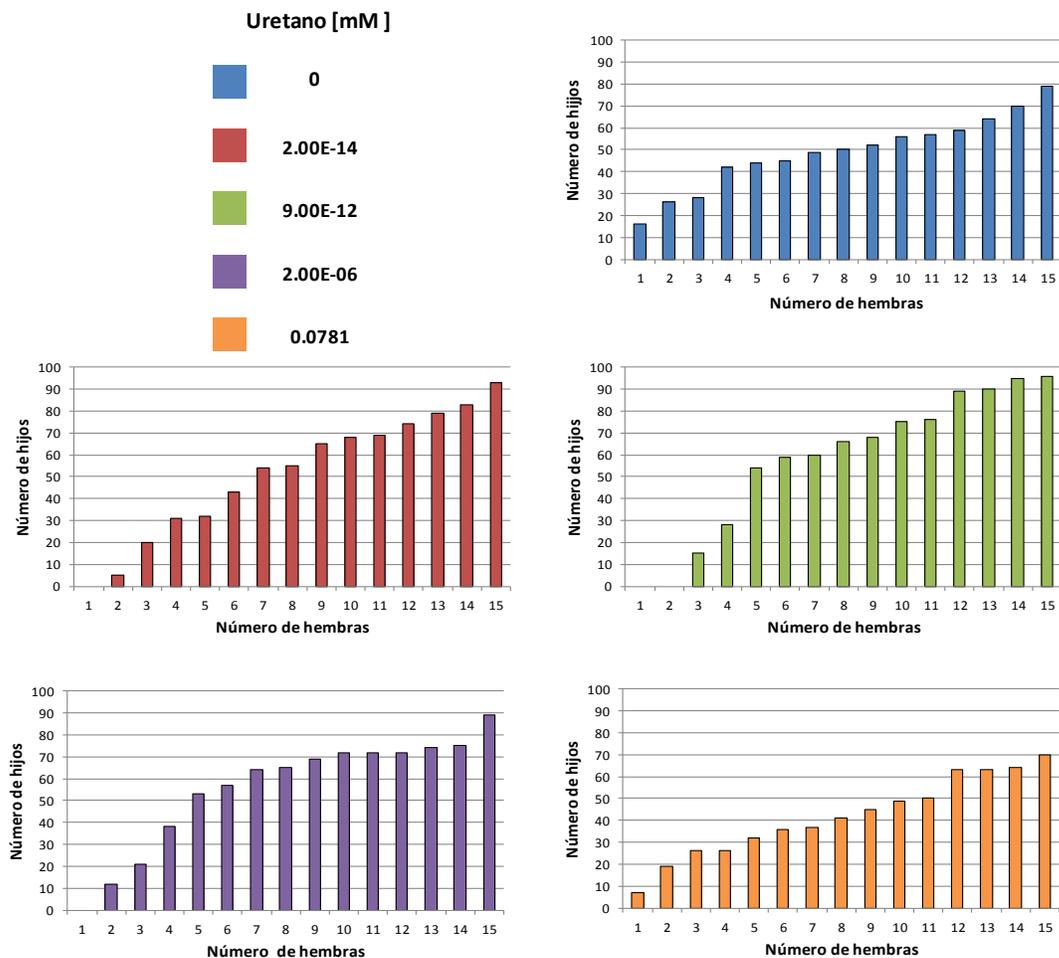


Fig.27 Progenie por hembra LI (+) fecundidad tratadas con uretano

La progenie de moscas LI de la cruce con alta fecundidad, muestra que en concentraciones  $2.00E-14$ ,  $9.00E-12$  y  $2.00E-06$  se recobraron familias con un mayor número de hijos que las familias testigo (0), y en la mayor concentración probada de  $7.81E-02$ , se encontró menor número en comparación con el testigo (Fig.27). En la progenie de las LI (-) se recobraron más familias con un número bajo de hijos, comparado con las familias testigo (Fig. 28).

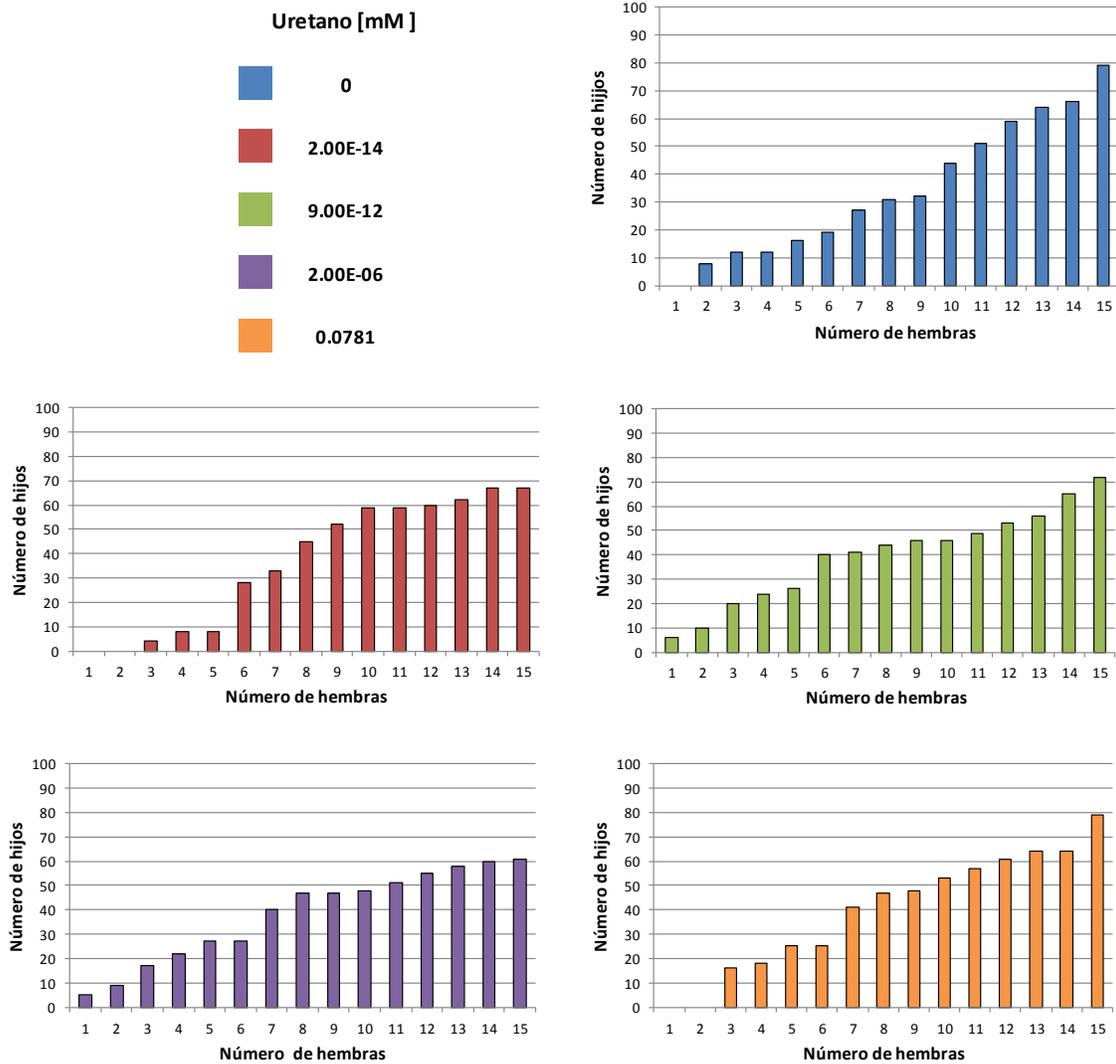
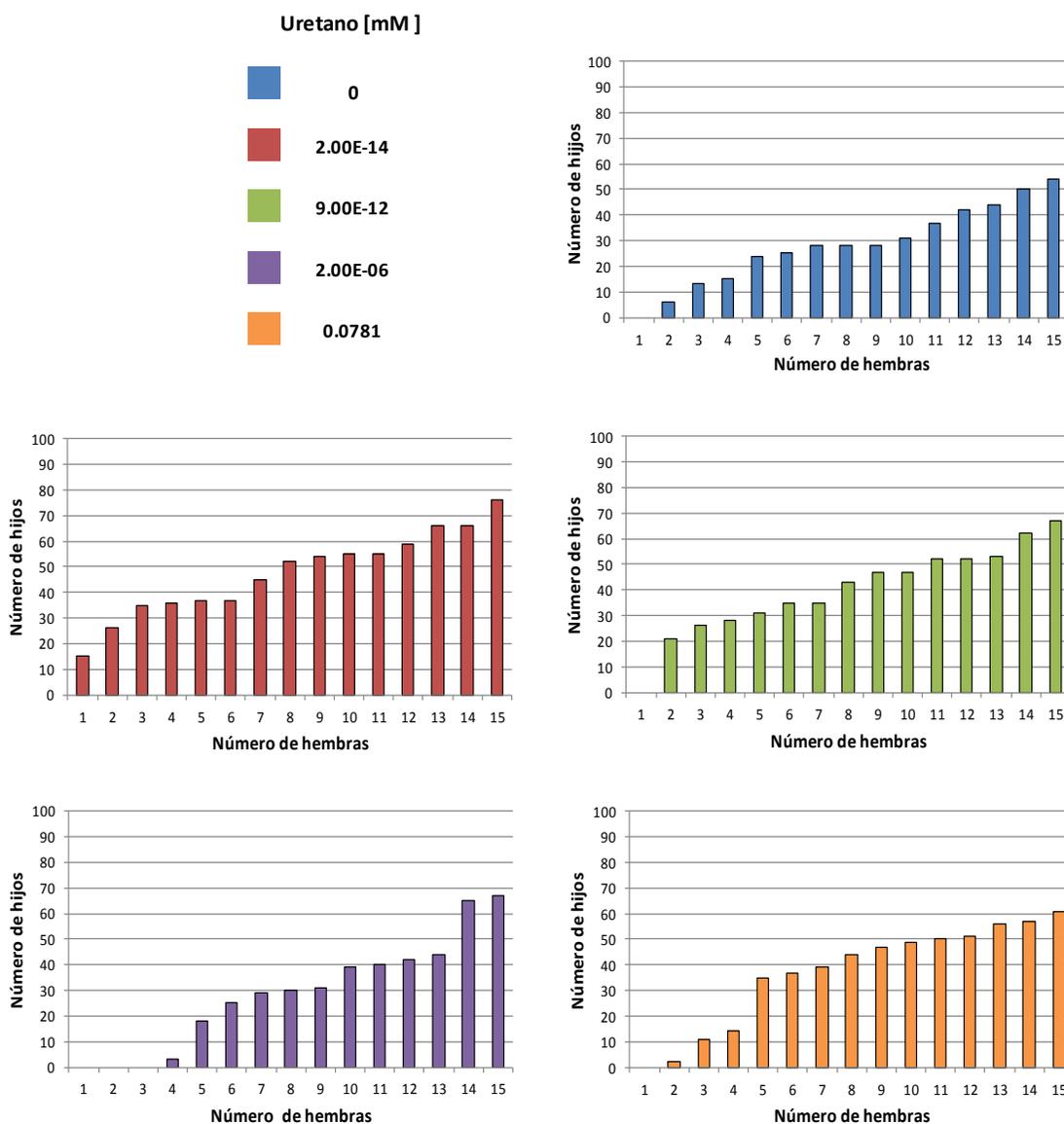
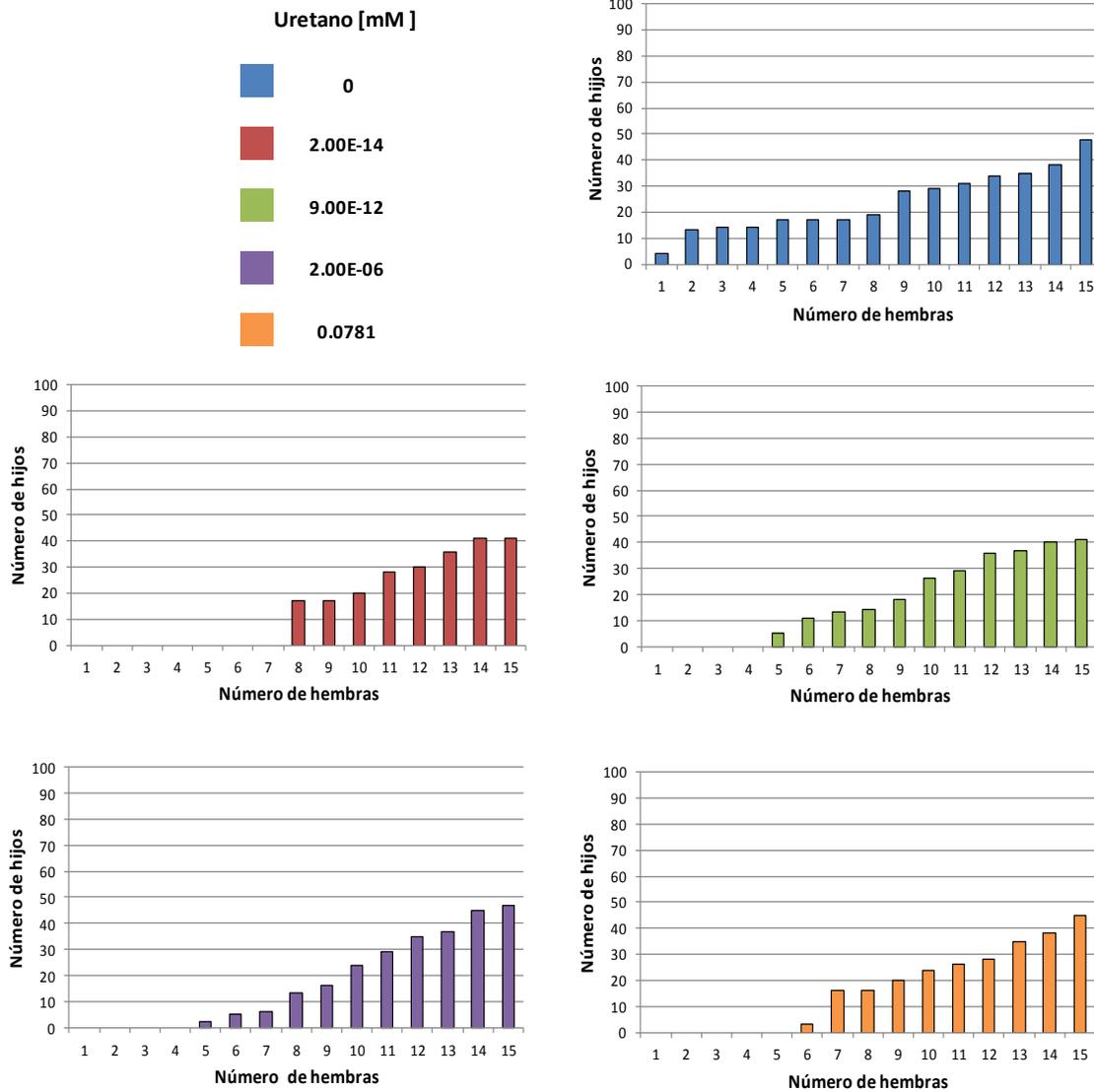


Fig.28 Progenie por hembra LI (-) fecundidad tratadas con uretano

Los resultados de la progenie de las moscas PI (+) (Fig.29) tuvieron una tendencia variable, ya que el número de hijos en todas las concentraciones probadas fue mayor con relación al testigo, particularmente en la progenie de moscas LI tratadas con la concentración 2.00E-14. La progenie obtenida de las moscas PI (-) se muestra en la Figura 30. En todas las series experimentales se recobraron menos progenie que en las familias testigo, además de que algunas hembras resultaron estériles.



**Fig. 29 Progenie por hembra PI (+) fecundidad tratadas con uretano**



**Fig. 30 Progenie por hembra PI (-) fecundidad tratadas con uretano**

Para determinar si el efecto de la selección para alta y baja fecundidad estaba presente en la progenie de las moscas tratadas, se recobró la progenie en tubos individuales para calcular la progenie promedio por hembra de las moscas LI y PI provenientes de las cruza con alta y baja fecundidad. En la Figura 31, se muestra el promedio de las moscas LI, el cual claramente es diferente entre las provenientes de las cruza experimentales con alta y baja fecundidad. En las moscas LI (+) las concentraciones 2.00E-14, 9.00E-12 y 2.00E-06 en relación con el testigo no son significativas y son similares, sólo la 7.81E-02 es menor, mientras que las moscas LI (-) el promedio es igual en todas las concentraciones comparadas con el testigo.

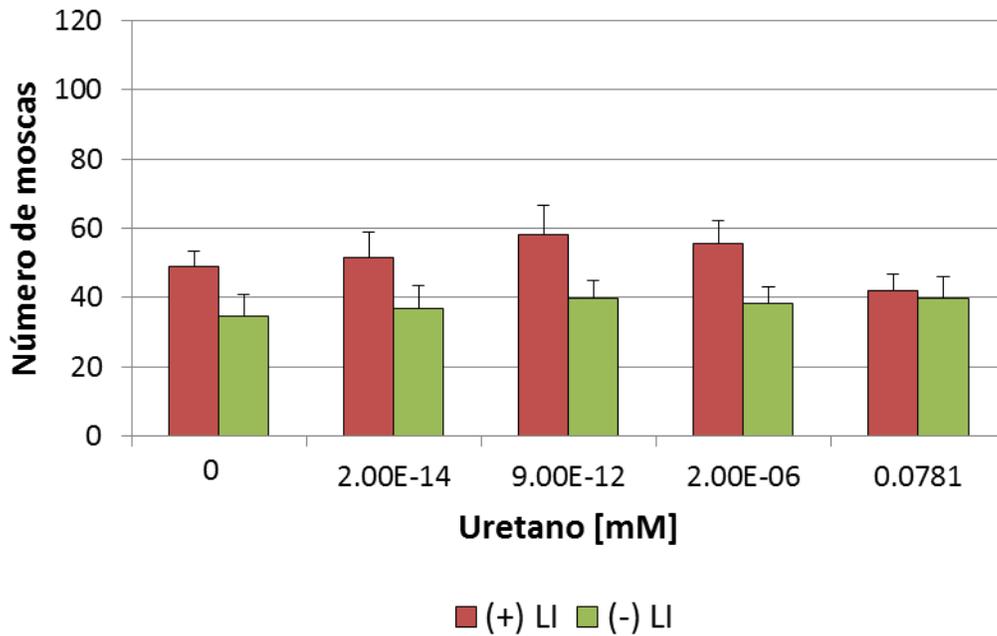


Fig. 31 Progenie promedio por tubo de moscas LI (+) y (-) fecundidad tratadas con uretano.

Para las moscas portadoras de inversiones se encontró una tendencia similar, pues la progenie de las PI (+) se conserva siendo mayor en 2.00E-14 y 9.00E-12. Y las moscas PI (-) se mantienen ligeramente menor a la de las moscas testigo (Fig. 32).

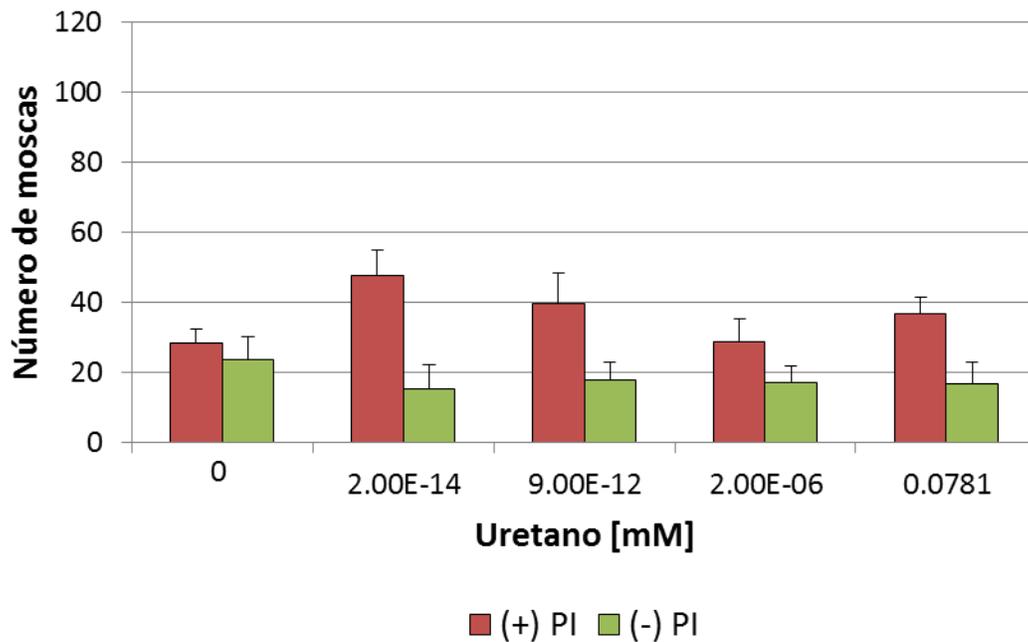


Fig. 32 Progenie promedio por tubo de moscas PI (+) y (-) fecundidad tratadas con uretano

## 7. DISCUSIÓN

En la actualidad uno de los problemas generados por la actividad humana es la degradación de ecosistemas naturales así como los daños en los organismos ocasionados por la contaminación y una gran cantidad de compuestos sintéticos utilizados en diferentes actividades como la industria y la agricultura. El estudio de la exposición a compuestos tóxicos de los organismos implica una serie de investigaciones para poder tener información que indique los factores de riesgo que éstos pueden ocasionar en los diferentes niveles de estudio (Markert, *et. al.*, 2003).

Las herramientas que faciliten estas investigaciones necesitan de ciertas características como la obtención de resultados en un corto tiempo, que se obtenga información confiable y que permitan realizar los estudios de forma más precisa acerca de los riesgos por la exposición. Los biomarcadores son herramientas que permiten la evaluación de los posibles riesgos por la exposición a agentes tóxicos, permitiendo encontrar la causa o la presencia de un compuesto o de un grupo de compuestos tóxicos (Evenden & Depledge, 1997).

La selección de biomarcadores en los estudios de toxicología requiere de un proceso para determinar cualidades como especificidad, sensibilidad, reproducibilidad y repetitividad que permitan la validación de un marcador biológico. En el presente trabajo se propone a la capacidad reproductiva como un potencial biomarcador para estimar riesgo biológico por exposición a contaminantes ambientales, lo que podría convertirse en un indicador útil para detectar efectos en los niveles más altos de organización (Peña, *et. al.*, 2001; Evenden & Depledge, 1997; Lagadic, *et. al.*, 2000).

En el presente estudio se realizó una selección de organismos con relación a la cantidad de progenie obteniendo cepas seleccionadas para alta y baja fecundidad, lo que fue utilizado como un biomarcador a nivel de población para comprender la susceptibilidad y la resistencia de los organismos con base en la capacidad reproductiva cuando son expuestos ante un factor de presión como la exposición a un mutágeno de referencia como el uretano.

Debido a que el tipo de biomarcador utilizado con respecto al nivel de organización representa importantes implicaciones ecológicas directas, también puede presentar algunas desventajas como ser un estudio que requiera más tiempo, comparado con otros como los sistemas bacterianos y ser poco específico (Markert, *et. al.*, 2003). En este contexto, el manejo de un biomarcador validado como lo es la prueba de Mutación Somática y Recombinación Mitótica (SMART) facilita obtener información útil para interpretar el proceso de calibración de un biomarcador alternativo como podría ser la fecundidad como parte fundamental de la capacidad reproductiva de los organismos.

En este trabajo la utilización de cepas no seleccionadas determinó cómo el compuesto de referencia afectaba por medio de un tratamiento agudo (corto tiempo) a determinadas concentraciones, además de obtener indicadores como el Índice de Supervivencia, Proporción Sexual y la genotoxicidad del uretano por medio de la Inducción de Mutación Somática y Recombinación Mitótica que diera paso a la elección de concentraciones y permitiera la obtención de una curva de concentración-efecto, para evaluar además cómo los organismos respondían y si eran capaces de tener una respuesta que fuera visible a bajas concentraciones.

El IS muestra la cantidad de organismos que se recuperan después del tratamiento. Se observó que algunas concentraciones causaron más efecto que otras, pero en general, las concentraciones más bajas fueron las que resultaron más tóxicas para los organismos expuestos, además de que la respuesta no es lineal con respecto a la concentración. Esta respuesta podría estar asociada al fenómeno conocido como hormesis, en donde se observa que en la relación dosis-respuesta se presenta una estimulación en bajas dosis y una inhibición en dosis altas en agentes potencialmente tóxicos (Stebbing, 1982; Calabrese, *et. al.*, 1999; Gems & Partridge, 2008). Con relación a la Proporción Sexual no se encontró evidencia de que el uretano afectara preferencialmente a uno de los sexos, en ninguna de las cruces utilizadas. Por lo que se determinó que el uretano afecta a *Drosophila melanogaster*, no sólo en concentraciones altas y durante periodos largos (IARC, 2010), sino que también este organismo es capaz de detectar las concentraciones bajas y en periodos cortos de exposición.

En la evaluación de la genotoxicidad se determinó que el compuesto es positivo en la mayoría de las concentraciones, obteniendo la curva de concentración-efecto por medio de la frecuencia de manchas totales, corroborando que el uretano es un compuesto que en *Drosophila melanogaster* es genotóxico en células somáticas, en concentraciones altas y bajas, lo que concuerda con otros reportes (IARC, 2010; Frölich & Würigler, 1990; Graf & van Shaik, 1992). El análisis de los parámetros de frecuencia de células por mancha y frecuencia de manchas por mosca permite obtener información de la actividad del compuesto y la susceptibilidad de los organismos, teniendo un resultado adicional al efecto de una exposición, ya no sólo a nivel de un biomarcador, sino a nivel del organismo completo (Graf, *et. al.*, 1984; Ramos-Morales, *et. a.*, 2000). Así, la utilización de estos diferentes indicadores más el IS y la PS en un amplio rango de concentraciones mostró un comportamiento similar en concentraciones muy particulares, permitiendo una selección.

Las cepas seleccionadas fueron expuestas al uretano obteniendo los indicadores IS y PS, en donde nos indica que las moscas de (+) y (-) fecundidad están respondiendo de forma diferente. En adición, en las cruza experimentales, las moscas PI presentan mayor sobrevivencia en todas las concentraciones comparadas con las LI, sin importar si provienen de la crusa con alta o baja fecundidad. Esta respuesta de las moscas PI, podría estar relacionado con su composición genética, específicamente por la presencia del marcador para el color de cuerpo ébano (*e*) (Lindsley & Grell, 1972; Ashburner *et. al.*, 2005; Graf *et. al.*, 1983), ya que estas moscas son homocigotas para dicho marcador, el cual se ha encontrado que está relacionado con genes que participan en el metabolismo de xenobióticos (Muñoz, 2011; Wittkopp *et. al.*, 2002), por lo que eso implicaría una posibilidad de que estas moscas presenten una mejor capacidad para responder ante un compuesto como puede ser el uretano. Otra alternativa es que la presencia del cromosoma balanceador interfiera con la capacidad de las moscas para metabolizar al uretano, por lo que la concentración disponible de éste sería menor en las moscas con inversiones múltiples, lo cual les favorece para sobrevivir (García, 2006).

Un biomarcador a un nivel celular como el daño genotóxico en donde se puede obtener una respuesta a corto plazo representa puntos clave, ya que tiene un significado

ecológico pues puede estar directamente relacionado con la reproducción de los organismos (Markert, *et. al.*, 2003). Para tener más elementos para interpretar la información generada por la fecundidad de los organismos, en paralelo se evaluó la Inducción de mutación y recombinación mitótica en las cruza experimentales con alta y baja fecundidad.

Como primer indicador se realizó la comparación de la frecuencia de manchas totales en donde de igual forma ambas cruza muestran diferencias en la obtención de manchas, menor número de manchas en las de alta fecundidad y un mayor número en las de baja fecundidad, lo que podría estar indicando que los organismos están respondiendo de forma diferente ante la exposición de un genotóxico y que esto de alguna manera está relacionado con la cantidad de progenie (Markert., *et. al.*, 2003).

En ecología evolutiva el *trade off* consiste en cómo los organismos, ante un recurso limitado o en condiciones ambientales desfavorables (Hoffmann & Sgró, 2004), tienden a una selección de rasgos, ya que implican un determinado gasto de energía y de recursos. Estos rasgos pueden ser longevidad, crecimiento, descendencia o características morfológicas, que requieren de un mayor mantenimiento por lo que los recursos se destinan a un solo rasgo el cual tiene que ser a costa de otro (Agrawal *et. al.*, 2010); esto indicaría que la fecundidad puede estar relacionada con la respuesta de genotoxicidad de los organismos.

La distribución del tamaño de manchas (células por mancha), muestra de manera general el momento en que se produjo el daño por el compuesto, así como la genotoxicidad por la obtención de manchas chicas y grandes. En el caso de la cruza con alta fecundidad se observa la presencia de manchas chicas en su mayoría lo que muestra que el compuesto es metabolizado y el daño ocurre en etapas tardías del desarrollo del organismo (Ramos-Morales *et. al.*, 2000).

La cruza con baja fecundidad también mostró una presencia notable de manchas chicas, mayor aún que la de las moscas con alta fecundidad; pero en esta cruza también se presentaron manchas grandes, lo que podría ser evidencia de que después de la inducción del daño éstas lograron repararse y seguir con el proceso de división mitótica. Aunque

también es importante mencionar que esta diferencia en la frecuencia de células por mancha puede también estar implicado en que el daño genotóxico podría no ser evidente debido a la pérdida de la célula afectada (Dorantes, 2000; Ramos-Morales *et. al*, 2000) lo que podría haberse presentado para la cruce con alta fecundidad en la que se recobraron menor número de manchas (Ramos-Morales, 2000).

En la determinación de la susceptibilidad de los organismos se obtuvo la frecuencia de manchas por mosca, observando que la cruce con alta fecundidad presenta un mayor número de moscas sin manchas, y en el caso de las moscas de baja fecundidad aunque presentan un menor número de moscas sin manchas, también muestran un mayor número de moscas con manchas en todas las concentraciones probadas. Indicando una respuesta compleja al obtener la susceptibilidad a nivel individual (Ramos-Morales *et. al.*, 2000) para cada una de las poblaciones, en este caso las dos cepas seleccionadas por su fecundidad, mostraron evidencia del daño ocasionado por el uretano y una respuesta distinta de ambas cepas seleccionadas.

La comparación de las cepas no seleccionadas y las seleccionadas por su cantidad de progenie permitió determinar que los organismos al haber sido seleccionados por su fecundidad muestran una respuesta distinta en comparación con las cepas no seleccionadas con respecto a la frecuencia basal de manchas en las alas. En las cepas no seleccionadas, la frecuencia de manchas en las alas es menor que en las cepas seleccionadas para baja y alta fecundidad (Fig. 33). Sin embargo, al exponerlas al uretano, las moscas de (+) fecundidad tienen una frecuencia de manchas totales menor en comparación con las moscas de (-) fecundidad que presentaron un mayor número de manchas. Se requiere continuar con la exploración de esta relación para determinar si la diferencia se basa en aspectos metabólicos o en la capacidad de reparación del daño inducido por el tratamiento.

Para comprobar la respuesta de los organismos de acuerdo con la fecundidad, se obtuvo la progenie de las cepas seleccionadas una vez tratadas con el compuesto de referencia, en donde se recobró la progenie de las moscas LI y PI para ambas cruces experimentales. La progenie de los organismos que fueron expuestos mostró una

tendencia similar con relación al mantenimiento de la característica de alta y baja fecundidad, determinando que esta característica se está pasando a la siguiente generación, incluyendo además la respuesta que se está encontrando al tratar a los organismos con un compuesto tóxico.



Fig. 33 Esquema que representa las cepas seleccionadas por su fecundidad en relación con la frecuencia de manchas obtenidas.

En la comparación del promedio de la progenie obtenida, es clara la respuesta que están teniendo, ya que en el caso de las LI (+) y PI (+) hay una variación a lo largo de las diferentes concentraciones, mientras que las LI (-) y PI (-) tienden a comportarse de forma muy similar y en relación al testigo no hay tanta variación. Por lo que se podría señalar que las moscas provenientes de la cruce con baja fecundidad muestran menor variación en las concentraciones probadas que las de alta fecundidad. La fecundidad es un rasgo poligénico que es sensible a las condiciones ambientales de manera que se puede inducir una respuesta de emergencia a condiciones ambientales desfavorables, y con el tiempo este rasgo puede mejorar formando parte de la historia de la vida de los organismos en aspectos ecológicos y evolutivos (Agrawal *et. al.*, 2010).

*Drosophila melanogaster* es un organismo que permite la evaluación de la genotoxicidad en concentraciones bajas que resultan en este caso ser tóxicas, además de permitir realizar en este modelo un estudio en donde se pueda evaluar un biomarcador celular al estudiar la genotoxicidad en células somáticas y validado por las múltiples variables que se obtienen para dar paso a la indagación de un nuevo biomarcador a nivel

población. El estudio de rasgos como la fecundidad son poco estudiados por la complejidad que representan, pero la selección de organismos por su cantidad de prole en esta mosca permitió la obtención de cepas con alta y baja fecundidad.

La respuesta obtenida para ambas cepas seleccionadas mostró una relación entre fecundidad y la frecuencia de mutación por medio de diferentes indicadores, identificando una respuesta que puede resultar posiblemente positiva para los organismos con baja fecundidad observando una mejor capacidad de reparación, mientras que las de alta fecundidad se vieron afectadas.

La utilización de biomarcadores para la evaluación de riesgos es fundamental, y para su estudio es importante la búsqueda de marcadores que brinden información más precisa, siendo principalmente los específicos que implican mayor tiempo y son costosos. Sin embargo las características de un modelo biológico como *Drosophila melanogaster* pueden permitir la búsqueda de biomarcadores en diferentes niveles de organización, proponiendo nuevos estudios en donde se evalúen dos marcadores de manera simultánea que complementen la obtención de información.

## 8. CONCLUSIONES

- ✓ *Drosophila melanogaster* es un organismo que por su facilidad de manejo permite la selección de organismos con base a su fecundidad.
- ✓ *Drosophila melanogaster* es capaz de responder genotóxicamente a concentraciones bajas y periodos cortos de exposición.
- ✓ Las cepas seleccionadas con (-) fecundidad podrían tener una mejor capacidad de reparación de daño, comparadas con la de (+) fecundidad.
- ✓ La frecuencia de mutación de las cepas de (+) y (-) fecundidad es diferente a la frecuencia de mutación de las cepas no seleccionadas.

## 9. PERSPECTIVAS

- ❖ Evaluar a la fecundidad como un biomarcador ante otros factores de presión.
- ❖ Realizar estudios en relación a la capacidad de reparación de daño en células somáticas y que puedan estar relacionadas con la fecundidad.

## 10. REFERENCIAS

- Adams, , M. D., Celniker S. E., Holt R. A., Evans C. A., Gocayne J. D. Amanatides P. G., Scherer S. E., Li P. W., Hoskins R. A., Galle R. F., George R. A., Lewis S. E., Richards S., Ashburner M., Henderson S. N., Sutton G. G., Wortman J. R., Yandell M. D., Zhang Q., Chen L. X., Brandon R. C., Rogers Y.H.C., Blazej R. G. , Champe M., Pfeiffer B. D., Wan R. K., Doyle C., Baxter E. V.Helt G., Nelson C. R., Miklos G. L. G., Abril J. F., Agbayani A., An H.-J., Pfannkoch C. A., Baldwin D., Ballew R. M., Basu A., Baxendale J., Bayraktaroglu L., Beasley E. Beeson K. Y., Benos P. V., Berman B. P., Bhandari D.Bolshakov S., Borkova D., Botchan M. R., Bouck J., Brokstein P., Brottier P., Burtis K. C., Busam D. A., Butler H., Cadieu E., Center A., Chandra I., 1, & Cherry J. M., Cawley S., Dahlke C., Davenport L. B., Davies P., Pablos B., Delcher A., Deng Z., M. A. D. and col. (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461), 2185–2195. doi:10.1126/science.287.5461.2185
- Abe, S. & Sasaki M. (1977). Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells exposed to various chemicals. *J. Nat. Cancer Inst.*, 58: 1635–1641.
- Adam, P. & Baron F. A. (1965). Esters of carbamatic acid. *Chem. Rev.*, 65. 567-602.
- Adler, I.D., Anderson D., Benigni R. (1996). Synthesis report of the step project detection of germ cell mutagens. *Mutat Res*, 353: 65–84.
- Agrawal, A. A., Conner K. J. & Rasmann S. (2010). Evolution since Darwin: the first 150 years. *Chapter 10 Tradeoffs and negative correlations in evolutionary ecology*. Sunderland, Mass: U.S. 243-268pp.
- Arango, V. Sandra. (2012). Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*; 30(1):75-82.
- Arellano-Aguilar, Rodolfo Omar. (2002). *Drosophila como modelo in vivo para evaluar el potencial genotóxico de muestras ambientales*. Los Azufres, Mich. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 61pp.
- Ashburner, M., Golic K. G., & Hawley R. S. (2005). *Drosophila a Laboratory Handbook*. 2<sup>a</sup> edition. Editorial Cold Spring Harbor, New York. 1409pp.
- Ashby, J. & Kilbey B. (1981). Summary report on the performance of bacterial repair, phage induction, degranulation, and nuclear enlargement assays. In: De Serres F.J. and Ashby J. eds, *Progress in Mutation Research, Vol. I: Evaluation of Short-term Tests for Carcinogens. Report of the International Collaborative Program*, New York, Elsevier Science, pp. 33–47.

- Bate, M. and Martínez-Arias A. (1993). *The development of Drosophila melanogaster*. 1<sup>a</sup> edición. Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Vol. II. 1558 pp.
- Botas, J. (2007). Drosophila researchers focus on human disease. *Nature genetics*, 39(5), 589–591. doi:10.1038/ng0507-589
- Boyland, E. & Nery. R. (1965). The Metabolism of Urethane and Related Compounds. *Biochem J.*, 94, 198–208.
- Butterworth, M. F., Gunatilaka A., Gonshebbatt M. E. (2000). *Biomonitor and Biomarker as Indicator of Environmental*. Change, Vol. 2. Kluwer Academic Plenum Publishers, New York. 509 pp.
- Calabrese, J. E., Baldwin A. L. & Holland D. C. (1999). Hormesis: A Highly Generalizable and Reproducible Phenomenon with important implication for Risk Assessment. *Risk Analysis*. Vol. 19. N°2. 261-281pp.
- Crebelli, R., Bellincampi D., Conti G., Conti L., Morpungo G. & Carere A. (1986). A comparative study on selected chemical carcinogens for chromosome malsegregation, mitotic crossing-over and forward mutation induction in *Aspergillus nidulans*. *Mutat Res*, 172: 139–149.
- Csukás, I., Gungl E., Fedorcsák I. (1979). Urethane & hydroxyurethane induce sister-chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *Mutat Res*, 67: 315–319.
- Dorantes, V. Y. A. (2000). *Aplicación de Drosophila melanogaster como biomonitor indicador de contaminación acuática*. Tesis de Licenciatura. ENEP Iztacala, UNAM. 65pp.
- Evenden, A. J. & Depledge H. M. (1997). Genetic Susceptibility in Ecosystems: The Challenge for Ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 105 (Suppl 4): 849-854.
- Feyereisen, R., (1999). Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology*, 44, 507-533.
- Frei, H., & Würgler, F. E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from Drosophila assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research*, 203(4), 297–308. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3136327>
- Frei, H. & Würgler, F. E. (1995). Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in Drosophila. *Mutation Research*, 334:247-258.

- Frölich A. & Würigler F.E. (1990). Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing spot test: dependence on genotype-controlled metabolic capacity. *Mutat Res*, 244: 201–208.
- Galli, A. & Schiestl R.H. (1998). Effect of Salmonella assay negative and positive carcinogens on intrachromosomal recombination in S-phase arrested yeast cells. *Mutation Research*, 419: 53–68.
- García Martínez, V. (2006) Participación de inversiones múltiples en la modulación de la respuesta genotóxica de *Drosophila melanogaster*”, Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM,
- García-Bellido & Merriam J. R. (1971). Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster* '. *Developmental Biology*, 87, 61–87.
- Gardner, Eldon John. (1998). *Principios de Genética*. 4<sup>a</sup> edición. Editorial Limusa Wiley. México. 411-424 pp.
- Gems, David & Partridge Linda. (2008). Stress-Response Hormesis and Aging: “That which Does Not Kill Us Makes Us Stronger”. *Cell Metabolism*. Vol. 7 Issue 3. 200-203 pp.
- Ghanayem, B. I. (2007). Inhibition of urethane-induced carcinogenicity in Cyp2e1<sup>-/-</sup> in Comparison to Cyp2e1<sup>+/+</sup> mice. *Toxicological Sciences*, 95(2), 331–339. doi:10.1093/toxsci/kfl158
- Graf, U., Juon, H., Katz, a J., Frei, H. J., & Würigler, F. E. (1983). A pilot study on a new *Drosophila* spot test. *Mutation Research*, 120(4), 233–239. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6406883>
- Graf, U., Würigler, F. E., Katz, a J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B., & Kale, P. G. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*, 6(2), 153–188.
- Graf, U. & van Schaik N. (1992). Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 271: 59-67.
- Griffiths, V. F. A., Miller H. J., Suzuki T. D., Lewontin C. R. & Gelbart M. W. (2002). *Genética*. 7<sup>a</sup> edición. Editorial Mc-Graw-Hill, Interamericana, España. 860pp.
- Guengerich, F. P. & Kim D. H. (1991). Enzymatic oxidation of ethyl carbamate to vinyl carbamate and its role as an intermediate in the formation of 1,N6-ethenoadenosin. *Chem. Res. Toxicol.* 4, 413-421.

- Hara, K. & Harris R.A. (2002). The anesthetic mechanism of urethane: the effects on neurotransmitter-gated ion channels. *Anesth Analg*, 94: 313–318.
- He, S.L, Baker R. & MacGregor J.T. (1991). Micronuclei in mouse skin cells following *in vivo* exposure to benzo[a]pyrene, 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, chrysene, pyrene and urethane. *Environ Mol Mutagen*, 17: 163–168.
- Hoffmann, A. A. & Sgró C. M. (2004). Genetic correlations, tradeoffs and environmental variation. *Heredity* (93), 241-248.
- IARC, I. A. for R. on C. (2010). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Alcohol consumption and ethyl carbamate. *Lyon, France, 96*, 1281–1378.
- Islas, Guzmán María de Jesús. (2006). *Aislamiento de organismos sensibles y resistentes a xenobióticos en cepas de Drosophila melanogaster*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. 85 pp.
- Klaassen, C. D. & Watkins J. B. (2005). *Fundamentos de Toxicología*. 2ª edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana, Barcelona. 536 pp.
- Leithäuser, M.T., Liem A., Steward B. C., Miller E. C. & Miller J. A. (1990). 1,N-6 Ethenoadenosine formation, mutagenicity and murine tumour induction as indicators of the generation of an electrophilic epoxide metabolite of the closely related carcinogens ethyl carbamate and vinyl carbamate. *Carcinogenesis*, 11,463-473.
- Lewis I. Held, JR. (2002). Imaginal discs. *The Genetic and Cellular Logic of Pattern Formation*. 5ª edition. Editorial Press Syndicate of the University of Cambridge. United States of America. 460 pp.
- Lindsley, Dan L. & Grell E.H. (1972). *Genetic variations of Drosophila melanogaster*. 2º edition. Carnegie Institution of Washington Publication. 471pp.
- Lagadic, L., Caquet T., Amiard J. C. & Ramade Francois. (2000). Use of biomarkers for environmental quality assessment. 1ª edition. Science Publishers, Inc. USA. 324pp.
- Markert, B. A., Breure A. M. & Zechmeister H. G. (2003). *Bioindicators and Biomonitors. Principles, concepts and applications*. Vol.6 . 1ª edition. Editorial Elsevier Science. USA. 997pp.
- Muñoz-Hernández, A., Ramos-Morales P. & Muñoz J. A. (2008). *Exploring the mutagenic activity of colchicine in Drosophila*. *Dros. Inf. Serv* 91, 127-133.

- Muñoz, Hernández Adriana. (2011). *Compración del efecto de compuestos citostáticos en la reparación, recombinación y no disyunción mitóticas en Drosophila*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Facultad de Ciencias, UNAM. 133pp.
- Murphy, P.A., Giesel, J.T. & Manlove, M.N. (1983). Temperature effects on life history variation in *Drosophila simulans*. *Evolution* 37: 1181-1192.
- Nomeir, A. A., Ioannou Y. M., Sanders J. M. & Matthews H. B. (1989). Comparative metabolism and disposition of ethyl carbamate (urethane) in male fischer 344 rats and male B6C3F1 mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 97(2). 203-215.
- Nöthinger. (1970). Sucrose density separation: A method for collecting large number of *Drosophila* larvae. *Drosophila Information Service* 45:177.
- OPS, Organización Panamericana de la Salud. (1980). *Principios y métodos para evaluar la toxicidad de las sustancias químicas*. Parte I. OPS/OMS. México. D.F. 287 pp.
- Oster, I.I. (1958). Interactions between ionizing radiation and chemical mutagens. *Zeitschrift für Indukt. Abstammungs Vererbungslehre*, 89: 1–6.
- Paterson, E. Haddow A., Thomas I. A. & Watkinson J. M. (1946). Leukaemia treated with urethane compared with deep X-ray therapy. *Lancet*, 247. 677- 683.
- Pandey, U. B., & Nichols, C. D. (2011). Human Disease Models in *Drosophila melanogaster* and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery. *Pharmacological Reviews*, 63(2), 411–436. doi:10.1124/pr.110.003293.411
- Peña, E. C., Carter E. D. & Fierro-A. F. (2001). *Toxicología Ambiental. Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental*. Southwest Hazardous Waste Program. Universidad de Arizona. 204 pp.
- Pérez, López Ana María. (2008). *Densidad depoblación y selección artificial para la producción de biomasa en Drosophila melanogaster*. Tesis de Doctorado. Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela. 151 pp.
- Petzold, G.L. & Swenberg J.A. (1978). Detection of DNA damage induced *in vivo* following exposure of rats to carcinogens. *Cancer Res*, 38: 1589–1594.
- Ramos-Morales, P., Abundis M. H. M., Gaytán O. J. C., Ordaz T. M. G., Orozco S. P. G., Maldonado L. J., Hernández A. J., González C. E., Reyes M. P., Galicia M. E. M. & Muñoz M. J. A. (1993). *Manual de Laboratorio de Genética para Drosophila melanogaster*. 1ª edición. Editorial McGraw-Hill, México. 131 pp.

- Ramos-Morales, P., Ordaz M. G., Dorantes A., Rivas H., Campos P., Martínez M. & Hernández B. (2000). *Drosophila* is a reliable biomonitor of water pollution. *Biomonitoring and Biomarkers as indicators of Environmental Change 2*. Edited by Butterworth et. al., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. 257-299pp.
- Roberts, G.T. & Allen J.W. (1980). Tissue-specific induction of sister chromatid exchanges by ethyl carbamate in mice. *Environ Mutagen*, 2: 17–26.
- Sharp, D.C. & Parry J.M. (1981). Induction of mitotic gene conversion by 41 coded compounds using the yeast culture *JD1*. In: De Serres F.J. & Ashby J., eds, *Progress in Mutation Research, Vol. I: Evaluation of Short-term Tests for Carcinogens. Report of the International Collaborative Program*, New York, Elsevier Science, pp. 491–501.
- Silbergeld, Ellen K. (2000). *Toxicología. Herramientas y enfoques. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el trabajo*. Capítulo 33.
- Stebbing, A. R. D. (1982). Hormesis. The stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Science of The Total Environment*. Vol. 22, Issue 3. 213-234pp.
- Tariff Commission (1945). *Synthetic Organic Chemicals, United States Production and Sales, 1941-1943*. Second series, Report N°153. Washington DC, US Government Printing Office, 106 pp.
- Tijet, N., Helving C. & Feyereisen R. (2001). The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: Annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Elsevier, Gen*. 262 (1-2), 189.198.
- Timbrell, J. (2002). *Introduction to Toxicology*. 3<sup>a</sup> edition. Editorial Taylor and Francis, London. 229 pp.
- Venitt, S. & Parry J. M. (Eds). (1984). *Mutagenicity Testing: A practical approach*. Chapter 6: *Mutation Test with the Fruit Fly Drosophila melanogaster*. IRL Press, Oxford. 146-185 pp.
- Weber, J. V., & Sharypov, V. I. (2009). Ethyl carbamate in foods and beverages: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 7(3), 233–247. doi:10.1007/s10311-008-0168-8.
- Wittkopp, J. P., True R. J. & Carroll B. S. (2002). Reciprocal functions of the *Drosophila* Yellow and Ebony proteins in the development and evolution of pigment patterns. *Development* (129), 1849-1858.

## Sitios web

IARC, *International Agency for Research on Cancer*. (2013)

<http://www.iarc.fr/>

[Citado en octubre de 2013]

EPA, *Environmental Protection Agency*. (2014)

<http://www.epa.gov/>

[Citado el 25 de abril de 2014]

IPCS, *International Programme on Chemical Safety*. (1993).

World Health Organization. Biomarkers and risk assessment: concept and principles.

<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc155.htm>

[Citado el 12 de julio de 2014]

POLIOLES, *Poliuretanos: materias primas y sistemas*.(2013).

<http://www.polioles.com.mx/poliuretanos.html#inicio>

[Citado el 10 de octubre de 2013]

Tariff Commission. (1945).

<https://archive.org/details/syntheticorganic1944unit>

[Citado en octubre de 2013]

UNAMirada a la Ciencia. (2012).

<http://www.unamiradaalaciencia.unam.mx>

[Citado el 31 de noviembre de 2013]