



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE GEOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**EFFECTOS DEL MERCURIO SOBRE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN
WNT EN OVARIOS ADULTO DE *Drosophila melanogaster***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BERENYCE GONZÁLEZ MARÍN

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA ELENA CALDERÓN SEGURA
CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMOSFERA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNAIZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM**

CD. MX. , SEPTIEMBRE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE GEOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**EFFECTOS DEL MERCURIO SOBRE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN
WNT EN OVARIOS ADULTO DE *Drosophila melanogaster***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BERENYCE GONZÁLEZ MARÍN

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA ELENA CALDERÓN SEGURA
CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNAIZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM**

MÉXICO, CD. MX. SEPTIEMBRE 2018

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por el apoyo proporcionado para la realización y culminación de mi proyecto de maestría.

Agradezco a CONACYT por el apoyo proporcionado para llevar a cabo mis estudios de maestría.

Agradezco al Centro de Ciencias de la Atmósfera por la beca IE CCA proporcionada para la obtención de grado.

Agradezco a mi tutor principal la Dra. María Elena Calderón Segura por su asesoría en el desarrollo del proyecto.

Agradezco a los miembros de mi Comité Tutor la Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz el Dr. Luis Felipe Jiménez García por su valiosa colaboración en el desarrollo de mi tesis.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los integrantes de mi jurado la **Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo**, el **Dr. Edmundo Bonilla González** y el **Dr. Pedro Rafael Valencia Quintana** por sus valiosas aportaciones en la culminación de mi tesis.

Agradezco al Centro de Ciencias de la Atmósfera por proporcionarme la infraestructura y herramientas para el desarrollo experimental de mi proyecto de maestría.

Agradezco a la Facultad de Ciencias por permitir el uso del microscopio confocal.

Agradezco a la secretaría administrativa del Posgrado en Ciencias Biológicas del Instituto de Geología por su colaboración y apoyo en los trámites administrativos

Agradezco al Dr. Andreas Prokop de la Universidad de Manchester en el Reino Unido, por permitir la realización de mi estancia corta de investigación

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco a la Dra. María Elena Calderón Segura por su apoyo, paciencia, comprensión y por ser además de una excelente tutora una excelente mentora, para mí ha sido un honor colaborar y poder aprender de usted.

Agradezco a mi padre José Cruz González Díaz por su valioso apoyo en mi formación académica por su consejos y todo su amor.

Agradezco a Felipe Nieto por sus consejos y por su amor

Agradezco a mis amadas hermanas Tania Cecilia González, Cinthia Marín y Nora González por su amor y apoyo.

Agradezco mi mamá María Luisa Marín, por acompañarme y apoyarme.

Finalmente agradezco a toda mi familia y seres amados que directa e indirectamente aportaron un granito de arena para que yo pueda culminar exitosamente mis estudios de maestría.

Gracias!

DEDICATORIAS

Con todo mi amor y orgullo a mi padre, porque creíste en mí y porque me sacaste adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracia a ti, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuviste impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera, y porque el orgullo que sientes por mí fue lo que me hizo ir hasta el final. Va por ti, por lo que vales, porque admiro tu fortaleza y por lo que has hecho por mí.

A mis amadas hermanas y madre.

Gracias por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida. Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos en los momentos difíciles.

A mi amor Felipe Nieto...

Dentro de mi recorrido por la vida me pude dar cuenta de que hay muchas cosas para las que soy buena, encontré destrezas y habilidades que jamás pensé se desarrollasen en mí, pero lo realmente importante es que pude descubrir que por más que disfrute trabajar sola, siempre obtendré un mejor resultado si lo realizo con la ayuda y compañía perfecta, la tuya...

Dentro del desarrollo de esta tesis se presentaron muchos momentos en los cuales pareciera que los deberes y compromisos fueran a acabar por completo con mi vida y mi existencia, pero también entendí en ese justo momento de dificultad, que la ayuda idónea llega cuando menos la solicitas, en ese momento cuando te vi a mi lado entendí que la persona ideal siempre llega justo a tiempo.

A todos, espero no defraudarlos y contar siempre con su valioso apoyo, sincero e incondicional.

Índice

RESUMEN.....	5
ABSTRACT	7
I INTRODUCCIÓN	9
1.1 Características generales del mercurio	10
1.2 Mercurio orgánico e inorgánico	11
1.3 Usos del mercurio.....	12
1.4 Fuentes de emisión de mercurio naturales y antropogénicas	13
1.5 El ciclo del mercurio en el ambiente.....	14
1.5.1 El mercurio en la atmósfera	14
1.5.2 El mercurio en el suelo	15
1.5.3 El mercurio en los cuerpos de agua	16
1.6 Formas de exposición de mercurio	17
1.7 Vías de ingreso de mercurio al organismo	19
1.8 Toxicocinética y metabolismo del mercurio en el organismo.....	20
1.9 Efectos asociados con la exposición al mercurio	20
II ANTECEDENTES	23
2.1 Propiedades físicas y químicas del cloruro de mercurio	23
2.2 Usos del cloruro de mercurio	23
2.3 Efectos tóxicos del cloruro de mercurio en el organismo	23
2.4 Efectos tóxicos del mercurio a nivel reproductivo	24
2.5 Efectos moleculares y celulares del mercurio	27
2.6 Muerte celular y efectos genotóxicos inducidos por mercurio.....	29
2.7 <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo	31
2.8. La importancia del apareamiento genético en <i>Drosophila melanogaster</i>	33
2.9 Líneas transgénicas en <i>Drosophila melanogaster</i>	34
2.9.1 Transgénesis en <i>Drosophila melanogaster</i>	34
2.9.2 Clases importantes de líneas de moscas transgénicas.....	35
2.10 Descripción general de <i>Drosophila melanogaster</i>	38
2.11 Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	39
2.12 Sistema reproductor de las hembras	40
2.13 Anatomía del germario de <i>Drosophila melanogaster</i>	42
2.14 Ovogénesis en <i>Drosophila melanogaster</i>	44
2.14.1 Células madre germinales en el germario	46
2.14.2 Células madre foliculares en el germario	49

2.15 Vía de señalización Wnt.....	50
2.15.1 Vía Wnt no clásica.	53
2.15.2 Vía Wnt dependiente de Ca ²⁺	54
2.15.3 Vía Wnt / β-catenina o canónica	54
2.15.4 La vía Wnt / β-catenina y su relación con el cáncer.....	56
III. JUSTIFICACIÓN.....	58
IV OBJETIVOS.....	59
V HIPÓTESIS	60
VI MATERIALES Y MÉTODOS	61
6.1 Elaboración de las soluciones de HgCl ₂	61
6.2 Cepas transgénicas de <i>Drosophila melanogaster</i>	61
6.3 Esquema de tratamiento a HgCl ₂	64
6.4 Disección y fijación de ovarios	65
6.5 Análisis morfométrico	66
6.6 Ensayo de fertilidad.....	66
6.7 Inmunofluorescencia en microscopía confocal	67
6.8 Análisis estadístico	67
VII RESULTADOS.....	68
7.1 Morfometría de ovarios de <i>Drosophila melanogaster</i> silvestre Cantón y transgénica <i>Fz3-RFP</i> expuestos y no expuestos a cloruro de mercurio (HgCl ₂).....	72
7.2. Morfometría de ovarios de <i>Drosophila melanogaster Fz3-RFP</i> expuestos y no expuestos a cloruro de mercurio (HgCl ₂).....	70
7.3 Morfometría de ovarios de <i>Drosophila melanogaster</i> de la cepa mutante <i>Chk1,2; Fz3-RFP</i> expuestas y no expuestas a cloruro de mercurio (HgCl ₂).....	72
7.4 Comparación de la morfometría de ovarios de hembras de las cepa transgénica <i>Fz3-RFP</i> y mutante <i>Chk1,2; Fz3-RFP</i> expuestos y no expuestos a cloruro de mercurio (HgCl ₂).....	74
7.5 Promedios de los estadios de ovogénesis en las ovariolas de hembras de la cepa transgénica <i>Fz3-RFP</i>	75
7.6 Promedio de los estadios de ovogénesis en las ovariolas de hembras de la cepa mutante <i>Chk1,2; Fz3-RFP</i>	76
7.7 Tasa de fertilidad en hembras de la cepa transgénica <i>Fz3-RFP</i>	78
7.8 Tasa de fertilidad en hembras de la cepa mutante <i>Chk1,2; Fz3-RFP</i>	79
7.9 Tasa de eclosión de huevos de ensayos de fertilidad de <i>Fz3-RFP</i> y <i>Chk1,2-Fz3-RFP</i> expuestas y no expuestas a cloruro de mercurio.....	80

7.10. Organización celular del germario en ovariolas de hembras transgénicas <i>Fz3-RFP</i> expuestas y no expuestas HgCl ₂ mediante microscopia de fluorescencia confocal	<u>82</u>
7.11. Organización celular del germario en ovariolas de hembras transgénicas <i>Bam-GFP, Fz3-RFP</i> expuestas y no expuestas HgCl ₂ mediante microscopia de fluorescencia confocal.....	<u>84</u>
Organización celular del germario en ovariolas de hembras mutantes <i>Chk1,2; Fz3-RFP</i> expuestas y no expuestas HgCl ₂ mediante microscopia de fluorescencia confocal	<u>86</u>
VIII DISCUSIÓN.....	<u>88</u>
IX CONCLUSIONES	<u>93</u>
X REFERENCIAS	<u>95</u>

RESUMEN

En el presente estudio se analizaron los efectos del mercurio en la vía de señalización Wnt mediante inmunofluorescencia en microscopía confocal en el germario de las ovariolas de *Drosophila melanogaster* silvestre, transgénica *Fz3-RFP* y mutante *Chk1,2;Fz3-RFP*, y su asociación con los cambios en la morfología y estructura, así como en la fertilidad, después de 72 h de exposición a las concentraciones 0.3, 3 y 30 mM de HgCl₂ y 72 h de recuperación. Así como, el papel del daño en el ADN con la cepa mutante de *D. melanogaster Chk1,2; Fz3-RFP*. Los resultados obtenidos evidencian que a 0.3, 3 y 30 mM de HgCl₂ aumenta significativamente la expresión de la vía Wnt en la región 2a y de Bam en la región 1, 2a, y 2b del germario de los ovarios de las hembras transgénica *Fz3-RFP* y mutante *Chk1,2; Fz3-RFP*. Las hembras de *D. melanogaster* transgénica *Fz3-RFP* expuestas a 0.3 mM de HgCl₂, presentan hipertrofia de los ovarios, incremento de las células madre foliculares y foliculares en las región 2a y 2b del germario, en el número de quistes germinales con mayor número de células y de huevos. Sin embargo, *D. melanogaster* mutante *Chk1,2; Fz3-RFP* no muestra cambios en el tamaño de los ovarios. Con 3 mM de HgCl₂, no causa modificaciones en el tamaño de los ovarios de *D. melanogaster Fz3-RFP* y *Chk1,2; Fz3-RFP*, sin embargo, incrementa las células madre foliculares y foliculares en las región 2a y 2b del germario y el número de quistes germinales con disminución en la cantidad de células y del estadio 11 de la ovogénesis y de huevos. No obstante, en la cepa mutante la ovogénesis y el número de huevos no fueron afectados. A la concentración de 30 mM de produce hipotrofia de los ovarios HgCl₂ de las hembras de *D. melanogaster Fz3-RFP*, con reducción en el número de las células madre foliculares y foliculares en las región 2a y 2b del germario; quistes germinales con pocas células, y de los estadios 10a, 10b y 11 de la ovogénesis; el número de ovariolas y de huevos.

En la cepa mutante *Chk1,2; Fz3-RFP* altera la morfología del ovario, reduce el estadio 10b y 11 de la ovogénesis. En la concentración de 30 mM de HgCl₂ reduce significativamente la tasa de fertilidad en las hembras transgénica *Fz3-RFP*, sin embargo, en las *Chk1,2; Fz3-RFP*, la tasa de fertilidad no se modifica. La viabilidad de los embriones ovipositados por ambas cepas disminuye y el desarrollo larvario únicamente alcanza el primero y segundo instar de larva, estos organismos no presentan movimiento ni locomoción.

Este estudio es el primero que identifica algunos mecanismos moleculares, por el cual el mercurio induce cambios en la expresión de la vía Wnt asociado con alteraciones morfológicas, estructurales en el ovario e infertilidad en el organismo modelo transgénico *Fz3-RFP* y mutante *Chk1,2: Fz3-RFP* de *Drosophila melanogaster*.

ABSTRACT

In the present study, the effects of mercury in the Wnt signaling pathway thought immunofluorescence in confocal microscopy in the ovarioles germarium from ovaries of *Drosophila melanogaster* transgenic *Fz3-RFP* and its relationship with morphology and structure changes and fertility after 72 h of exposure at concentrations of 0.3, 3, and 30 mM HgCl₂ plus 72 h of recovery. As well as role DNA damage in mutant strain of *D. melanogaster Chk1,2; Fz3-RFP*. The results obtained showed that at 0.3, 3 and 30 mM of HgCl₂ significantly increases the expression of the Wnt pathway in the 2a region and Bam on the 1, 2a, and 2b regions of the germarium from ovaries in the transgenic females *Fz3-RFP* and mutant *Chk1,2; Fz3-RFP*. It was observed that the females of the transgenic *Fz3-RFP* strain exposed to 0.3 mM of HgCl₂, present hypertrophy of the ovaries, increase of the follicular and follicular stem cells in the 2a and 2b regions of the germarium, and number of germinal cysts with increase in the number of cells and eggs. However, in the mutant strain *Chk1,2; Fz3-RFP*, there were no changes in the size of the ovaries.

At 3 mM of HgCl₂, it does not cause changes in the size of the ovaries from in the transgenic female *Fz3-RFP* and *Chk1,2; Fz3-RFP* mutant, however, it increases the follicular and follicular stem cells in the 2a region and 2b of the germ, and the number of germinal cysts with decrease in the number of cells and stage 11 of oogenesis and eggs. But in the mutant strain the oogenesis and the number of eggs were not affected.

We demonstrate that at 30 mM of HgCl₂ produce hypotrophy of the ovaries from transgenic females of *D. melanogaster Fz3-RFP*, and reduce the follicular and follicular stem cells in the 2a and 2b regions of the germ, and the number of germinal cysts with decrease in the number of cells and stages 10a, 10b and 11 of oogenesis; the number of ovarioles and eggs. In the mutant strain *Chk1,2; Fz3-RFP*, the morphology of the ovary is reduced, stage 10b and 11 of oogenesis are reduced.

At 30 mM of HgCl₂ the females of the transgenic *Fz3-RFP* strains significantly reduce the fertility rate, however, the females *Chk1,2; Fz3-RFP*, the fertility rate is not modified. In addition, the viability of embryos oviposited by both strains decreases and the larval

development only reaches the first and second instar of larva and they do not present movement and locomotion.

This is the first study, which identified some molecular mechanisms such as Wnt signaling pathway with size, morphology and structural changes in ovaries and infertility induced by mercury using as a model organism to *Drosophila melanogaster* transgenic *Fz3-RFP* and *Chk1,2: Fz3-RFP* mutant.

I INTRODUCCIÓN

Los efectos tóxicos del mercurio se han observado desde hace siglos, la expresión «loco como un sombrerero» se acuñó a raíz de los problemas neurológicos que padecían los fabricantes de sombreros por inhalar vapores de nitrato mercúrico. El cloruro de mercurio está presente en polvos y pomadas para la dentición, fue responsable de casos de acrodinia (también llamada «enfermedad rosa») en niños pequeños en la primera mitad del siglo XX. En los años 50, una planta química vertió mercurio en la bahía japonesa de Minamata y contaminó peces que fueron consumidos por los pescadores y sus familias. Otro episodio de intoxicación se produjo en la década de 1970 en Iraq, cuando se consumió erróneamente harina elaborada a partir de semillas contaminadas con un fungicida que contenía metilmercurio. Estos incidentes mostraron de manera espectacular los efectos neurotóxicos del mercurio, particularmente graves en los lactantes que habían estado expuestos durante el período prenatal (Guzzi, 2008).

En los últimos años, la preocupación se ha centrado en la exposición al metilmercurio y a diversas sales, como el cloruro de mercurio, procedente de actividades industriales y mineras (Guzzi, 2008). Los vapores tóxicos del mercurio derivados por su volatilización o combustión de materiales que lo contienen pueden ingresar fácilmente a la circulación a través del sistema respiratorio. La vida media del mercurio inhalado en el cuerpo humano es de aproximadamente 60 días (Chang, 1977). Una vez que se oxida, el mercurio es soluble en lípidos, por lo que existe la posibilidad de su bioacumulación en la corteza renal, en el hígado y específicamente en el cerebro. Se estima que en el cerebro su vida media puede ser de hasta 20 años (Frieberg, 1989). Además, se ha descrito que la exposición a mercurio está asociada a daños al riñón, sistema cardiovascular, así como infertilidad e inducción de cáncer. Sin embargo, aún son desconocidos los mecanismos moleculares exactos por los cuales el mercurio afecta a los organismos (Guzzi, 2008).

1.1 Características generales del mercurio

Su símbolo Hg deriva de la palabra griega hydrargyros, (“agua plateada”). Los romanos lo denominaron Argentum Vivum, (“Plata viva”). Fue descrito por primera vez como elemento por el químico francés Antoine Laurent Lavoisier en sus experimentos sobre la composición del aire (Boening, 2000).

El mercurio es un elemento de color plateado, inodoro, 13.5 veces más denso que el agua, ocupa la zona de los metales en la Tabla Periódica de los Elementos, su número atómico es 80 y tiene un peso atómico de 200.59 g/mol, es considerado un metal pesado. Tiene muy baja presión de vapor, un punto de ebullición de 356.72 °C y emite vapores a temperatura ambiente. Es buen conductor de la electricidad y su coeficiente de dilatación es prácticamente constante (UNAM, 2008).

El mercurio elemental tiene elevada tensión superficial y forma pequeñas gotas esféricas compactas y esféricas cuando es liberado al ambiente. Es el único metal que se encuentra en estado líquido a temperatura ambiente (EPA, 2007).

Es relativamente insoluble en agua (56 µg/lit a 25 °C), pero es soluble en lípidos, ácido nítrico y en ácido sulfúrico. Interacciona con diversos metales como el cobre, oro, plata, platino, uranio, plomo, sodio y potasio formando amalgamas (EPA, 2007).

Puede existir en tres estados de oxidación: elemental (Hg^0), mercurioso (Hg_2^{2+}) y mercúrico (Hg^{2+}), los cuales presentan diferentes propiedades físicas, químicas y toxicológicas (Lee, 2000). Las formas mercúricas y mercuriosas pueden originar gran número de compuestos orgánicos e inorgánicos, aunque la mercuriosa es raramente estable bajo condiciones ambientales convencionales (Ferguson, 1990). La mayor parte del mercurio presente en el ambiente se encuentra como sales mercúricas inorgánicas y compuestos organomercúricos. (EPA, 2004).

1.2 Mercurio orgánico e inorgánico

El mercurio puede ser encontrado en forma elemental, así como formando parte de compuestos inorgánicos u orgánicos. Los compuestos orgánicos del mercurio denominados organomercuriales tienen como característica la unión covalente al carbono C-Hg. El mercurio orgánico se puede encontrar en 3 formas: arilo, compuestos de cadena corta y cadena larga. Entre éstos se encuentran; el metilmercurio, dimetilmercurio, hidróxido de metilmercurio y fenilmercurio, entre otros (EPA, 2004). La mayoría de organomercuriales no son solubles y suelen permanecer en fase acuosa como moléculas no disociadas, por lo tanto, no reaccionan con ácidos ni bases débiles. El hidróxido de metilmercurio CH_3HgOH es, sin embargo, muy soluble debido a la gran capacidad del grupo hidroxilo para formar puentes de hidrógeno (EPA, 2004).

Los compuestos orgánicos de mercurio son de gran interés hoy en día porque a menudo se encuentran en la cadena alimentaria y se han utilizado para inhibir el crecimiento bacteriano en los medicamentos. El mercurio orgánico también se encuentra en fungicidas y escorrentías industriales. La forma más común de mercurio orgánico en ambientes acuáticos es el metilmercurio (MeHg), el cual es la principal fuente de mercurio orgánico presente en ambientes acuáticos (Clarkson, 2006.). El MeHg es absorbido fácilmente por organismos inferiores, lo cual le permite ascender en la cadena alimentaria, bioacumulándose en diversos organismos superiores (Mahaffey, 1999). Los peces parecen ser la principal fuente de envenenamiento con MeHg y para los seres humanos, a través de mecanismos que aún se desconocen (Mozaffarian, 2006).

El tracto gastrointestinal absorbe aproximadamente el 95% del MeHg e ingresa a los glóbulos rojos y al cerebro uniéndose covalentemente a grupos proteicos de glutatión y cisteína (Sarafian, 1999). Debido a que la excreción urinaria de MeHg es insignificante, se elimina principalmente del cuerpo en una forma inorgánica a través de la acción del sistema biliar. Se estima que la vida media biológica de MeHg es de 39 a 70 días, dependiendo de la carga corporal (Sarafian, 1999).

Otro de los compuestos orgánicos del mercurio considerado altamente tóxico es el dimetilmercurio, el cual puede causar la muerte si se derraman solo unos pocos microlitros sobre la piel o incluso en guantes de látex (Joshi, 2012). Además de la muerte, el envenenamiento por mercurio orgánico puede provocar la muerte, retraso mental, ceguera, déficits neurológicos, pérdida de audición y defectos en el desarrollo embrionario (Guzzi, 2008).

Las especies inorgánicas del mercurio están constituidas por el propio Hg^0 metal, el óxido de mercurio HgO y dos especies iónicas, el catión mercúrico Hg^{2+} y el mercurioso Hg_2^{2+} , que tienen la capacidad de unirse con elementos como el cloro y el azufre formando las sales de mercurio HgCl_2 y HgS (PNUMA, 2005).

Tanto las especies orgánicas como inorgánicas principalmente el catión Hg^{2+} del mercurio tienen la capacidad de formar complejos con ligandos biológicos, preferentemente con átomos de azufre, siendo la cisteína el aminoácido más favorecido para formar complejos estables que permiten su metabolización o su interacción con componentes proteicos interfiriendo así en procesos enzimáticos (Schurz et al., 2000).

1.3 Usos del mercurio

Se sabe que el cinabrio, un mineral compuesto principalmente por mercurio, se empleó como pigmento en la decoración de cuevas y del cuerpo en épocas prehistóricas. En el siglo IV A.C., Aristóteles utilizaba mercurio en ceremonias religiosas, los antiguos egipcios, griegos y romanos lo usaban para preparar cosméticos, medicamentos y para amalgamación de otros metales (Serrano, 2004). Posteriormente se utilizó en la elaboración de instrumentos de medición y para generar el fulminato de mercurio, un detonador de explosivos. Todo esto llevó a la expansión de la industria del mercurio a partir de 1900 (Galaor et al., 1998).

Actualmente, sus usos son variados y dependen principalmente del aprovechamiento de sus propiedades fisicoquímicas como volumen de expansión, conductividad eléctrica, toxicidad y habilidad para alearse con otros metales (Rytuba, 2002). Se emplea como catalizador de

oxidaciones orgánicas; en recubrimiento de espejos; en lámparas de arco para generar rayos UV y lámparas fluorescentes; en instrumentos de medición como barómetros, termómetros, hidrómetros y pirómetros; en la extracción de oro y plata de sus minerales; en la generación de amalgamas; en rectificadores eléctricos; en la determinación de nitrógeno por el método Kjeldhal; como reactivo de Millón; como cátodo en electrólisis y electroanálisis; en pilas y en la manufactura de sales de mercurio, productos farmacéuticos, agroquímicos y pinturas. Muchos de éstos han sido prohibidos debido a su alta toxicidad, por ejemplo, en plaguicidas, artículos de lavandería, cosméticos y pinturas (Clarkson, 2006).

Tanto el mercurio como sus sales tienen una gran resistencia a la biodegradación, por lo que se acumulan creando graves problemas de contaminación ambiental. Es por ello por lo que existen reglamentaciones especiales para el manejo, producción y disposición de desechos, en países industrializados (EPA, 2004).

1.4 Fuentes de emisión de mercurio en el ambiente: naturales y antropogénicas

La emisión del mercurio en el ambiente puede tener como origen procesos naturales o antropogénicas. Entre los primeros, se encuentra la volatilización del mercurio desde medios acuáticos y marinos, a partir de la vegetación, la liberación de gases de materiales geológicos, la erosión de los suelos y rocas y las emisiones volcánicas, siendo estas últimas el principal aporte natural. Las emisiones naturales de mercurio tienen lugar principalmente en forma de mercurio elemental Hg^0 (Figueroa, 1985).

En cuanto a las emisiones antropogénicas, estas pueden ser liberadas como mercurio elemental (Hg^0), así como de sus especies inorgánicas como $HgCl_2$, $Hg(OH)_2$ y HgS (PNUMA, 2005). La fuente principal de emisión es la extracción de recursos naturales (recuperación de metales preciosos, yacimientos petrolíferos y carboníferos), a través de la minería, la cual aporta el 50% de mercurio al ambiente (PNUMA, 2005). Otra fuente importante de emisión es la incineración de residuos, especialmente de origen médico, disposición de pilas, lámparas, termómetros, etc. Así como en el uso industrial mediante la manufactura de equipo electrónico, pinturas y agricultura (la aplicación de fungicidas a base de este metal) (Fu, 2010).

1.5 El ciclo del mercurio en el ambiente

Se define como el ciclo del mercurio su flujo continuo entre atmósfera, tierra y agua. Este ciclo está basado en el comportamiento del Hg en los diferentes medios, en las reacciones químicas implicadas, así como en parámetros de transporte y su destino final. De acuerdo con Niriagu (1979), en cualquier punto de la Tierra, la cantidad de mercurio presente depende de:

1. Ciclo global natural
2. Ciclo global perturbado por la actividad humana
3. Fuentes regionales de mercurio
4. Fuentes locales de mercurio

Estudios recientes indican que de 200.000 toneladas de mercurio emitidas a la atmósfera desde 1890, aproximadamente el 95% se encuentran en suelos, alrededor de un 3% en aguas oceánicas y un 2% en la atmósfera. Se estima que entre el 40 y el 75% del mercurio atmosférico actual tiene como origen diversas fuentes antropogénicas (EPA, 2004).

1.5.1 El mercurio en la atmósfera

La mayor parte del mercurio presente en la atmósfera se encuentra en estado gaseoso. Este es principalmente mercurio elemental Hg^0 , sin embargo, un porcentaje pequeño es oxidado a su estado iónico Hg^{2+} (mercurioso) para formar cloruro de mercurio (HgCl_2) y óxido de mercurio $\text{Hg}(\text{OH})_2$ (Brunke, 2010).

El vapor de mercurio puro, también llamado **Mercurio Elemental Gaseoso (MEG)**, tiene muy escasa solubilidad en agua y es muy estable en la atmósfera, tiene un tiempo de residencia entre seis meses y dos años. Esta estabilidad permite que soporte el transporte por largas distancias, haciendo que las concentraciones de MEG sean bastante uniformes en la atmósfera (Fu, 2010).

A los compuestos inorgánicos de mercurio que se encuentran en estado gaseoso en la atmósfera se les conoce generalmente como **Mercurio Gaseoso Reactivo (MGR)**. Los compuestos de MGR (HgCl_2 y $\text{Hg}(\text{OH})_2$) son menos estables en la atmósfera que el MEG, debido a su elevada reactividad y solubilidad en el agua, pueden permanecer en la atmósfera por período de horas o días, permitiendo que la lluvia y otras formas de precipitación los eliminen de la atmósfera, conocido como depósito húmedo. Los MGR también pueden ser eliminados sin precipitación, a través de su adherencia con diversas partículas de la atmósfera, en un proceso designado como depósito seco (Figura 1) (Steffen, 2008).

1.5.2 El mercurio en el suelo

La mayor parte del mercurio presente en los suelos se encuentra en forma inorgánica como HgCl_2 y $\text{Hg}(\text{OH})_2$. Estos, así como el mercurio elemental pueden ser depositados en los suelos mediante depósito seco o húmedo, son bastante solubles y, en consecuencia, móviles, los compuestos inorgánicos de Hg^{2+} , suelen formar complejos con la materia orgánica, lo cual limita su movilidad, haciendo que estos actúen como grandes reservas de mercurio. Sin embargo, puede ser adsorbido por ligandos orgánicos solubles u otras formas de carbono orgánico disuelto, lo que facilita su incorporación hacia la fase acuosa (Figura 1) (Rytuba et al., 2002).

Otra especie del mercurio presente en proporciones bajas en suelos y sedimentos, pero de gran importancia debido a su toxicidad y capacidad para la bioacumulación, es el metilmercurio. Su formación se debe principalmente a varios procesos microbianos que actúan sobre compuestos de Hg^{2+} . El metilmercurio presenta gran afinidad por la materia orgánica, lo que limita su movilidad en el ambiente permitiendo su bioacumulación (Rytuba et al., 2002).

1.5.3 El mercurio en los cuerpos de agua

Existen diversas vías por las cuales el mercurio entra a los cuerpos de agua. El Hg^{2+} y el metilmercurio pueden ser depositados directamente desde la atmósfera, o a través del depósito húmedo y seco o mediante la lixiviación y escorrentía (Gilmour y Henry, 1991).

Al igual que los suelos, los cuerpos de agua se encuentran potencialmente contaminados por especies inorgánicas de mercurio. Los flujos de este en los cuerpos de agua incluyen (por orden de significancia): sedimentación y flujo hacia el océano (Lofroth, 1970).

Una vez depositado el mercurio en los cuerpos de agua, éste es transportado (en forma de partículas) a regiones más profundas (capas de menor contenido de oxígeno), donde se sedimentará y ocurrirá el proceso de metilación. El metilmercurio es entonces transportado a la fase mixta (a profundidades inferiores a 100 metros), donde será incorporado a la cadena alimentaria. Sin embargo, el metilmercurio puede ser desmetilado a través de la fotodegradación, dando lugar a mercurio elemental, volatilizándose nuevamente hacia la atmósfera completando el ciclo (Figura 1). El metilmercurio en los cuerpos de agua pasa a las cadenas tróficas incorporándose en la dieta de los seres humanos (Molina et al., 2010).

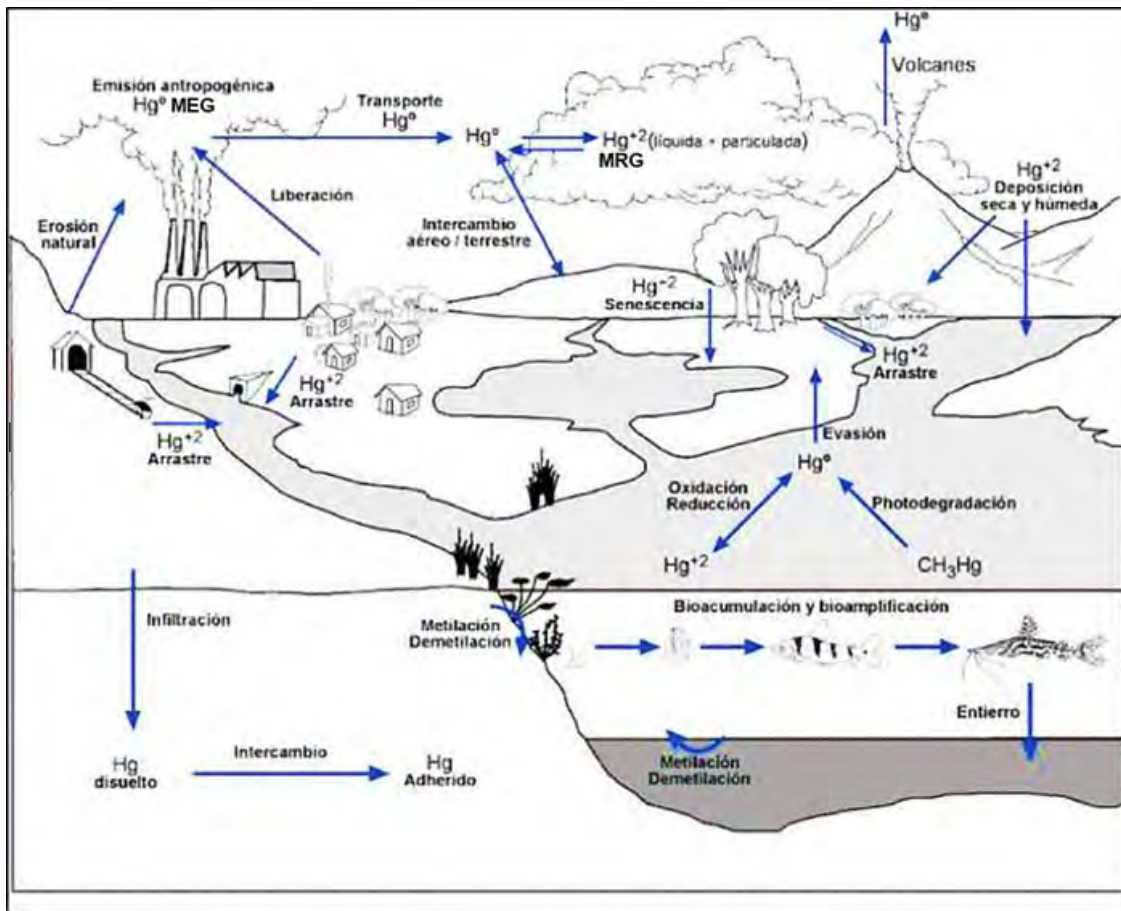


Figura 1. Ciclo del mercurio en el ambiente. La emisión del mercurio al ambiente puede ser de fuentes naturales o antropogénicas, una vez incorporado en atmósfera se oxida a Hg^{2+} y es depositado de manera seca o húmeda al suelo y a los cuerpos de agua. Una vez en ellos, el mercurio pasa por procesos de metilación y desmetilación mediada por microorganismos, bioacumulándose en los organismos, incorporándose en la cadena alimentaria que a su vez es foto-degradado y reducido de Hg^{2+} a Hg , para incorporarse a la atmósfera e iniciar nuevamente el ciclo (Harris, 2007).

1.6 Formas de exposición al mercurio

Debido a la presencia de mercurio en el ambiente, la población humana se encuentra constantemente expuesta a diversas especies orgánicas e inorgánicas de este. Sin embargo, además de la exposición ambiental, existen diversas actividades humanas que incrementan el riesgo de intoxicación por mercurio. Estas actividades pueden ser; (EPA, 2004):

1. Alimentarias: consumo de pescados o mariscos contaminados principalmente con sus formas orgánicas.

2. Ocupacionales: trabajos de minería, personal de salud, industrias, plantas de extracción de recursos naturales y laboratorios, entre otros.
3. Accidentales: aspiración de vapores de mercurio metálico por accidentes con artefactos o instrumentos que lo contienen.
4. Iatrógenas: A partir de prácticas médicas u odontológicas

Además de las exposiciones mercuriales clásicas, en la década de los sesenta hizo su aparición una nueva forma de exposición ligada a los compuestos orgánicos, las exposiciones e intoxicaciones colectivas. De ellas, las más importantes fueron la de la Bahía de Minamata y Niigata en Japón entre 1953 y 1960 y las exposiciones alimentarias por fungicidas (Soria et al., 1995).

Debido a estos incidentes se crearon diversos organismos para regular la exposición al mercurio de la población humana. En 1990, la American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) propuso una concentración media permisible de mercurio ambiental en los lugares de trabajo de 50 mg/m^3 , considerando la mayoría de los autores que los trabajadores expuestos no deben sobrepasar los 50 mg/L de mercurio urinario (Sanz-Gallén et al., 1993).

Actualmente, el límite de tolerancia máximo para los productos de pesca es de 0.5 mg/Kg y el límite de concentración en la parte comestible de los pescados, cefalópodos, moluscos bivalvos, gasterópodos y crustáceos frescos, congelados, en conserva y semiconserva es de 1 mg/Kg (Rodríguez López et al., 2001).

Para las hortalizas, las hierbas frescas, todas las setas y las frutas excluidas las bayas y frutas pequeñas, el contenido máximo de mercurio es de 0.1 mg/Kg peso fresco. Para las grasas y aceites, incluida la grasa láctea es de 0.1 mg/Kg peso fresco. Finalmente, para los vinos (incluidos los espumosos y excluidos los vinos de licor), los vinos aromatizados, las bebidas

aromatizadas a base de vino, cócteles aromatizados de productos vitivinícolas, las sidras, peradas y vinos de frutas procedentes de la cosecha 2001 en adelante, el contenido máximo de mercurio ha sido fijado en 0.2 mg/kg peso fresco (Pérez, 1999; Rodríguez López et al., 2001).

1.7 Vías de ingreso del mercurio al organismo

Las principales vías de ingreso son; digestiva, inhalatoria y dérmica. Los porcentajes de absorción varían de acuerdo con la especie de mercurio.

Vía gastrointestinal: el mercurio elemental se absorbe muy poco por el tracto intestinal, del 2% al 10%, debido a que es insoluble. Es oxidado formando compuestos solubles que son absorbidos con mayor facilidad (Friberg y Nordberg, 1973). Sus sales inorgánicas solubles se absorben entre 10 y 15%, el resto queda unido a la mucosa digestiva. Los compuestos orgánicos, son más liposolubles y menos corrosivos para la mucosa intestinal, se absorben fácilmente por esta vía (entre el 50% y 80% del total ingerido) con un máximo de hasta 94-95% en el caso del metilmercurio (Nielsen y Andersen, 1990).

Vía respiratoria: el 80% de los vapores de mercurio son absorbidos por inhalación y rápidamente entran a la sangre a través de las membranas alveolares. Su afinidad por las proteínas y compuestos con grupos sulfhídricos (SH) explica la capacidad del metal para reaccionar inmediatamente con la mucosa respiratoria que tiene un elevado contenido de dichos grupos (Hursh et al., 1976). Al inhalar vapores de mercurio elemental la absorción es rápida y completa en la membrana alveolar, ahí se oxidará hasta convertirse en catión mercuríco Hg^{2+} (Yoshida, 2002). El porcentaje de retención pulmonar después de una exposición varía del 74 al 76% cuando la inspiración es a través de la nariz y del 50% cuando la inspiración y espiración es a través de la boca. (Maas et al., 1996).

Vía cutánea: el mercurio elemental es poco absorbido por la piel, sin embargo, algunas especies orgánicas son fácilmente asimiladas. Los compuestos inorgánicos si son transportados por disolventes orgánicos a través de la piel, en donde parte de este se

convertirían en mercurio elemental, que se depositará y acumulará en los tejidos (Silberberg et al., 1969).

1.8 Toxicocinética y metabolismo del mercurio en el organismo

La toxicocinética y metabolismo del mercurio en los diversos tejidos del organismo dependen de la dosis, de la duración de la exposición y del grado de oxidación del mercurio (Magos, 1967). Así, del total del mercurio que se absorbe por inhalación, un 60% está en forma de vapor y el resto se reparte entre formas orgánicas e inorgánicas; sólo un 3% corresponde a la forma particulada. Sin embargo, independientemente de la especie química, un 80% del mercurio inhalado se retiene, y se estima que del vapor de mercurio penetra casi un 100% a través de los alveolos (Magos, 1967).

Respecto a la vía digestiva, el mercurio metálico no se absorbe prácticamente por esta vía; los derivados inorgánicos penetran en un 70% mientras que los orgánicos lo hacen en su totalidad. La vía cutánea está limitada a los derivados organomercuriales. Después de su absorción, el mercurio se acumula principalmente en los riñones. A nivel celular se acumula en los lisosomas y mitocondrias (Storelli et al., 1998). Las concentraciones de mercurio en sangre superiores a 3.5 mg/L deben considerarse tóxicas. La vida media en plasma sanguíneo del mercurio metálico se estima que es de unos 23-40 días y la de sus compuestos orgánicos de 70 días, lo que indica que se elimina con dificultad (Weiner y Nylander, 1993). La vía principal de eliminación es el riñón, pero también se excluyen cantidades significativas a través de la saliva, lágrimas, sudor y bilis. El 70% de los iones de mercurio expulsados lo hacen en forma de sulfidril-mercurio del tipo R-Hg-S-R (Córdoba y Cuesta, 2000).

1.9 Efectos asociados con la exposición al mercurio

El mercurio genera efectos nocivos en la salud humana, los cuales dependen de la vía y el tiempo de la exposición, el órgano diana sobre el cual ejerza su efecto (Danscher et al., 1990). La toxicidad se incrementa con la liposolubilidad siendo más tóxicas las formas orgánicas que las inorgánicas (Soria et al., 1995). La dosis mortal por vía oral para las distintas sales

mercúricas es de aproximadamente 1 g, aunque hay referencias de muerte con 0.5 g por vía oral. Además, La relación dosis-efecto puede ser modificada por distintos factores como edad, sexo, estado nutricional, entre otros, dependiendo del tipo de compuesto de mercurio de que se trate (Hardisson, 1981; Sierra y Hardisson, 1991).

En el caso del mercurio elemental (vapor), el órgano diana principal es el cerebro, también se ven afectadas las funciones nerviosa periférica, renal, inmune, endócrina y muscular (Magos, 1989).

Después de una exposición aguda, se presenta bronquitis erosiva y bronquiolitis que puede conducir a insuficiencia respiratoria. Éstas pueden ir acompañadas con síntomas en el sistema nervioso central como temblor y eretismo (pérdida la memoria, aumento de la excitabilidad, insomnio y depresión) (Takahata et al., 1970). A concentraciones bajas se presentan síntomas inespecíficos como debilidad, fatiga, anorexia, pérdida de peso y trastornos gastrointestinales (Bernhoft, 2012). También pueden ocurrir casos de proteinuria y síndrome nefrótico, así como salivación excesiva. Los temblores, gingivitis y eretismo se han reconocido como la mayor manifestación del envenenamiento por esta clase de mercurio (Danscher et al., 1990).

Mercurio orgánico (metilmercurio): el cerebro es el órgano diana, afectando directamente al sistema nervioso central (SNC), la visión y la audición, así como aquellas regiones cerebrales relacionadas con la coordinación (especialmente el cerebelo) son las funciones más afectadas (Meyer, 2004). Los efectos agudos son edema cerebral, con la destrucción prolongada de la materia gris.

El principal efecto crónico sobre la salud humana es la neurotoxicidad. Las manifestaciones clínicas incluyen parestesia (entumecimiento y sensación de hormigueo alrededor de boca y labios), ataxia (dificultad para tragar y articular palabras). Otros signos incluyen neurastenia (sensación generalizada de debilidad), pérdida de audición y visión, espasticidad (músculos tensos y rígidos) y temblor. Estos pueden progresar hasta el coma y desencadenar la muerte (Clarkson, 1976).

Mercurio inorgánico (sales): el principal órgano diana es el riñón, sin embargo, también tiene efectos en el SNC y en los testículos inhibiendo la espermatogénesis.

El envenenamiento agudo, particularmente con HgCl₂, es dirigido al tracto gastrointestinal y riñones. Se produce gran precipitación de proteínas acompañado de dolor abdominal, vómito y diarrea sanguinolenta con necrosis de la mucosa intestinal. Esto puede producir la muerte por peritonitis, infecciones sépticas o shock hipovolémico (Cherian y Clarkson, 196; Piotrowski et al., 1973).

El envenenamiento crónico es raro. La toxicidad renal involucra necrosis tubular, glomerulonefritis autoinmune o ambas. Las disfunciones inmunes incluyen reacciones de hipersensibilidad, comprendiendo asma y dermatitis, además se presentan alteraciones en el sistema endocrino y reproductivo inhibiendo la capacidad de producir hormonas y su actividad (Rowland et al., 1994).

II ANTECEDENTES

2.1 Propiedades físicas y químicas del cloruro de mercurio

El cloruro mercúrico HgCl_2 , también conocido como bicloruro de mercurio, cloruro de mercurio, dicloruro de mercurio, percloruro de mercurio, dicloromercurio y cloruro de mercurio corrosivo, es un polvo cristalino blanco con una densidad de 5.4 g/cm^3 , un punto de fusión de $277 \text{ }^\circ\text{C}$ y un punto de ebullición de $302 \text{ }^\circ\text{C}$ y ligeramente volátil a temperatura ambiente. Es soluble en agua, etanol, benceno, éter, glicerol, ácido acético y muchos otros disolventes orgánicos (Merck, 1983). El cloruro de mercurio es el más peligroso de los compuestos mercúricos (Hg_2^+) debido a su mayor solubilidad en agua, 71.5 g/L a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, y elevada presión de vapor, 760 mm Hg a $304.0 \text{ }^\circ\text{C}$ (Weast, 1982). En solución acuosa, existe como complejos de cloruro que tienen una fuerte tendencia a reaccionar con grupos sulfhídricos, formando compuestos mercúricos sulfhídricos más estables.

2.2 Usos del cloruro de mercurio

Se ha utilizado como desinfectante, antiséptico, como reactivo analítico para síntesis orgánicas, en el tratamiento de semillas y la fabricación de otros compuestos que contienen mercurio. Además, es ingrediente en cremas aclaradoras de la piel y otros cosméticos (Merck, 1983).

2.3 Efectos tóxicos del cloruro de mercurio

El cloruro de mercurio es absorbido por la piel y el tracto gastrointestinal, pero solo el 2% es transportado en la sangre por los eritrocitos y el plasma, la mayor parte es absorbido y acumulado en los riñones (Berlín, 1986). La mayor parte es absorbido y acumulado en los

riñones (Berlín,1986), convirtiéndolo en el órgano diana para el envenenamiento crónico, seguido por el hígado (Berlín, 1986).

El efecto citotóxico directo del cloruro de mercurio sobre el túbulo renal se ha estudiado ampliamente (Barnes et al., 1980). En ratas, produce alteraciones en el túbulo proximal (Biber et al., 1968). Su mecanismo básico de toxicidad se desconoce, sin embargo, debido a que puede interactuar con grupos sulfhidrilos, se propone que actúa inhibiendo la mayoría de las enzimas (Sin et al., 1990). En otro estudio se observó necrosis en los túbulos proximales. También puede dañar las células de los glomérulos e inducir una reacción autoinmune, o causar la producción de anticuerpos en la membrana de los glomérulos (Sapin et al., 1977; Aten et al., 1988).

Además de sus efectos tóxicos a nivel renal se ha descrito que el (HgCl₂) también afecta adversamente los sistemas nervioso central y periférico (Aschner et al., 1994) y reduce la tasa de fertilidad en ratones (Von Burg, 1995).

2.4 Efectos tóxicos del mercurio a nivel reproductivo

La exposición a vapores de mercurio puede inducir alteraciones en el eje hipotálamo-hipófisis- gonadal que afecta la función reproductora al alterar la circulación de los niveles de la hormona foliculoestimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH), la inhibina, la progesterona, los estrógenos y los andrógenos (Davis, 2001). En los hombres, el mercurio puede tener efectos adversos en la concentración de espermatozoides y en el peso testicular. También existe asociación con la disfunción eréctil. Keck et al. (1993) y Colquitt (1995), detectaron mercurio mediante técnicas autometalgráficas en testículos de un paciente de 25 años con infertilidad inexplicable. El paciente estuvo expuesto al vapor de mercurio durante aproximadamente 5 años mientras trabajaba en la industria cloroálcali. Se detectaron elevadas concentraciones de mercurio en el cabello, sangre y la orina, y en la biopsia de los testículos se observaron alteraciones en células de Leydig (Keck et al., 1993).

En un estudio *in vitro* realizado con semen humano incubado con 50 y 800 μM de mercurio, reportaron daños en ADN, en la motilidad y en la membrana acrosómica (Arabi, 2007). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Mohamed (1986), Rao (1989) y Choy (2002).

Los efectos adversos sobre la reproducción femenina humana fueron observados Koos (1976), estableció correlación entre una elevada tasa de abortos espontáneos con elevadas concentraciones de mercurio en la orina de madres expuestas. Así como, alteraciones en los niveles de estrógenos y progesterona, en los ovarios, inhibición de la ovulación, menstruación dolorosa o irregular, menopausia prematura entre otros efectos (Koos et al., 1976). Sikorski (1987), reportó efectos similares en un estudio realizado en asistentes dentales polacas expuestas a vapor de mercurio mediante la preparación de amalgamas (Sikorski et al., 1987).

Davis (2001), evidenció afectación del ciclo estral, de los niveles hormonales, así como en la morfología de los cuerpos lúteos en los ovarios y disminución significativa del peso corporal en ratas que inhalaron 1, 2, 4 mg/m^3 de mercurio por 2 h durante 11 días. Sin embargo, no observaron un efecto significativo en la ovulación, implantación o mantenimiento del primer embarazo durante una corta exposición a mercurio (Davis, 2001).

Los estudios en animales expuestos a mercurio han producido variedad de efectos en la morfología de los ovarios y testículos, alteración de los ciclos hormonales, menstruales y estrales, así como efectos embriotóxicos, que incluyen, retraso del crecimiento, aumento de la frecuencia de malformaciones y muerte fetal (Rizzo, 1972).

En ratas, ratones y monos después de la exposición a mercurio, se observó disminución en el recuento de espermatozoides, alteraciones en la morfología y en la movilidad espermática (Lee, 1975; Homma, 2001). En la Tabla 1 se muestran algunos estudios realizados sobre los efectos tóxicos del mercurio a nivel reproductor.

Tabla 1. Estudios realizados sobre los efectos tóxicos del mercurio a nivel reproductivo.

Compuesto de Hg	Modelo utilizado	Efectos observados	Referencia
Mercurio inorgánico	Pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	Hembras expuestas a 1.0 µg/L de mercurio durante 19 días, disminuyeron la cantidad de huevos.	Kihlstrom (1970)
Cloruro de mercurio	Criceto (<i>Cricetinae dorado</i>)	Hembras expuestas a 1 mg de HgCl ₂ durante 4 días, presentaron alteraciones en las células foliculares en los ovarios, formación de los cuerpos lúteos, desequilibrio hormonal y alteraciones en el ciclo estral.	Lamperti (1973)
Mercurio (fungicida)	Mosca de la fruta (<i>Drosophila melanogaster</i>)	Hembras alimentadas con 30, 40, 50 y 60 mg de mercurio mostraron infertilidad	Gayathri (1981)
Mercurio inorgánico	Pez cirujano (<i>Lepidocephalichthys thermalis</i>)	Hembras expuestas a 100 µg/L de mercurio inorgánico durante 10 días, presentaron hipertrofia de las células foliculares en ovarios.	Mahalingam (1986)
Mercurio orgánico	Pez serpiente <i>Channa punctatus</i>	Hembras expuestas a 16.1 ppb de mercurio, evidenciaron disminución del peso de los ovarios y modificaciones en la ovogénesis.	Dey (1989)
Metilmercurio (MeHg)	Tilapia (<i>O. niloticus</i>)	Hembras con exposición 0.3 y 1.3 µg de metilmercurio presentaron disminución de los niveles de la hormona 17β-estradiol.	Arnold (2000)
Mercurio elemental (vapor)	Rata (<i>Rattus rattus</i>)	Hembras adultas expuestas a 0, 1, 2 y 4 mg/m ³ de vapor de Hg ⁰ durante dos horas por 11 días consecutivos, mostraron alteraciones en ciclo estral y hormonal, así como modificaciones morfológicas en los cuerpos lúteos.	Davis et al. (2001)
Cloruro de mercurio HgCl ₂	Ratón (<i>Mus musculus</i>)	Hembras expuestas a 0, 0.25, 0.50 y 1 mg/kg por día durante 14 días consecutivos, presentaron disminución de la fertilidad y del tamaño de los ovarios.	Khan et al. (2004)
Metilmercurio (MeHg)	Tilapia (<i>O. niloticus</i>)	Hembras expuestas a 10 y 20 µg/L de metilmercurio, se observó necrosis y	Crump et al. (2008)

		degeneración de los folículos en ovarios, así como alteraciones en el ciclo hormonal.	
Mercurio orgánico	Ratón (<i>Mus musculus</i>)	Hembras expuestas a 11.70, 13.38 ng/g de mercurio se detectó acumulación en ovarios.	Saleh (2009)
Metilmercurio (MeHg)	Rata (<i>Rattus rattus</i>)	Machos adultos alimentados con 0, 0.5, 1.0 y 3.0 mg/kg MeHg por 14 días. Se observó reducción del epidídimo, disminución del conteo de espermatozoides y de la motilidad con alteraciones morfológicas de estos.	Fossato da Silva (2010)

2.5 Efectos moleculares y celulares del mercurio

La citotoxicidad del metilmercurio se ha atribuido a tres mecanismos principales: (i) perturbación de los niveles de Ca^{2+} intracelular; (ii) inducción de estrés oxidante por sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (EROs) (LeBel et al., 1990; Graff et al., 1997) o por reducción de la capacidad de defensa oxidante (LeBel et al., 1990; Yee, 1994), (iii) interacciones con grupos sulfhidrilos dirigidos a proteínas y péptidos que contienen cisteína y metionina (Clarkson, 1972). Estos tres mecanismos pueden dar como resultado la alteración de la proliferación, la migración y diferenciación celular (Broussard, 2002).

Se ha demostrado que la exposición a mercurio aumenta el Ca^{2+} intracelular en varios tipos de células (Sarafian, 1993; Atchison, 1994; Graff et al., 1997; Marty, 1997). En las células granulares cerebelares (CGC), las alteraciones parecen relacionarse inicialmente con la movilización de Ca^{2+} desde las reservas intracelulares (primera fase), seguida de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de la membrana (segunda fase) (Marty, 1997). La alteración en la homeostasis del calcio originada por mercurio induce la activación de proteasas, endonucleasas, fosfolipasas, así como alteraciones en la fosforilación de proteínas (Saijoh, 1993; Sarafian, 1993).

El mercurio también puede incrementar los niveles de especies reactivas de oxígeno debido a su capacidad para actuar como catalizador de reacciones de tipo Fenton (Peraza, 1998). En organismos eucariotas, el sitio primario para la producción de ERO ocurre en las mitocondrias a través del metabolismo normal (Shenker, 2000). Se ha reportado que el mercurio inorgánico acrecienta la producción de ERO al causar defectos en la fosforilación

oxidante y el transporte de electrones en el paso ubiquinona-citocromo b5 (Palmeira, 1997). A través de la aceleración de la tasa de transferencia de electrones en la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias, el mercurio induce la liberación prematura de electrones al oxígeno molecular, lo que provoca aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno (Lund, 1991). Se ha observado que el nivel de ERO se incrementa después de la exposición al metilmercurio en el tejido cerebral (LeBel et al., 1990; Yee, 1994). La exposición al mercurio induce niveles elevados de superóxido, peróxido de hidrógeno y peroxidación lipídica (Yonaha, 1983; LeBel et al., 1990; Sarfian, 1993; Oyama, 2000). Se han detectado niveles elevados de peroxinitrito en la corteza occipital de ratas expuestas a mercurio (Miyamoto, 2001).

Después de la exposición a mercurio se ha observado en ratas la disminución del glutatión (GSH) y reducción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Sarfian, 1993; Yee, 1994; Shanker, 1999). La unión del mercurio a GSH debido a su alta afinidad por los grupos SH, disminuye la disponibilidad de este factor antioxidante, exponiendo a las células al daño mediado por radicales libres (Shanker, 1999). De acuerdo con estos hallazgos, se ha demostrado que el mercurio induce daño celular al aumentar la formación de radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno y radical superóxido y también al reducir las defensas endógenas de antioxidantes (tanto enzimáticos como no enzimáticos) (Shanker, 2001; Allen, 2002). La unión a grupos SH de péptidos también puede tener varias consecuencias perjudiciales para las células debido a modificaciones de proteínas estructurales y/o inactivación de enzimas. Por ejemplo, la unión del metilmercurio a la tubulina conlleva alteraciones en el ensamblaje y desensamblaje de los microtúbulos lo cual se ha propuesto como posible mecanismo responsable de la alteración del citoesqueleto (Graff, 1989; Miura, 1989).

Aunque los mecanismos moleculares del mercurio no son conocidos completamente, se propone que produce efectos tóxicos por precipitación de proteínas, inhibición enzimática y acción corrosiva generalizada. El mercurio no solo se une a los grupos sulfhidrilos, también puede interactuar con grupos fosforilo, carboxilo, amida y amina (Broussard, 2002). Las proteínas (incluidas las enzimas) con estos grupos fácilmente reaccionan con el mercurio, he inmediatamente son inactivadas (Naganuma, 2002).

Los estudios realizados para identificar las vías moleculares del mercurio han sido llevadas a cabo principalmente en el desarrollo de neuronas, siendo el metilmercurio el compuesto de mercurio más estudiado debido a su alta toxicidad y disponibilidad para los seres humanos. Está bien establecido que la toxicidad por metilmercurio (MeHg), se manifiesta con déficits en la función neurológica (Bland, 2006). Los casos de exposición prenatal al mercurio han establecido que el sistema nervioso en desarrollo es más susceptible a la perturbación por MeHg. A nivel celular, el MeHg provoca la inhibición de los receptores de neurotransmisores (Castoldi et al., 1996; Rajanna et al., 1997) y de los canales iónicos de calcio (Sirois y Atchison, 2000), daño a mitocondrias y estrés oxidante (Sarafian, 1999), inhibición de la síntesis de proteínas y ensamblaje de microtúbulos (Cheung y Verity, 1985; Miura et al., 1998), así como la sobre expresión de genes de apoptosis (Wilke et al., 2003).

Los efectos del MeHg y del HgCl₂ en sistema nervioso se han analizado a través de la vía de señalamiento Notch utilizando como modelo a *Drosophila melanogaster* (Bland, 2006) en el cual revelaron aumento de la expresión de genes blanco *E spl* (Enhancer-of-split) dependiente de la concentración y del tiempo de exposición. La vía Notch es una vía de señalización célula-célula altamente conservada que controla las decisiones del destino celular, la proliferación, la migración y el desarrollo neuronal (Bland, 2003). La activación del receptor Notch requiere de su proteólisis mediante una metaloproteasa de la familia ADAM ubicada en la superficie celular. Las proteasas de la familia ADAM son necesarias para el desarrollo normal de las neuronas (Fambrough et al., 1996; Rooke et al., 1996; Rubin, 1997), estas proteínas pueden ser activadas por compuestos organomercuriales tales como acetato de p-aminofenilmercúrico (APMA), como primer posible mecanismo molecular elucidado para la neurotoxicidad del MeHg (Bland, 2003; Sanderson, 2005).

2.6 Muerte celular y efectos genotóxicos inducidos por mercurio

Diversos estudios han reportado que el mercurio induce daño al ADN. Se ha observado en sistemas *in vitro e in vivo* inducción de mutaciones, intercambios de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas y transformación oncogénica (Rao et al., 2001). En estudios *in vitro* realizados con linfocitos humanos tratados con mercurio se ha detectado incremento en especies reactivas de oxígeno y roturas de doble cadena de ADN (Cebulska et al., 2005),

otros trabajos reportan intercambio de cromátidas hermanas después del tratamiento con acetato de fenil mercurio (Lee et al., 1997).

Se ha descrito aumento significativo en roturas monocatenarias de ADN en células de mamífero *in vitro* (Robison et al., 1982; Zasukhina et al., 1983; Burkart y Ogorek, 1986, Cantoni et al., 1986; Hamilton-Koch et al., 1986) e *in vivo* expuestas a mercurio (Cantoni et al., 1982; Zasukhina et al., 1983). También se ha reportado inducción de intercambios de cromátidas hermanas por cloruro de mercurio, en células de médula ósea de criceto dorado (Siebert, 1981); en células K1 de ovario de criceto dorado (Montaldi et al., 1985) y en linfocitos humanos en cultivo (Morimoto et al., 1982, Andersen, 1983). Se produjeron aberraciones cromosómicas en células hepáticas de ratones fetales después de la exposición de las madres a vapores de cloruro de mercurio en los días 9 a 12 de gestación (Andersen, 1983). Otros estudios realizados en ratones expuestos a mercurio han reportado aumento en la frecuencia de micronúcleos, así como alteración en la estructura de los microtúbulos (Thier et al., 2013).

El daño originado al ADN debido a la exposición a mercurio puede provocar muerte celular. Se ha reportado muerte celular por apoptosis en cerebelo de rata después de la exposición a metilmercurio (Nagashima, 1996; Nagashima, 1997). En ratas después de exposición crónica a mercurio observaron apoptosis en corteza del cerebro de ratón (Fujimura, 2009).

También se ha descrito apoptosis en neuronas, en células gliales y endócrinas expuestas al metilmercurio *in vitro*; en neuronas de gránulos cerebelosos de roedores (Bulleit, 1998; Castoldi, 2000; Dare, 2001); en células del hipocampo de ratón (Tofighi, 2010), en células gliales humanas (Dare, 2001), en microglía cerebral de rata células (Nishioku, 2000); en células PC12 de feocromocitoma de rata y células de neuroblastoma de ratón (Miura, 1999; Toimela, 2004) y neuronas sensoriales del ganglio dorsal de rata (Wilke, 2003).

En cuanto a las vías de señalización, el mercurio induce apoptosis independiente de caspasa en células granulares cerebelosas, en células D384 de astrocitoma y en células HT22 del hipocampo (Castoldi, 2000; Dare, 2000, 2001; Fonfria, 2002; Tofighi, 2010). Sin embargo, el metilmercurio en células madre neurales induce apoptosis dependiente de caspasas (Dare, 2001; Fonfria, 2002), por lo que se ha sugerido que el mercurio puede inducir muerte celular

programada por ambos mecanismos dependiendo del tiempo de exposición y el tipo celular (Liu, 1996; Barton, 2000; Tamm, 2006).

2.7 *Drosophila melanogaster* como organismo modelo

Los estudios sobre la genética de la susceptibilidad a las toxinas ambientales son un desafío en las poblaciones humanas, debido a la variedad de síntomas clínicos y la dificultad para determinar cuáles son por exposición tóxica (Liu, 2013). Una variedad de modelos convencionales, se utilizan para los estudios toxicológicos, incluyendo líneas celulares para evaluar los efectos de sustancias tóxicas (Liu, 2013; O'Brien, 2014), el pez cebra se ha utilizado para evaluar los efectos de xenobióticos sobre el desarrollo embrionario (Dai, 2014), así como, los roedores para determinar los efectos fisiológicos de algunas toxinas (Farraj, 2011; Chamanza, 2015). Sin embargo, el modelo de *Drosophila* es eminentemente adecuado para los estudios genómicos a gran escala que pueden explorar los factores genéticos que subyacen a la variación individual en la susceptibilidad y resistencia a los agentes tóxicos. *Drosophila melanogaster* es un poderoso modelo genético para la identificación de genes y proteínas que contribuyen a la variación de la resistencia a las toxinas ambientales (Mackay, 2012; Huang, 2014).

Drosophila se introdujo como un organismo modelo en el siglo XX para estudiar enfermedades humanas y como herramienta para entender procesos celulares básicos (Hegde, 2010). Actualmente es empleada como modelo para el estudio de cáncer, comportamiento, en biología del desarrollo, en los tratamientos con fármacos, en toxicología, entre otros. La idea central de esta elección es que la complejidad de cualquier proceso biológico en moscas es mucho más asequible que en vertebrados, ayudando por lo tanto a entender las complejas relaciones causa-efecto en un proceso biológico (Hegde, 2010).

El genoma de *Drosophila*, por ejemplo, es una versión simplificada del genoma humano, cada gen de *Drosophila* está representado normalmente por cuatro homólogos en vertebrados. Por lo tanto, la redundancia genética es relativamente rara en moscas, pero muy frecuente en modelos como el ratón. Debido a la conservación fundamental de genes y

procesos entre moscas y seres humanos, estos estudios son relevantes y se pueden extrapolar a los vertebrados.

Otra de las principales ventajas de *Drosophila* como organismo modelo son el corto periodo generacional en el cual se obtiene abundante descendencia, su mantenimiento es sencillo y de bajo costo, en espacios pequeños es posible mantener una gran cantidad de organismos (Adams et al., 2000).

Debido al exhaustivo estudio de *Drosophila* durante el último siglo, ha sido posible la acumulación de gran cantidad de información. Uno de los avances más importantes se produjo a inicios del siglo XXI, cuando la secuencia completa del genoma de *Drosophila* fue publicada (Adams et al., 2000). Este hecho, junto con la disponibilidad de técnicas y herramientas moleculares para su análisis, ha permitido consolidar a *Drosophila* como organismo modelo en los estudios de múltiples disciplinas. Otra de las grandes ventajas se basa en la facilidad para introducir y combinar mutaciones en su genoma. De esta forma, el fenotipo mutante permite inferir la posible función del gen durante el desarrollo (Adams et al., 200). Este gran acúmulo de información sobre la genética y la biología de *Drosophila* han propiciado la aparición de varias bases de datos accesibles a través de la Web de las cuales destacan:

- FlyBase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>): incluye datos genéticos y moleculares sobre *Drosophila*.
- Interactive Fly (<http://sdb.bio.purdue.edu/fly/aimain/1aahome.htm>): guía de los genes de *Drosophila* y sus funciones durante el desarrollo.
- FlyBrain (<http://www.flybrain.org>): base de datos y atlas en tiempo real sobre el sistema nervioso de *Drosophila*.
- FlyView (<http://flyview.uni-muenster.de/>): colección de patrones de expresión de genes que se expresan durante el desarrollo (Janning, 1997).

Las comparaciones entre los genomas de *Drosophila* y del ser humano revelaron que aproximadamente el 75% de los *loci* involucrados en enfermedades humanas tienen un homólogo en *Drosophila* consolidando su legitimidad como un organismo modelo para la investigación biomédica (Collins et al., 1994). También se ha establecido que la mayoría de

los mecanismos biológicos fundamentales y las vías de señalización que controlan el desarrollo y la supervivencia se conservan a través de la evolución entre las especies (Adams et al., 2000).

2.8. La importancia del apareamiento genético en *Drosophila melanogaster*

Durante un siglo, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* se ha utilizado como un poderoso organismo modelo para la investigación biológica (Ashburner, 1993; Martínez-Arias, 2008; Bellen et al., 2010). Inicialmente, la mosca era el vehículo esencial para la genética clásica hasta que las reglas genéticas básicas y las herramientas generadas durante la primera mitad del siglo XX fueron reconocidas y utilizadas como un medio poderoso para diseccionar los problemas biológicos (Keller, 1996). Durante los últimos 50 años, la genética de moscas se ha aplicado de manera sistemática y exitosa para descifrar los mecanismos principales de numerosos procesos biológicos incluyendo el desarrollo (Lawrence, 1992); las vías de señalización (Cadigan y Peifer, 2009), el ciclo celular (Lee y Weaver, 2003), el desarrollo del sistema nervioso y el comportamiento (Weiner, 1999; Bellen et al., 2010), e incluso los aspectos moleculares de enfermedades humanas (Bier, 2005).

Las herramientas y reglas genéticas clásicas todavía tienen un lugar fundamental en la investigación actual sobre *Drosophila*. Además, la genética de la mosca ha revolucionado aún más con el advenimiento de la biología molecular, la secuenciación del genoma de la mosca, el descubrimiento de elementos transponibles como vehículo de transgénesis, sistemas de expresión génica dirigida, la generación sistemática de deleciones, inserciones de elementos transponibles y transgénicos, las construcciones “knock-down” que cubren prácticamente todos los genes de *Drosophila*, así como la aplicación de recombinasas o nucleasas específicas para realizar ingeniería genómica (Venken y Bellen, 2005; Dahmann, 2008).

La vida diaria en un laboratorio de moscas requiere realizar cruces genéticos clásicos. En estos cruces, se utilizan moscas mutantes o genéticamente modificadas (transgénicas). Estas diferentes variantes de moscas proporcionan las herramientas mediante las cuales los genes

se manipulan o visualizan en acción para investigar su función. El arte de la genética de *Drosophila* es utilizar estas herramientas, no solo en forma aislada sino a menudo combinadas en las mismas moscas (Prokop, 2017). Este enfoque genético reunido mejora significativamente la información que se puede extraer. Estos esquemas genéticos son un prerrequisito clave para una investigación exitosa de *Drosophila*.

2.9 Líneas transgénicas en *Drosophila melanogaster*

Las moscas transgénicas se han convertido en un recurso clave para la genética de *Drosophila* con muchas aplicaciones importantes. En consecuencia, los animales transgénicos están omnipresentes en los esquemas de apareamiento, y es importante comprender su naturaleza principal y algunas de sus aplicaciones. La generación de líneas transgénicas se basa principalmente en el uso de elementos transponibles, los cuales son fragmentos de ADN parecidos al ADN de virus que se insertan en el genoma de manera aleatoria, se pueden mantener en una posición durante muchas generaciones, replicarse como genes endógenos y seguir las reglas mendelianas de la herencia. Existen ~ 100 tipos de transposones naturales en *Drosophila melanogaster* y miles de inserciones por genoma individual (Kaminker, 2002). Los transposones codifican enzimas especializadas llamadas transposasas que catalizan la movilización de los transposones en otras ubicaciones genómicas, ya sea por escisión, reintegración o mediante replicación. En *Drosophila*, la clase más utilizada de transposón es el *elemento P* (*P element*). Para la transgénesis, los transposones se modifican genéticamente. El gen transposasa se elimina y se reemplaza por los genes que el investigador desea introducir en el genoma de la mosca, además de genes marcadores y genes motivos para la clonación selectiva del elemento transponible en bacterias, así como, con características que mejoran el uso de estas construcciones (Prokop, 2017).

2.9.1 Transgénesis en *Drosophila melanogaster*

Para introducir transposones personalizados en el genoma de la mosca, estos requieren ser inyectados en embriones tempranos durante la etapa de blastodermo sincicial. La inyección debe tener lugar en el polo posterior donde se formarán las células polares, que son los

precursores de espermatozoides y óvulos (Bachmann, 2008). Si se integra con éxito en el genoma de algunas células polares, los transposones inyectados darán lugar a descendencia transgénica. Para catalizar la inserción genómica de estos elementos P, las inyecciones se realizan en presencia de transposasas, mediante el uso de líneas de moscas transgénicas que expresan transposasa en la línea germinal, o elementos auxiliares coinyectantes. Las transposasas transgénicas se eliminan en la siguiente generación, los elementos auxiliares no se integran en el genoma y se pierden posteriormente. A través de esta desaparición de la actividad enzimática transposasa, las inserciones exitosas del elemento P se estabilizan y pueden mantenerse estable. La generación de líneas de moscas transgénicas a través de la inyección de transposones y/o elementos auxiliares requiere experiencia técnica y equipos especializados, como micromanipuladores y agujas de vidrio. A menudo es más económico subcontratar esta tarea a empresas especializadas (de las cuales existen varias a nivel mundial), en lugar de establecer y mantener esta capacidad en laboratorios individuales (Prokop, 2017).

2.9.2 Clases importantes de líneas de moscas transgénicas

Existe una gran variedad de líneas transgénicas, a continuación, se describen algunas clases importantes de ellas.

a. Enhancer/reporter construct lines. Los potenciadores son elementos reguladores de genes que inducen y/o facilitan la activación transcripcional de promotores de genes, en algunos casos actuando sobre distancias de varias kilobases. Por lo general, los potenciadores actúan sobre los promotores de genes endógenos en su región, pero también pueden activar los promotores en construcciones transgénicas. Por lo tanto, para identificar y caracterizar potenciadores en regiones reguladoras de genes (no codificantes), los fragmentos genómicos que contienen estas regiones se pueden clonar frente a un promotor de elementos P (que por sí solo es demasiado débil para iniciar la expresión génica) fusionado a un gen reportero (por ejemplo, GFP, RFP o lacZ / β -Gal de *E. coli*). Los animales transgénicos que llevan estas construcciones pueden analizarse para determinar el patrón de expresión espaciotemporal del gen reportero como una lectura de la actividad potenciadora, y también usarse como herramientas genéticas para marcar ciertos tejidos y detectar la actividad de diferentes genes endógenos en fines experimentales (Prokop, 2017).

b. Enhancer trap lines: El promotor de elemento P solo es demasiado débil para iniciar la expresión de los genes indicadores fusionados. Por lo tanto, los elementos transponibles que portan dicha construcción de fusión del promotor del elemento P mostrarán la expresión del gen indicador solo si se insertan en un sitio genómico que se encuentra dentro del rango de actividad de potenciadores endógenos. Al generar muchas inserciones aleatorias de dichos elementos P, el genoma puede, por lo tanto, ser cribado para potenciadores que son activos en tejidos específicos en ciertas etapas. Tal actividad a menudo indica la presencia de genes que se expresan, por lo tanto, son latentemente relevantes en estos tejidos. Este procedimiento se conoce como una pantalla de trampa de potenciador (Bellen, 1989). Dado que las inserciones de *elementos P*, frecuentemente afectan la función de los genes en su sitio de inserción, pueden utilizarse para cribados sistemáticos de mutagénesis de *elementos P*. (Hummel, 2008). Una vez que se han generado las inserciones inducidas por *elementos P*, los patrones del gen reportero pueden revelar cuándo y dónde el gen está activo y se pueden usar estrategias de clonación eficientes para mapear la inserción e identificar el gen del cual se quiere visualizar su actividad (Hummel, 2008).

c. Protein trap lines: Una pantalla de trampa de proteínas es una versión avanzada de una pantalla trampa de potenciadores. Utiliza transposones que transportan secuencias que codifican proteínas (por ejemplo, GFP o RFP) flanqueadas por sitios de empalme de aceptor y donantes. Si dicho transposón se inserta en un intrón (dentro o flanqueando la región codificante de un gen), la etiqueta se empalma en el producto natural del gen del huésped. Esto produce versiones etiquetadas de proteínas endógenas que de otro modo estarían bajo su regulación normal (en contraste con proteínas etiquetadas con GFP expresadas a través de Gal4 / UAS), de modo que GFP refleja su expresión natural y patrones de localización (Kelso, 2004; Buszczak, 2007; Lowe, 2014; Singari, 2014). Con el advenimiento de la recombinación / ingeniería genómica y las tecnologías CRISPR / Cas9, el marcado genómico de genes ahora ya no se deja al azar, sino que puede realizarse en enfoques específicos, que se han comenzado a llevar a cabo incluso a gran escala (Huang, 2009; Gantz, 2016), generando colecciones de cepas fácilmente disponibles con genes marcados genómicamente (Nagarkar, 2015; Sarov, 2015).

d. Líneas Gal4 / UAS: Gal4 es un factor de transcripción de la levadura que activa genes río abajo de los elementos potenciadores del UAS (secuencia activadora río arriba). Gal4 no

existe endógenamente en las moscas y no actúa sobre ningún loci endógeno en el genoma de la mosca (Elliott, 2008). Se han generado y se siguen generando muchas líneas transgénicas de moscas Gal4. Para ilustrar este punto, el término de búsqueda simple "Gal4" produce casi 6000 visitas que representan acciones de moscas individuales en el Centro de Stock de Bloomington. De estos, numerosas líneas de Gal4 están fácilmente disponibles que muestran la expresión de Gal4 en diferentes tejidos o células en etapas específicas de desarrollo (Pfeiffer, 2010). Simplemente cruzando las moscas que expresan Gal4 con líneas de construcción UAS (Rørth, 1996). Los genes unidos a UAS pueden ser de naturaleza muy diferente, incluyendo reporteros, distintas isoformas de genes de moscas (o de otras especies), pequeños ARN interferentes o citotoxinas. Una vez cruzado a una línea Gal4, la descendencia mostrará la expresión de estos genes acoplados a UAS en el patrón Gal4 elegido. Esto proporciona un sistema de experimentación impresionantemente versátil y poderoso, cuyo patrón espaciotemporal puede refinarse aún más mediante mejoras técnicas tales como el uso de Gal 80 (un represor Gal4), Split Gal4 o el uso de estrategias alternativas (solas o en combinación), como el sistema de expresión binaria basado en LexA (Diegelmann, 2008; del Valle, 2012).

e. Líneas FRT: los sitios FRT (objetivo de reconocimiento de FLP) están específicamente dirigidos por la levadura FLP recombinasa ("flipasa"). El sistema FLP / FRT es ampliamente utilizado en *Drosophila* como un sistema de recombinación inducible que ha reemplazado principalmente a las estrategias anteriores basadas en rayos X (Theodosiou, 1998; Bischof, 2008). Se utiliza para activar y/o inactivar genes o reporteros, o para provocar la recombinación somática entre cromosomas homólogos, un evento que normalmente solo ocurriría durante la meiosis. La recombinación somática requiere inserciones específicas de elementos P que portan FRT cerca del centrómero de ambos cromosomas homólogos. En estos sitios FRT / FLP catalizará la rotura y el intercambio de los brazos cromosómicos homólogos que pueden distribuirse en diferentes células en divisiones celulares posteriores. Cuando se parte de individuos heterocigotos, este método puede producir tejidos de mosaico con clones homocigotos de células rodeadas por células heterocigóticas (Bischof, 2008). La recombinación somática se usa para el análisis MARCM (análisis de mosaico con un marcador de células reprensible) que estudia el comportamiento de células mutantes individuales o grupos de células en tejido normal o mutante (Theodosiou, 1998). Otra

aplicación importante es la generación de clones de líneas germinales usando la recombinación mediada por una Flippase / FRT en la etapa larval (Chou, 1992).

f. Líneas de ARNi: la aplicación de estrategias de ARN de interferencia en moscas se ha convertido en una poderosa alternativa al uso de alelos mutantes. Como una ventaja clave, las líneas de vuelo portadoras de construcciones UAS-RNAi (disponibles para prácticamente todos los genes) (Dietzl, 2007), permiten la destrucción dirigida de genes específicos en un tejido o conjunto de células reproducibles, a menudo en distintas etapas de desarrollo. Al igual que los análisis que usan clones FRT mutantes, este enfoque puede superar los problemas causados por la pérdida sistémica de la función del gen, como la letalidad temprana (que a menudo impide análisis en etapas post-embriónicas) o aberraciones complejas de tejidos completos que pueden ser difíciles de interpretar. Sin embargo, el uso de líneas de ARNi no siempre conduce a resultados que sean congruentes con los análisis de los alelos mutantes clásicos y los resultados deben estar bien controlados (Yamamoto, 2014).

2.10 Descripción general de *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster, también conocida como la mosca de la fruta, es una especie perteneciente a la familia Drosophilidae (O'Grady y Markow, 2009). Presenta un bajo número cromosómico ($2n=8$), tiene tres pares de cromosomas autosómicos y un par sexual (Rodríguez-Arnaiz, 2003). Es un insecto, cosmopolita, que al igual que otros de su clase presenta tres tagmas: cabeza, tórax y abdomen; mostrando así mismo un par de alas funcionales y un segundo par, llamados halterios o balancines que le permite mantener el equilibrio, tres pares de patas y un par de antenas, las moscas adultas del fenotipo silvestre tienen ojos rojos y un cuerpo amarillo o marrón (Tyler, 2000).

Los adultos presentan dimorfismo sexual, las hembras son ligeramente de mayor tamaño comparado con los machos, carecen de la fusión de los segmentos del abdomen el cual presenta una terminación puntiaguda con la placa genital en posición dorsoventral.

Los machos en comparación 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 (Figura 2) (Demerec y Kaufmann, 2005).

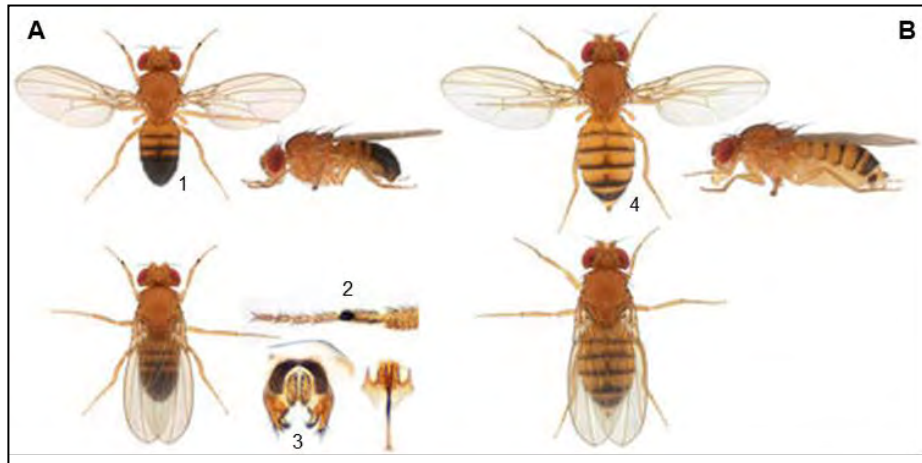


Figura 2. Vista dorsal y lateral de macho y hembra de *Drosophila melanogaster*. A) Macho, 1) fusión de los segmentos terminales del abdomen, 2) peines sexuales, 3) placa genital. B) Hembra, 4) abdomen sin pigmentación, terminación puntiaguda (Drosophila Species Stock Center, 2017).

2.11 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

Drosophila es un insecto holometábolo lo cual significa que pasa por una metamorfosis completa que incluye cuatro estadios de desarrollo; huevo, larva, pupa y adulto o imago. Tiene un ciclo de vida en el laboratorio de alrededor de 9 a 10 días cuando se cría en un medio nutritivo y a temperatura constante de 25 °C (Campos et al., 1985).

El ciclo inicia con la fecundación del huevo y el posterior desarrollo del embrión (embriogénesis) que dura aproximadamente de 18 a 24 h. A continuación, inicia el estadio larvario, el cual es la etapa principal de alimentación y consta de 3 estadios (L1, L2, L3) que duran en conjunto aproximadamente 4 días. Transcurrido este tiempo, la larva deja de alimentarse entra al estadio de pupa y comienza el proceso de metamorfosis. Esta etapa dura aproximadamente 3 días, al cabo de los cuales emerge una mosca adulta o imago que alcanza

la madurez sexual a las 3 horas los machos y a las 7 horas las hembras (Figura 3) (Bate, 1993).

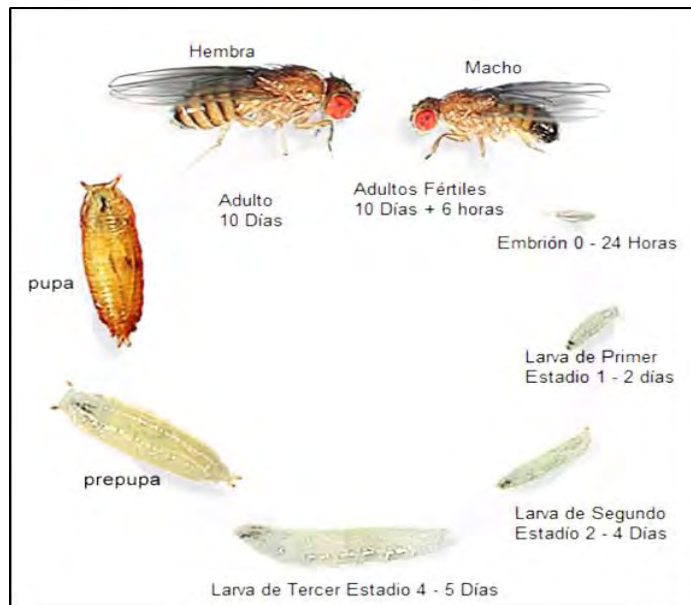


Figura 3. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. El ciclo de vida a 25 °C se completa en 10 días, conformado por cuatro estadios; huevo, larva (con tres instares o estadios), pupa y adulto o imago (Campos, 1985).

2.12 Sistema reproductor de las hembras

Drosophila melanogaster, posee un sistema reproductor femenino anatómicamente muy similar al ser humano. Situado en la región ventral media posterior del abdomen, se encuentra constituido por dos ovarios y dos oviductos laterales conectados a un oviducto común que desemboca en el útero, el cual se comunica con la vagina, que se abre al exterior a través de la vulva, situada entre los gonópodos constituyendo un ovipositor contráctil. En la cámara genital o vagina desembocan, además, un receptáculo seminal, un par de espermatecas y dos glándulas accesorias (Figura 4) (Mahowald, 1980).

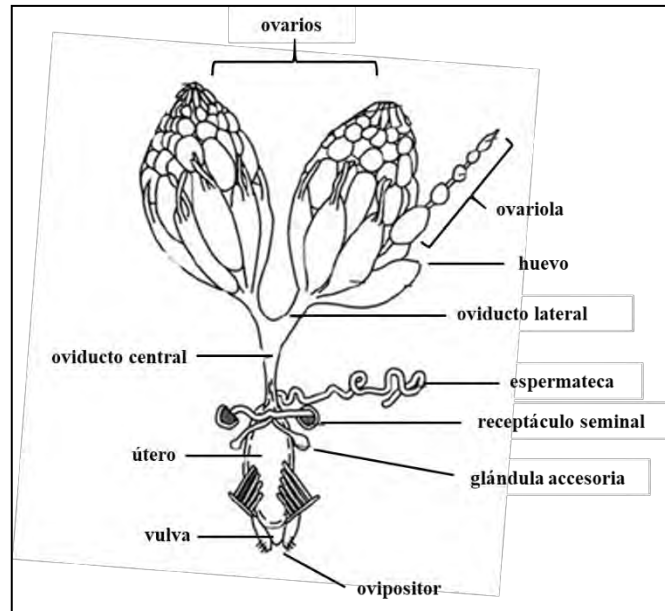


Figura 4. Sistema reproductor de *Drosophila melanogaster*. Está compuesto por un par de ovarios (integrado por un conjunto de 16 ovariolas y huevos maduros), dos oviductos laterales, un oviducto central, útero, vulva, ovipositor y estructuras accesorias; receptáculo seminal, espermateca y glándulas accesorias (Swevers et al., 2005).

El ovario está constituido por 16-20 unidades independientes denominadas ovariolas lugar donde ocurre la ovogénesis, las ovariolas son una secuencia de cámaras progresivas en desarrollo del ovocito (Henderson, 2004). Cada ovariola se encuentra dividida en tres regiones principales (Figura 4), anteroposterior con relación al útero en: filamento terminal, germario y vitelario. El filamento terminal consiste en una fila de 8 a 9 células que conectan al germario con la envoltura circundante de la ovariola y determinan la orientación de su desarrollo (Bjerknes, 1999). El germario es el sitio de residencia de las células madre del linaje germinal (GSCs) por sus siglas en inglés (*Germline Stem Cells*) y somático (SSCs) por sus siglas inglés (*Somatic Stem Cells*) (Figura 5). El vitelario es donde ocurre el proceso de vitelogénesis y coriogénesis (Uryu et al., 2005).

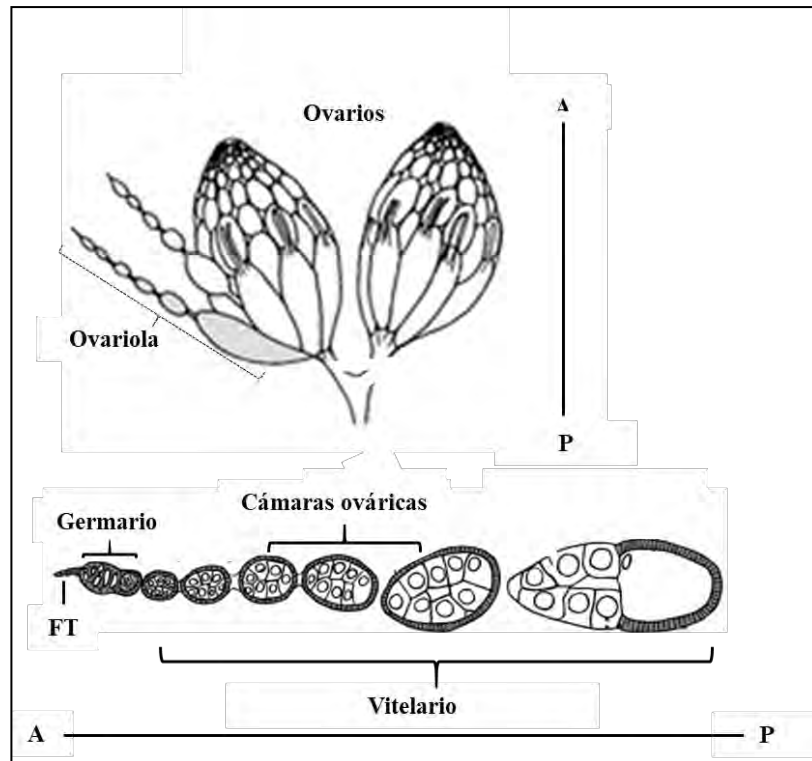


Figura 5. Ovariola y sus componentes. Esquema de la estructura de una ovariola la cual se divide según anteroposterior en; filamento terminal (FT), germario y vitelario. Imagen modificada de Uryu et al. (2005).

2.13 Anatomía del germario de *Drosophila melanogaster*

El germario para su estudio se ha dividido en cuatro regiones 1, 2a, 2b y 3 (Figura 6). En la región 1, se localizan las células madre germinales **GSCs** ancladas a las células de la caperuza **CCs** (*por sus siglas en inglés Cap Cells*), que entran en contacto con las células del filamento terminal **TF** (*Terminal Filament*) que en conjunto con las **CCs** conforman a las células apicales, además de las **CCs** y **TF** las **GSCs** están en contacto con un tipo de células madre somáticas denominadas células madre acompañantes **ESCs** (*Escort Stem Cells*), estos tres grupos de células proporcionan un nicho o microambiente para las células madre germinales, para lograr un equilibrio regulado entre la auto-renovación y la diferenciación de las **GSCs**, esto se logra tanto por una serie de moléculas de señalización secretadas como por conexiones adhesivas directas entre las células madre y sus componentes de nicho (Drummond y Spradling, 2001). En la región 2a, ocurre el desarrollo y división del quiste

germinal que se origina a partir de la división asimétrica de una **GSC**, este quiste continuará dividiéndose y recubriéndose por las **Ecs** células acompañantes (células hijas de las **ESC**s) para su correcto desarrollo hasta ubicarse en la región 2b. En la región 2b se localizan otro tipo de células madre somáticas, las células madre foliculares **FSCs** (*Follicular Stem Cells*), las cuales darán origen a las células precursoras foliculares que posteriormente darán origen a las células foliculares **FCs** que comenzarán a cubrir al quiste germinal con una monocapa de células para que este finalmente quede completamente aislado formando así la primera cámara ovárica que pueda iniciar su desarrollo en la región 3, el cual es también el primer estadio de la ovogénesis **E1** al cual le precede el segundo estadio **E2** y así sucesivamente hasta concluir la ovogénesis en el estadio E1 (Drummond y Spradling, 2001)

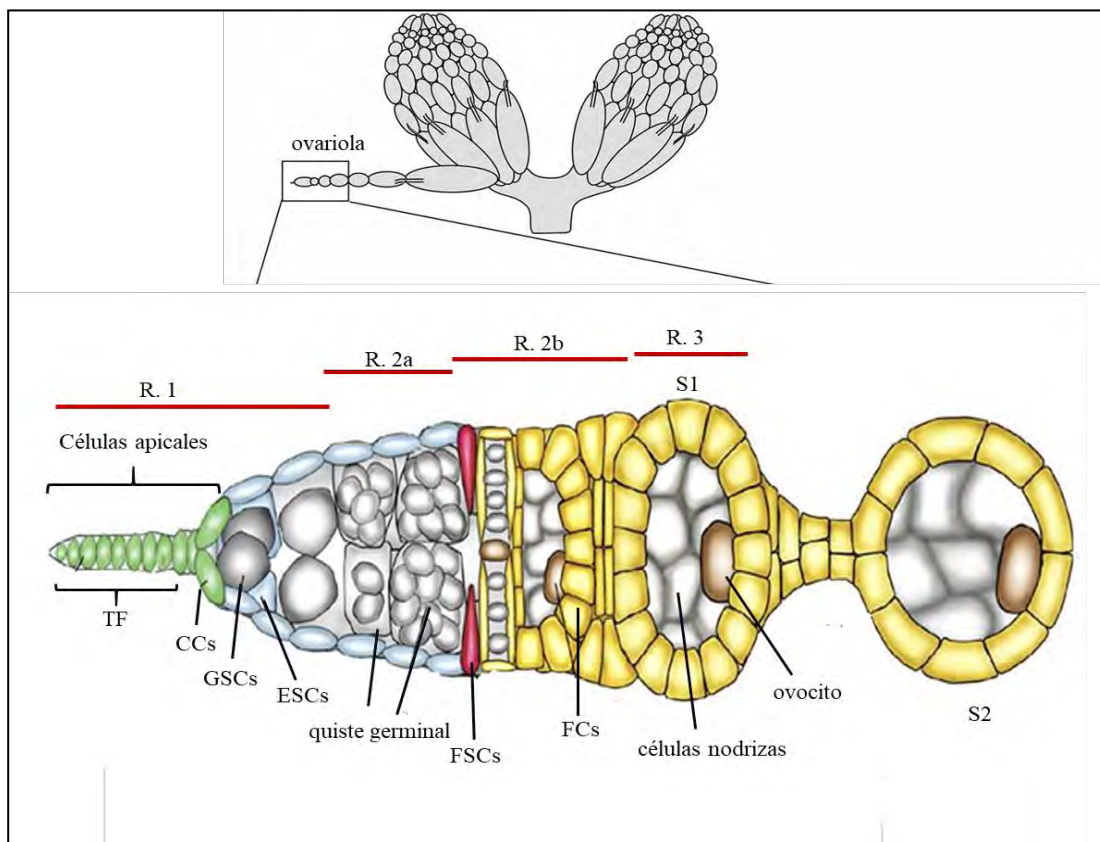


Figura 6. Anatomía del germario en *Drosophila melanogaster*. Región 1. Filamento terminal (TF) y células de la caperza (CCs), células madre acompañantes (GSCs) y células madres germinales (GSC). Región 2a: quiste germinal en desarrollo, borde entre las regiones 2a y 2b células madre folicular (FSCs). Región 2b; quiste germinal rodeado por células foliculares (FCs). Región 3; primer cámara ovárica (primer estadio de ovogénesis), constituida por células nodrizas y el ovocito rodeado por células foliculares. Imagen modificada de Hartman et al. (2013).

2.14 Ovogénesis en *Drosophila melanogaster*

El proceso de ovogénesis inicia en el germario, proceso que se encuentra dividido arbitrariamente, con base en criterios morfológicos en 14 estadios que van desde el estadio 1 (E1) al estadio 14 (E14) (Rodríguez-Arnaiz, 1967). La ovogénesis que lleva a cabo *Drosophila melanogaster* es de tipo meroística politrófica, en este tipo de ovogénesis las células formadas por la ovogonia mantienen entre ellas conexiones citoplasmáticas mediante la formación de canales anulares (Drummond y Spradling, 2001).

El proceso de ovogénesis inicia en la región 1 del germario con la división asimétrica de una GSC (Figura 6), una de las dos células resultantes permanecerá anclada al nicho auto-renovándose como GSC, la otra hija se dividirá cuatro veces consecutivas para dar lugar a un quiste germinal compuesto de 16 células, que permanecerán conectadas a través de canales anurales, resultado de una citocinesis incompleta (Bastock y Johnston, 2008). Las células germinales GSC contienen una estructura citoplasmática esférica llamada espectrosoma, que contiene componentes del citoesqueleto de la sub-membrana. En la primera división de una GSC, el espectrosoma es heredado por una de las dos células hijas, que dará origen al quiste germinal, cuando las 16 células de los quistes germinales se dividen por mitosis, dentro de éstas, se forma una estructura ramificada derivada del espectrosoma, llamada fusoma, que se construye asimétricamente. Esta estructura siempre crece desde el huso de una de las primeras células de la primera división y atraviesa los canales anulares de las células (Bastock y Johnston, 2008). El fusoma controla la orientación de las divisiones, provocando que el quiste contenga 8 células con un anillo, 4 células con dos anillos, 2 células con cuatro anillos y 2 células con tres anillos (Tootle y Spradling, 2008;). La célula que contenga la mayor cantidad de fusoma durante la primera división, será la que se convertirá en el ovocito (Tootle y Spradling, 2008).

Al entrar a la región 2a del germario el quiste germinal es envuelto por células acompañantes Ecs (Escort Cells), cuya función es proporcionar un microambiente adecuado en su diferenciación (Figura 6). En su paso de la región 2a a la 2b del germario, el quiste germinal pierde su unión con las Ecs, una monocapa de células foliculares FCs comenzarán a envolver y rodear al quiste germinal, formando la primera cámara ovárica que le proporciona un microambiente necesario para el desarrollo del ovocito (Figura 6). En el momento en que el

quiste ha sido rodeado por células foliculares, los marcadores de destino celular y de emparejamiento de cromosomas meióticos se restringen a la célula que se convertirá en el ovocito que iniciará la meiosis (Mahowald et al., 1983).

La meiosis inicia en la región 2a del germario, avanza hasta ser arrestada en diploteno de la profase I, en el estadio 5 de la ovogénesis. En el estadio 13, se reanuda la meiosis y progresa hasta metafase I para detenerse en el estadio 14 y se mantiene así hasta la activación del ovocito (Von, 2011). La activación ocurre como consecuencia de presiones mecánicas que tiene el ovocito durante su paso por el oviducto y no como en el caso de los mamíferos donde la activación depende de la fertilización (Mahowald et al., 1983). Las 15 células restantes del quiste germinal se diferenciarán en células nodrizas con capacidad endoreplicadora (mitosis incompletas). Este tipo de células presentan un metabolismo muy activo con el objetivo de sintetizar principalmente ARNs, tanto ribosómicos como mensajeros y proteínas que se transportarán hacia el ovocito. Como consecuencia de la endoreplicación se forman células con núcleos gigantes y con presencia de 512 ejemplares cromosómicos (Cuevas, 2015).

La formación de la primera cámara ovárica concluirá en la región 3 del germario, constituyendo el primer estadio de la ovogénesis (Figura 6). Una vez que esta cámara sale del germario, comenzará a aumentar de volumen antes de que inicie el proceso de vitelogénesis (acumulación de proteínas en el ovocito). Durante el estadio 2 al 7, el citoplasma aumentará considerablemente de tamaño tanto en el ovocito como las células nodrizas (Spradling, 1993). Las células foliculares continuarán dividiéndose para conservar una monocapa que recubra a la cámara ovárica debido a que ésta comenzará a aumentar de tamaño. En el estadio 7, las células foliculares dejarán de dividirse siendo un total de 1000 células que rodearán finalmente a la cámara ovárica (Drummond y Spradling, 2001).

En el estadio 8, se llevará acabo el inicio del proceso de vitelogénesis que concluirá en la etapa 12 de la ovogénesis. Las células foliculares producirán proteínas vitelinas que serán absorbidas por el ovocito. En la etapa 9, un grupo de 6 a 10 células polares del epitelio folicular que reciben el nombre de células del borde, migran de la parte anterior de la cámara ovárica a la parte anterior del ovocito (Duchek et al., 2001). En la etapa 10a, con una gran

cantidad de nutrientes acumulados el ovocito comenzará a aumentar de tamaño ocupando la mitad del volumen de la cámara ovárica (Hudson, 2014). Posteriormente, en la etapa 10b, en presencia de prostaglandina, las células nodrizas se prepararán para llevar a cabo la transferencia de su citoplasma al ovocito, que concluirá en la etapa 11, produciendo filamentos de actina unipolares, que servirán como una red para evitar que los núcleos de las células nodrizas bloqueen los canales de actina o pasen al ovocito (Huelsmann et al., 2013). Después de transferir su citoplasma al ovocito, las células nodrizas morirán por apoptosis (Jenkins et al., 2013). Las células foliculares que se localizan en las partes dorsal y ventral de la cámara comenzarán a migrar de forma centripeta para cubrir al ovocito y separarlo de las células nodrizas (Hudson, 2014). Las células del borde posteriormente formarán el micrópilo, estructura que asegura la entrada del espermatozoide para la fertilización del ovocito (Silver et al., 2005)

Una vez concluida la etapa de vitelogénesis, iniciará el proceso de coriogénesis, en el cual ocurrirá la formación del corión, una estructura que cubrirá y dará protección al ovocito maduro. Las células foliculares sintetizarán la proteína coriónica desde el estadio 1, la cual dejará de sintetizarse hasta el estadio 14 (Orr, 1991), cuando el huevo este completo y listo para ser ovipositado por la hembra (Drummond y Spradling, 2001).

2.14.1 Células madre germinales en el germario

Las células madre se distinguen de otras células por una capacidad única de autorrenovación y producción continua de uno o varios tipos de células diferenciadas a lo largo de la vida de un organismo (Donovan y Gearhart, 2001; Drummond y Spradling, 2001). Dos o tres GSCs, residen en la punta apical del germario los cuales se identifican por su ubicación (anclaje directo al lado posterior de las células de la capa CCs), tamaño (las células más grandes en la punta del germario) y la localización del espectrosoma. Las GSCs, así como los quistes germinales expresan la proteína *Vasa*, el espectrosoma y el fusoma (homólogo en el quiste germinal), son organelos específicos de células germinales, ricos en proteínas del citoesqueleto como; α -*Spectrin* y *Hu li tai shao* (*Hts*) (Lin, 1994; Cuevas, 1996).

La división asimétrica de las GSCs se logra mediante la señalización diferencial del nicho de las GSCs compuesto por las células del filamento terminal TF, las células de la capa CCs y las células acompañantes Ecs. Las GSCs está ancladas a CCs mediante uniones adherentes formadas entre los dos tipos de células (Song, 2002). A medida que las GSCs se dividen, una de las dos células hijas resultantes permanece en contacto con las CCs y la otra queda alejada a una celda de células de las CCs, la hija anterior se renovará como una célula madre germinal y la posterior se diferenciará en un quiste germinal debido a la señalización diferencial desde sus nichos (división asimétrica) (Figura 7) (Xie et al., 2000). Sin embargo, las dos hijas pueden adoptar el mismo destino celular, ya sea de célula madre o quiste germinal cuando se colocan en el mismo entorno. Las dos células hijas de las GSCs se auto-renovarán, si ambas permanecen en el nicho, también ambas pueden convertirse en quistes germinales, si se alejan del nicho debido a la pérdida de las uniones adherentes con las CCs (Song, 2002).

El mantenimiento de las GSCs en el nicho está mediado en gran parte por la activación continua de la vía BMP (**B**one **M**orphogenetic **P**roteins) (Wong et al., 2005). La vía BMP es la mejor estudiada, su función es necesaria y suficiente para la auto-renovación y proliferación de las GSCs (Xie, 1998, Song, 2004). Los ligandos de BMP; Dpp (*Decapentaplegic*) y Gbb (*G*lass-*b*ottomed *b*oat), son expresados en el nicho (Song, 2004). La señal de BMP producida por las células TF, CCs y Ecs, actúa como una señal de corto alcance que controla la autorrenovación de las GSCs reprimiendo directamente la expresión de genes promotores de la diferenciación como; *bam* (*b*ag of *m*arbles) (Figura 7) (Song, 2004 Chen, 2005).

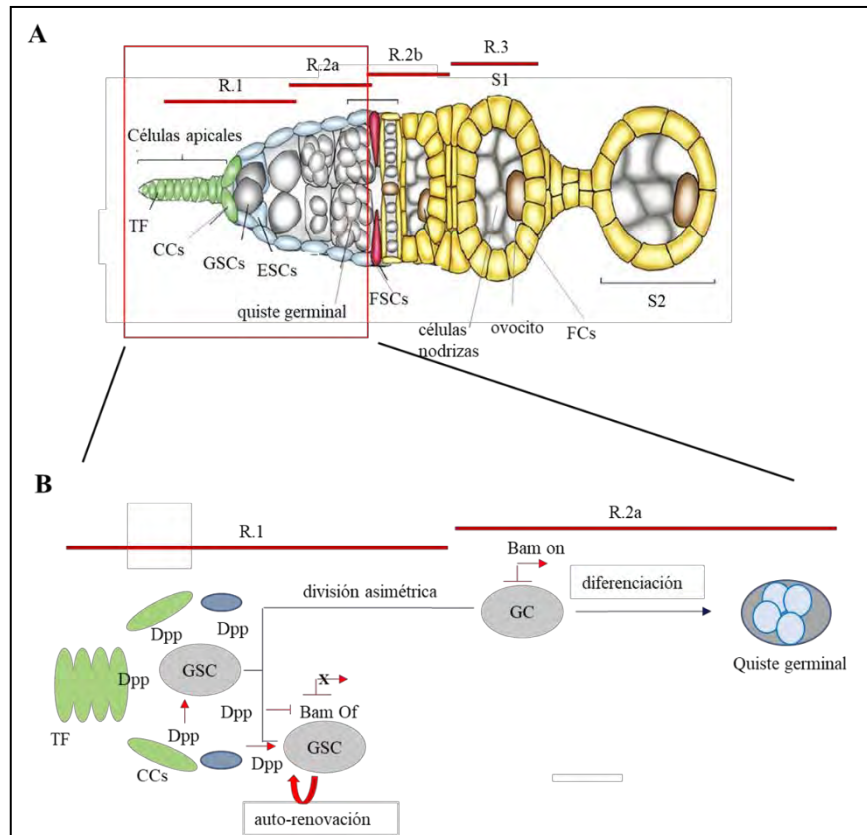


Figura 7. Mantenimiento y diferenciación de las GSCs en el germenio. A) Germario regiones y componentes. B) Autorrenovación y diferenciación de una GSCs. Las células del filamento terminal (TF), las células de la capa (CCs) y las células madre acompañantes (ESCs), expresan el ligando Dpp que mediante la activación de la vía BMP se reprime la expresión del gen *bam*, permitiendo la auto-renovación y mantenimiento de la GSC que permanece anclada al nicho, cuando una GSCs se divide una de las hijas resultantes GC (célula germinal) se ubica lejos del nicho (división asimétrica), por lo tanto dejará recibir la señal secretada por las TF, CCs y ESCs (el ligando Dpp), inactivando la vía BMP lo que permite la expresión del gen *bam*, procediendo a su diferenciación en un quiste germinal (Kirilly, 2005). A) modificada de Hartman et al., (2013B) González-Marín (2018).

Además de los componentes de BMP rio abajo, que se requieren para transducir la señal BMP, se han identificado dos proteínas; Pumilio (Pum) y Nanos (Nos), las cuales también son necesarias para el mantenimiento de las GSCs (Forbes, 1998; Wang, 2004). Las mutaciones en los genes; *pum* y *nos*, provocan la pérdida de las GSCs en el germenio (Gilboa, 2004).

Las proteínas de unión también son importantes para el mantenimiento de las GSCs, mediante el anclaje y la comunicación entre el nicho de las GSCs. Las E-cadherinas se acumulan en el lado anterior de las GSCs, formando uniones adherentes con las CCs y manteniendo a las GSC en el nicho (Song, 2002). Este anclaje es esencial para la auto

renovación de las GSCs a largo plazo, ya que las mutaciones en los dos componentes clave de las uniones adherentes; β -catenina y E-cadherina; Armadillo y Shotgun en *Drosophila*, causan la pérdida de las GSCs (Song, 2002).

2.14.2 Células madre foliculares en el germario

Las células madre foliculares FSCs (**F**ollicular **S**tem **C**ells) localizadas en el borde de la región 2a y 2b del germario son un tipo de células madre somáticas que generan diferentes tipos celulares que en conjunto con las células madre germinales GSCs (**G**erminal **S**tem **C**ells) funcionan de manera coordinada para producir las cámaras ováricas, en las cuales se llevará a cabo el desarrollo del ovocito.

Estos dos tipos de células madre comparten algunos mecanismos moleculares que controlan su mantenimiento y proliferación (Zhang y Kalderon, 2001). Al igual que las GSCs, las FSCs se dividen asimétricamente para generar una célula hija que se auto-renovará en FSCs, y otra hija (célula precursora folicular) las cuales darán origen a las células foliculares FCs (**F**ollicular **C**ells). Las células madre foliculares también están ancladas a las células de su nicho, a través de la adhesión celular mediada por E-cadherinas y β -catenina (Song, 2002). Las células madre foliculares que carecen de E-cadherina se pierden rápidamente de su nicho debido a la carencia del contacto con las Ecs posteriores. Al igual que las GSCs, el nicho de las FSCs está compuesto por las células TF (células del filamento terminal), las CCs (células de la caperuza), la única diferencia entre el nicho de las GSCs y las FSCs son las ECs (células acompañantes) que en el nicho de las GSC son las ESC (células madre acompañante) (Kirilly, 2005). Las Ecs expresan la proteína Gbb activando la señalización de BMP para la auto-renovación y proliferación de las FSCs (Kirilly, 2005).

Las células TF y las CCs expresan el ligando Hh (**H**edge**h**og), el cual funciona como un morfógeno de largo alcance para controlar el mantenimiento de las FSCs (Forbes et al., 1996, Zhang y Kalderon, 2001; King et al., 2001). Las células TF y CCs también expresan el ligando Wg (Wingless), que al unirse con el receptor Fz (**F**rizzled) expresado en las FSCs activa la vía canónica de Wnt, lo que permite la estabilización de Arm (**A**rmadillo/ β -

catenina) en el citoplasma para su translocación al núcleo activando la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en proliferación y diferenciación celular como; c-myc y ciclina D (Song, 2003).

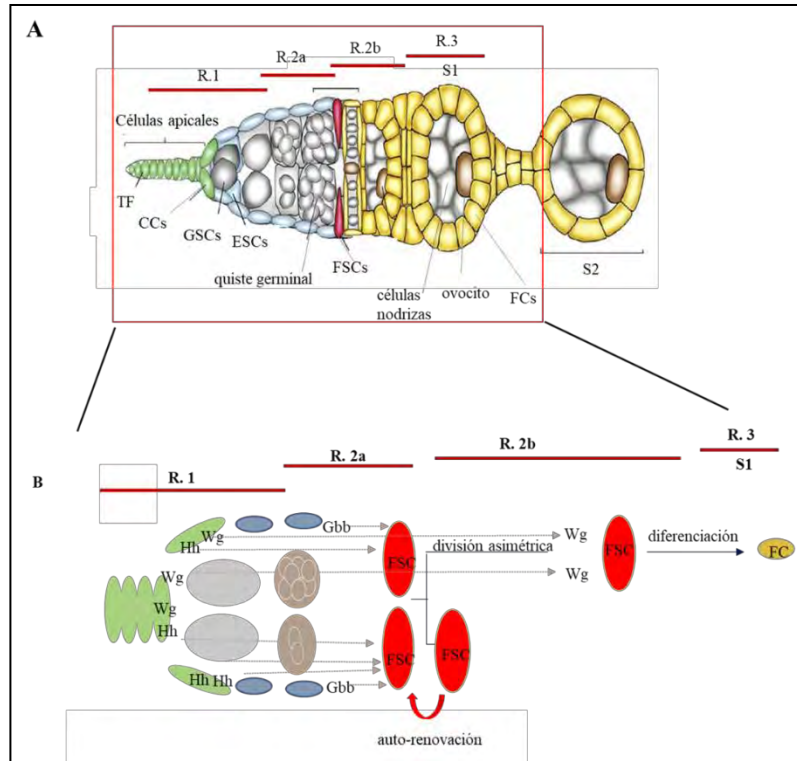


Figura 8. Auto-renovación y diferenciación de las GSCs en el germinario. A) Germario; regiones y componentes. B) Autorrenovación y diferenciación de las células madre foliculares. El nicho de las células madre foliculares (FSCs) compuesto por células del filamento terminal (TF), las células de la capa (CCs) y células acompañantes (ECs). Las ECs promueven el mantenimiento de las FSCs activando la vía BMP a través de él ligando Gbb. Paralelamente las células TF y CCs promueven la autorrenovación mediante la expresión del ligando Hh y la proliferación y diferenciación mediante la activación de la vía Wnt a través del ligando wg (Song, 2003). A) Modificada de Hartman et al., (2013B) González-Marín (2018).

2.15 Vía de señalización Wnt

Esta vía de señalización fue descrita por primera vez en *Drosophila melanogaster*, fue denominada Wingless (*del inglés "sin alas"*), debido a que las alteraciones en esta vía generan un defecto en el desarrollo de las alas y los halterios en la mosca. Las bases para la investigación de esta vía se iniciaron a finales de la década de los 80 y los 90 cuando se descubrió que los genes de *Drosophila melanogaster* (*wg*) y el ratón (*Int1*) eran reguladores de una gran familia de moléculas de señalización conservadas evolutivamente. El término

Wnt es derivado de la contracción de los nombres wingless, *wg* en *Drosophila melanogaster*, e Integrase-1 *Int1*, un proto-oncogén que fue descubierto como un sitio de unión para el virus de tumor mamario en ratón (Reya et al., 2005)

La señalización a través de la vía Wnt comprende una gran familia de proteínas que regulan diversos procesos fundamentales como: la iniciación del desarrollo embrionario, la generación de la polaridad celular, el mantenimiento y diferenciación de las células madre tanto en vertebrados como invertebrados. La alteración de esta vía ha sido descrita en diversos tipos de cáncer; colón, hígado, melanoma, ovario, entre otros (Staal et al., 2008).

Dependiendo del tipo de interacción de la proteína Wnt con su receptor, la disponibilidad de los componentes de señalización y la especificidad de la célula blanco, se han podido identificar aproximadamente diez vías de señalización Wnt (Malhotra et al., 2009). Siendo las más importantes, la vía de polaridad celular planar (PCP), la vía Wnt dependiente de CA^{2+} y la vía Wnt clásica o canónica dependiente de β -catenina (Staal et al., 2008).

En general, todos los genes *wnt* codifican un grupo de glucoproteínas secretadas de 350 a 400 aminoácidos, todas tienen entre 22 y 24 residuos de cisteína conservados y al menos un sitio de glicosilación. Las proteínas Wnt están modificadas lipídicamente, siendo estos residuos lipídicos muy importantes para su secreción y señalización (Clevers, 2006). Hasta ahora, se han descubierto 19 miembros de la familia Wnt en vertebrados, de los cuales hay siete homólogos en *Drosophila* (Tabla 2) (Wodarz, 1998).

Tabla 2. Genes de *Drosophila* y vertebrados que codifican los principales componentes de la vía de señalización Wg / Wnt canónica (Waghmare, 2018).

Genes en <i>Drosophila</i>	Genes en vertebrados	Función
wg Wnt1 Wnt2 Wnt4 Wnt5 Wnt6 Wnt8/ WntD Wnt10	Wnt	Ligando (regulador positivo)

frizzled (fz) frizzled2 (fz2) frizzled3 (fz3) frizzled4 (fz4)	Frizzled (Fz)	Receptor (regulador positivo)
arrow (arr)	receptores de lipoproteínas de baja densidad 5/6 LRP5 o LRP6	Co receptor (regulador positivo)
dishevelled (dsh)	Dishevelled (Dsh o Dvl)	Traductor de señal (regulador positivo)
APC-like (Apc) Adenomatosis polyposis coli 2 (Apc-2)	Adenomatosis polyposis Coli 2 (APC)	Traductor de señal (regulador negativo-componente del sistema de destrucción)
Axina (Axn)	Axina (Axn)	Traductor de señal (regulador negativo-componente del sistema de destrucción)
Shaggy (sgg)	Cinasa Glucógeno sintasa 3 β (GSK3 β)	Traductor de señal (regulador negativo-componente del sistema de destrucción)
Armadillo (arm)	β -Catenina (β -catenina)	Activador co-transcripcional (regulador positivo)
pangolin (pan)	Factor celular T (TCF)	Activador co-transcripcional (regulador positivo)

Las proteínas Wnt se han clasificado en tres grupos, basados en la habilidad para señalizar a través de la vía canónica, de la vía PCP (polaridad celular planar) o la vía Wnt dependiente de CA^{2+} (Tabla 3).

Tabla 3. Principales características de las vías Wnt (Staal et al., 2008)

Vía	Proteína	Receptor	Proteína / vía activada	Factor de transcripción activado
PCP (vía de la polaridad celular planar)	Wnt5 Wnt4, Wnt11	Frizzled-2	RHOA- RHOCK	JNK
Wnt dependiente de Ca^{2+}	Wnt5	Frizzled, DVL	Aumento de Ca^{2+} intracelular	NFAT
Wnt / β -catenina	Wnt-1 Wnt3, Wnt7 Wnt8	Frizzled LRP5/LRP6	β -Catenina	TCF/LEF

2.15.1 Vía Wnt no clásica

De las diversas vías no clásicas que se han descrito en modelos de organismos como *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis* y *Caenorhabditis elegans*, la señalización PCP y Wnt dependiente de Ca^{2+} son las más caracterizadas.

La vía PCP (polaridad celular planar) inicia frecuentemente con cualquiera de estas dos proteínas Wnt5A y Wnt11 en mamíferos, las cuales se unen a su receptor Frizzled y DVL (pero no mediante LRP como en la vía canónica). La proteína DVL en compañía de otra proteína DAAM, activa la vía RHOA – ROCK, la cual regula la reorganización del citoesqueleto, controlando diversos procesos celulares, incluidos la motilidad y la adhesión celular. Así mismo, DVL también activa RAC1, generando que estas pequeñas GTPasas (RHOA y RAC1) activen la señalización de la cinasa N-terminal JUN (JNK), que interviene en la remodelación del citoesqueleto y por lo tanto en la forma de la célula. La vía PCP es importante en la adhesión y migración celular, debido a que induce cambios en el citoesqueleto y también puede inhibir la vía Wnt clásica induciendo una baja expresión de los niveles de la proteína β -catenina (Dosen, 2006).

2.15.2 Vía Wnt dependiente de Ca^{2+}

La vía Wnt dependiente de Ca^{2+} es una vía recientemente estudiada la cual puede afectar la actividad de las otras vías: la clásica y la no clásica (PCP). Las proteínas que posiblemente activan esta vía en mamíferos son: Wnt5A y Frizzled-2, quienes forman el complejo Wnt5A-Frizzled las cuales activan a la fosfolipasa C (PLC), la cual divide al fosfatidilinositol-4-5-bisfosfato (PtdIns (4,5) P₂) en inositol trifosfato (InsP₃) que se une a su receptor que es calcio intracelular almacenado, provocando incremento en los niveles de iones Ca^{2+} citoplasmático, los cuales son normalmente bajos (Dosen, 2006).

2.15.3 Vía Wnt / β -catenina o canónica

La unión de las proteínas Wnt con su receptor puede activar diferentes vías intracelulares siendo la más conocida la denominada vía canónica. Esta cascada de señales inicia con la unión del ligando Wnt a un complejo receptor que engloba al receptor Frizzled (Fz) compuesto por siete dominios transmembranales y a los correceptores LRP5/6 (lipoproteínas de baja densidad tipo 5 o 6) (Dosen, 2006). La vía Wnt canónica tiene como finalidad permitir que en el citoplasma se mantengan niveles adecuados de la proteína β -catenina (armadillo, homólogo en *Drosophila*).

Con la activación de la vía Wnt en la célula, β -catenina citoplasmática se estabiliza, se transloca al núcleo y activa la transcripción de genes diana a través de complejos formados por los factores de transcripción TCF/Lef1. En ausencia del ligando Wnt, β -catenina se une a Axina y APC (poliposis coli adenomatosa) y a la proteína casein quinasa 1 CK1 constituyendo el denominado complejo de destrucción. En el mismo es fosforilada, principalmente por la enzima cinasa glucógeno sintetasa 3β GSK3 β , para su degradación posterior por el proteosoma. En presencia del ligando Wnt este complejo se disocia y la enzima GSK3 β no puede fosforilar a β -catenina permitiendo que se alcancen niveles estables en el citoplasma para su translocación al núcleo activando la transcripción de genes relacionados con la proliferación y diferenciación celular (Figura 9) (Kühl, 2000). El funcionamiento de la vía canónica de Wnt es similar en vertebrados y *Drosophila* (Banziger, 2006).

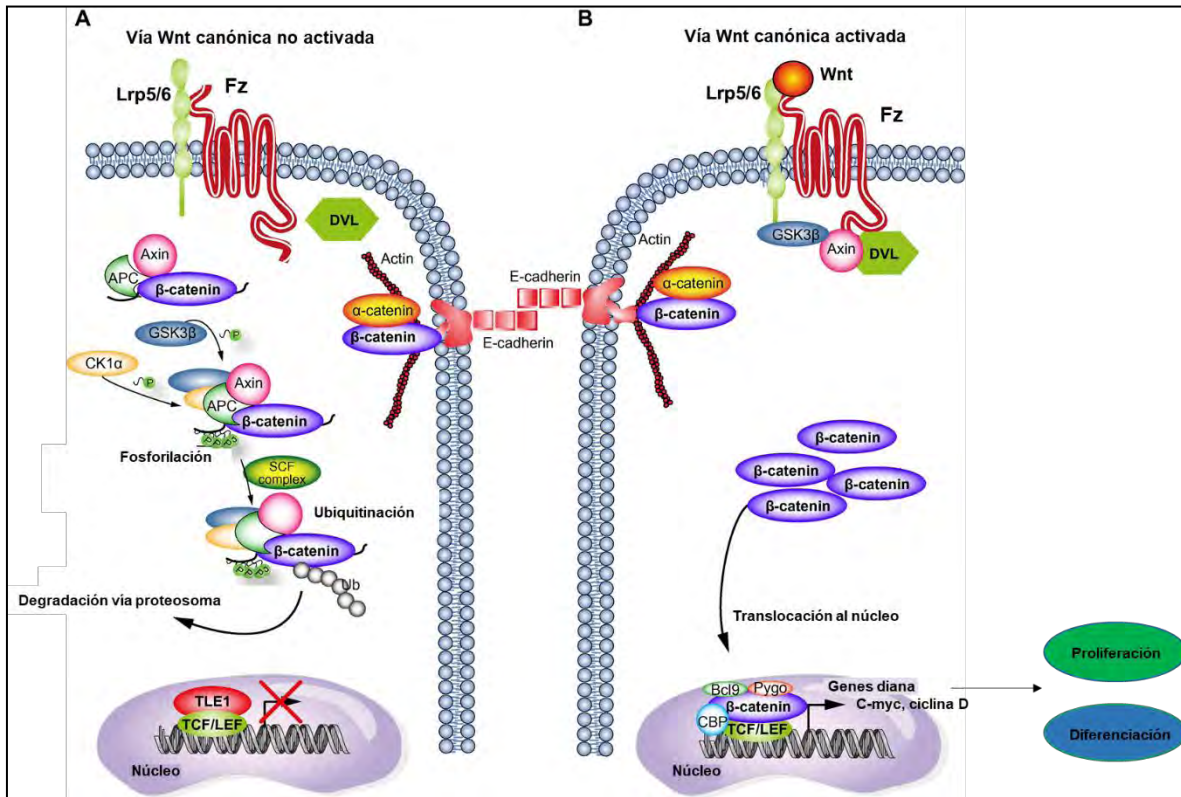


Figura 9. Esquema de la vía Wnt / β-catenina.

A) Vía Wnt / β-catenina no activada. En ausencia del ligando Wnt, la proteína β-catenina citoplasmática es degradada por un complejo proteico que comprende: a) la enzima glucógeno sintasa cinasa 3β (GSK-3β) cuya función es marcar, mediante fosforilación, a β-catenina para su ubiquitinación y rápida degradación mediante el proteosoma; b) una proteína supresora de tumores llamada poliposis coli adenomatosa (APC), que incrementa la afinidad del complejo de degradación hacia β-catenina, lo que es necesario para una efectiva fosforilación de β-catenina por GSK-3β; c) una proteína de agregación llamada Axina, que es la encargada de mantener unido al complejo de degradación; d) la enzima caseína cinasa 1α (CK1α) que, junto con GSK-3β, median la fosforilación de residuos amino terminal de β-catenina, que serán reconocidos por una proteína que contiene repeticiones β-transducina (β-TrCP) para su degradación. En el núcleo, en ausencia de la proteína β-catenina, los genes diana de la vía de señalización Wnt son normalmente inhibidos por un complejo proteico que incluye al factor estimulador linfocitario (LEF) y al factor de células T (LEF-1/ TCF) unidos a la proteína co-receptora Groucho (Kühl, 2000).

B) Activación de la vía Wnt / β-catenina. La activación de la vía inicia con la secreción del ligando Wnt y su unión al receptor de superficie celular Frizzled (Fz). Los receptores Fz pertenecen a una familia de proteínas con siete regiones transmembranales, son estructuralmente similares a los receptores ligados a proteínas G y tienen un dominio extracelular llamado “dominio rico en cisteína” (CRD), que se acopla a las moléculas Wnt. La activación del receptor Fz recluta a la proteína Dishevelled (Dvl) que, posteriormente, es fosforilada. La unión de Wnt con el receptor Fz requiere la participación de proteínas relacionadas con los receptores de lipoproteínas de baja densidad LRP5 o LRP6. La activación de la proteína Dvl bloquea al complejo proteico citoplasmático (GSK-3β, CK1α, APC y Axina) encargado de la degradación de β-catenina. La inhibición de la degradación de β-catenina ocasionada por el ligando Wnt da como resultado la acumulación de la proteína en el citoplasma y su posterior translocación al núcleo para formar un complejo con LEF-1/TCF, que desplaza a la proteína Groucho y adopta la función de coactivador, induciendo la transcripción de genes diana de la vía Wnt. Entre los genes diana activados por esta vía de señalización se encuentran: c-Myc, c-Jun, ciclina-D, relacionados con el crecimiento y la proliferación y diferenciación celular (Adachi, 2007).

2.15.4 La vía Wnt / β -catenina y su relación con el cáncer

Los genes Wnt se descubrieron originalmente como una familia de proto-oncogenes. Diversas enfermedades se originan como consecuencia de alteraciones en la vía Wnt; sin embargo, la mayor parte de los estudios se enfocan a su relación con cáncer. La vía Wnt- β -catenina se ha identificado como la principal responsable de alteraciones celulares que derivan en cáncer (Ochoa-Hernández, 2012). En la actualidad se conocen varios genes reguladores de esta vía que se encuentran alterados en diferentes cánceres humanos. En la tabla 4 se muestra padecimientos causados o asociados con alteraciones de algunos genes de esta vía.

Tabla 4. Genes de la vía Wnt- β -catenina y su relación con diferentes tipos de cáncer (Ochoa-Hernández, 2012).

Gen	Defecto	Enfermedad o fenotipo asociado	Referencia
APC	Pérdida de función	Poliposis adenomatosa familiar (PAF), cáncer colorrectal esporádico	Logan, 2004.
AXINA1	Pérdida de función	Carcinoma hepatocelular, meduloblastomas esporádicos, cáncer colorrectal esporádico, carcinomas de células escamosas esofágicas	Logan, 2004.
AXINA2	Pérdida de función	Agenesia dental familiar, cáncer colorrectal, carcinoma de células escamosas de esófago, cáncer de colon, meduloblastoma y carcinoma hepatocelular	Adamson, 1994; Logan, 2004; Alberts, 2005; Villanueva, 2010.
β -catenina	Mutación oncogénica	Cáncer colorrectal esporádico, carcinoma hepatocelular, melanoma, cáncer endometrial,	Logan, 2004; Suzuki, 2004; Alberts, 2005.

		cáncer de ovario, cáncer gástrico y cáncer de próstata.	
FRPs	Metilación	Cáncer colorrectal esporádico, cáncer pancreático, carcinoma de células renales	Logan, 2004.
TCF7L2	Actividad alterada	Cáncer de próstata, cáncer de mama y cáncer colorrectal.	Kirikoshi, 2002; Reya, 2005; Villanueva, 2005; Winn, 2006
TCF1	Expresión aumentada	Leucemia linfocítica crónica	Clement, 2006.
WNT16	Expresión aumentada	Leucemia linfocítica crónica	Kühl, 2000.
WNT7A	Expresión alterada	Leucemias	Clement, 2006; Vermeulen, 2010.

Asimismo, algunos de estos genes en los que se han introducido mutaciones dirigidas, promueven cáncer en roedores u otros modelos animales. En todos estos casos el común denominador es la modificación en la expresión de los genes diana de la vía de señalización Wnt- β -catenina (Johnson, 2006). Existen también varios reportes en los cuales la vía Wnt- β -catenina se ha relacionado con enfermedades neurodegenerativas, en la regulación de la densidad ósea, osteoartritis, calcificación de la válvula aórtica y alteración en la proliferación y supervivencia de las células madre (Johnson, 2006). Está demostrado que la vía de señalización Wnt- β -catenina también participa en otros tipos de cáncer como el de páncreas, ovario, próstata, mama y hepatocelular (Takahashi, 2007).

III JUSTIFICACIÓN

El mercurio ocupa el tercer lugar en la Agencia del Gobierno de Estados Unidos para sustancias tóxicas y en el registro de los elementos o sustancias más tóxicas del planeta junto con el arsénico y el plomo (USDHHS, 1999). El mercurio continuamente se deposita en la atmósfera y es consumido en múltiples alimentos y agua (Clifton, 2007; USDHHS, 1999).

Las actividades humanas casi triplicaron la cantidad de mercurio en la atmósfera, la carga atmosférica está aumentando 1.5 % por año (Clifton, 2007). En América Latina en 1982, se producía alrededor de un 3% del mercurio total a nivel mundial. El más grande productor es México (221 ton/año), seguido por República Dominicana (1.8 ton/año). Del total de mercurio extraído, solo el 74% es aprovechado y el resto 26% se incorpora al ambiente como contaminante atmosférico (USDHHS, 1999). Una vez en la atmósfera, el mercurio se deposita en el suelo y agua, el suelo contaminado con mercurio o la redistribución del agua contaminada tiene el potencial de ingresar a la cadena alimentaria a través de las plantas, el ganado y el pescado (Rice, 1997; Goldman, 2001). El mercurio puede bioacumularse y causar efectos adversos en la salud humana (Harada, 1999).

Se ha relacionado al mercurio con la infertilidad en hombres y mujeres, estudios en *in vivo* e *in vitro* han demostrado efectos tóxicos potenciales del mercurio en el sistema reproductor, así como en la fertilidad, y la alteración hormonal. Además, se ha relacionado al mercurio con la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) causando estrés oxidante, el cual daña al ADN, causa peroxidación de lípidos, reducción de grupos sulfhidrilos, alteraciones en vías de señalización celular, entre otros (Tsuzuki et al., 1994; Chen et al., 2005; Valko et al., 2005). En la actualidad no se conocen los mecanismos moleculares por los cuales el mercurio afecta la fertilidad tanto en animales como en seres humanos. Con base en lo anterior este estudio fue diseñado para analizar los efectos del HgCl₂ en la vía de señalización Wnt en ovarios adulto de *Drosophila melanogaster*, así como su asociación con la infertilidad y daño al ADN, después de 72 h de exposición a 0, 0.3, 3 y 30 mM de HgCl₂ con 72 de recuperación.

IV OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar los efectos del mercurio sobre la vía de señalización Wnt en ovarios adulto de *Drosophila melanogaster*.

Objetivos particulares

1. Evidenciar que el HgCl₂ a 0.3, 3 y 30 mM, induce alteraciones morfológicas y estructurales en el ovario de *Drosophila melanogaster* silvestre y transgénica *Fz3-RFP* después de 72 horas de exposición.
2. Identificar si el HgCl₂ afecta el proceso de ovogénesis en hembras de *Drosophila melanogaster Fz-RFP* después de 72 horas de exposición a 0, 0.3, 3 y 30 mM de HgCl₂.
3. Evaluar la tasa de fertilidad en hembras de *Drosophila melanogaster Fz-RFP* después de 72 horas de exposición a 0 y 30 mM de HgCl₂.
4. Construir la cepa de *Drosophila melanogaster Chk 1, 2; Fz3-RFP*, acoplado el mutante para las cinasas 1 y 2 Chk1,2 al transgénico *Fz3-RFP*.
5. Evaluar si el daño al ADN se asocia con alteraciones en la; morfología y estructura de los ovarios y ovogénesis exponiendo hembras de la cepa *Chk 1, 2; Fz3-RFP* a 0.3, 3 y 30 mM de HgCl₂ por 72 horas.
6. Determinar la tasa de fertilidad en hembras de *Drosophila melanogaster Chk1,2; Fz-RFP* después de 72 horas de exposición a 0 y 30 mM de HgCl₂.

7. Analizar si el cloruro de mercurio afecta la vía señalización Wnt visualizando la expresión del reportero Fz3-RFP en el germario *Drosophila melanogaster* de la cepa *Fz3-RFP* mediante microscopia de confocal.
8. Elaborar la cepa de *Drosophila melanogaster* transgénica *Bam-GFP, Fz3-RFP* para determinar si a 0.3, 3 y 30 mM de HgCl₂, se afecta la diferenciación de las células madre germinales y foliculares visualizando el germario mediante microscopia de confocal.

V HIPÓTESIS

Se ha evidenciado que el mercurio altera la estructura y función del sistema reproductor femenino en modelos animales, entonces efectos similares se observarán en ovarios de *Drosophila melanogaster* con cambios en la expresión de la vía de señalización Wnt y en la fertilidad.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Elaboración de las soluciones de HgCl₂

Con base a estudios previos (datos no mostrados). Se elaboraron tres soluciones con las siguientes concentraciones 0.3, 3.0 y 30 mM de HgCl₂, disueltas en agua desionizada. El HgCl₂, (solución saturada $\geq 6.5\%$ p/v) fue donado por Meyer, Ciudad de México.

6.2 Cepas transgénicas de *Drosophila melanogaster*

En Tabla 5, se muestran las cepas de *D. melanogaster* usadas en los ensayos de exposición con las diferentes concentraciones de cloruro de mercurio (HgCl₂). Las cepas *Bam-GFP*, *Fz3-RFP* y *Chk1,2; Fz3-RFP*, fueron generadas en el laboratorio como se muestran en las figuras 10 y 11. Todas las cepas fueron mantenidas a 25 °C, en viales con medio de cultivo elaborado a base de levadura, agar, sacarosa y harina, durante 10 días para obtener hembras vírgenes recién eclosionadas para los experimentos con 0.3, 3.0 y 30 mM de HgCl₂.

Tabla 5. Cepas de *Drosophila melanogaster* utilizadas en los esquemas de tratamiento con HgCl₂.

Cepa	Genotipo	Función de la cepa
CANTÓN	Silvestre	Silvestre
<i>Fz3-RFP</i>	w; sco/CyO; Fz3-RFP/Fz-RFP	Visualización de la expresión espacio temporal del receptor Fz3 mediante la expresión de una RFP
<i>Chk1,2; Fz3-RFP</i>	w; MNKp6, GRP/CyO; Fz3-RFP/ Fz3-RFP	Cepa mutante con delección del gen <i>grp</i> (Chk-1) y <i>mnkp62</i> (Chk-2) acoplada a la cepa transgénica <i>Fz3-RFP</i> para la

		vinculación de daño al ADN con los efectos del HgCl ₂
<i>Bam-GFP, Fz3-RFP</i>	w; sco/CyO; Bam-GFP, Fz3-RFP/ Bam-GFP, Fz3-RFP	Visualización de la expresión espacio temporal de Bam mediante la expresión de una GFP

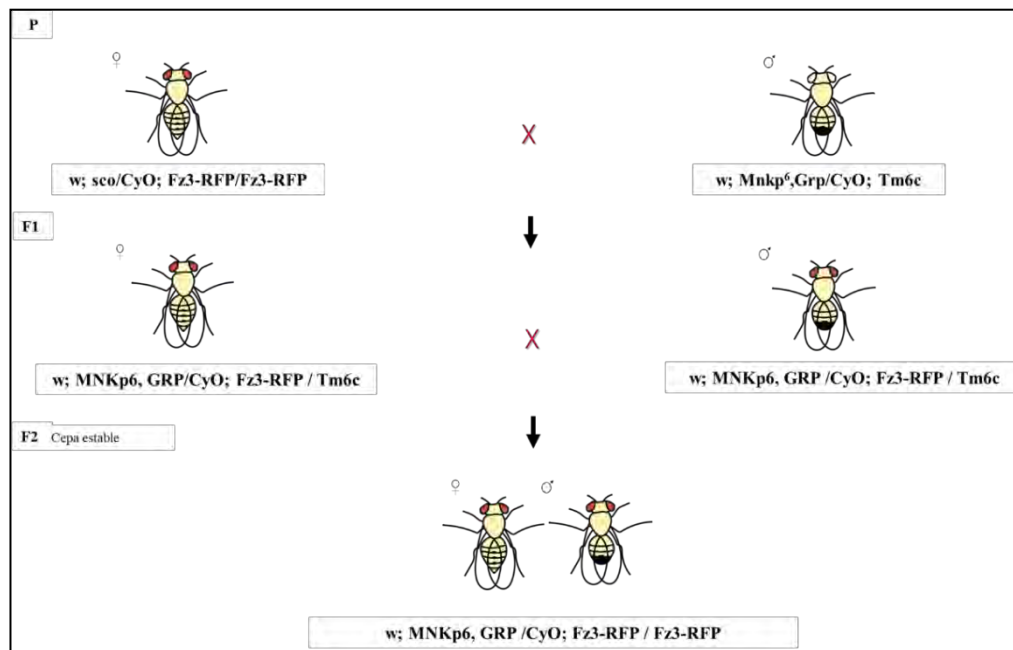


Figura 10. Esquema de apareamiento de la cepa mutante *Chk1,2* y transgénica *Fz3-RFP* para la generación de la cepa mutante; *w; MNKp6, GRP/ CyO; Fz3-RFP/Fz3-RFP*.

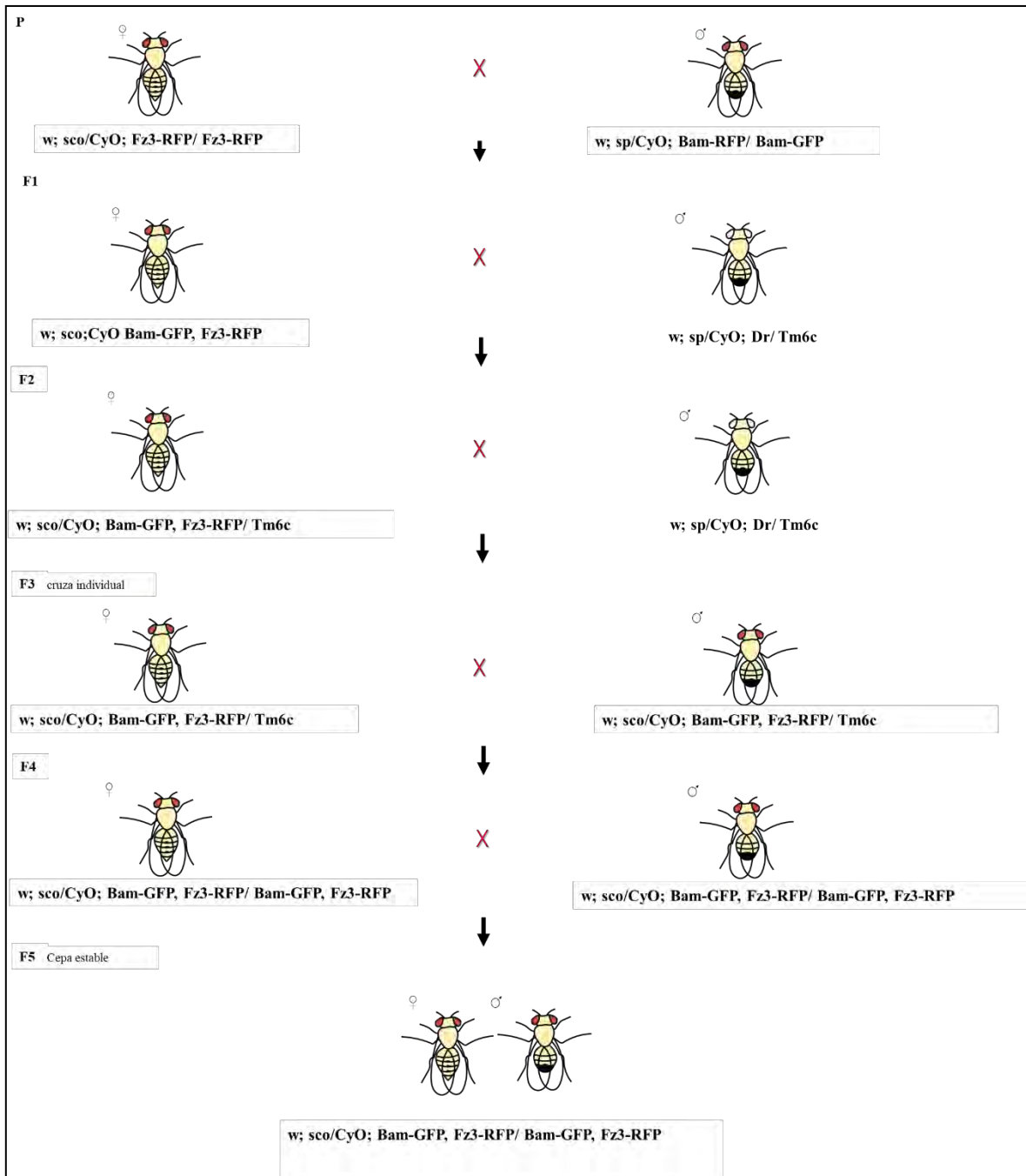


Figura 11. Esquema de apareamiento de la cepa transgénica *Bam-GFP* y trasngénica *Fz3-RFP* para la generación de la cepa transgénica; *w; sco/CyO; Bam. GFP, Fz3-RFP/ Bam-GFP, Fz3-RFP*.

6.3 Esquema de tratamiento a HgCl₂

Diez hembras recién eclosionadas (vírgenes) de cada cepa (Tabla 7) de *D. melanogaster*, fueron alimentadas con una mezcla de medio de cultivo y 0.3, 3 y 30 mM de HgCl₂ por 72 h a 25 °C, más un grupo testigo con medio de cultivo sin cloruro de mercurio bajo las mismas condiciones que los grupos experimentales. Después de 72 horas de exposición las hembras de cada tratamiento fueron transferidas a viales con medio de cultivo fresco sin HgCl₂ que contenían machos no expuestos a mercurio de la misma edad y cepa correspondiente para su recuperación por 72 horas a 25 °C. Adicionalmente se colocó un grupo con machos y hembras recién eclosionados de la cepa Cantón los cuales fueron expuestos al mismo tiempo a 0.3, 3 y 30 mM de HgCl₂ por 72 h a 25 °C, más un grupo testigo con medio de cultivo sin cloruro de mercurio posterior al tratamiento se colocaron 72 horas para su recuperación (Figura 12). Se realizaron 3 experimentos independientes para cada tratamiento

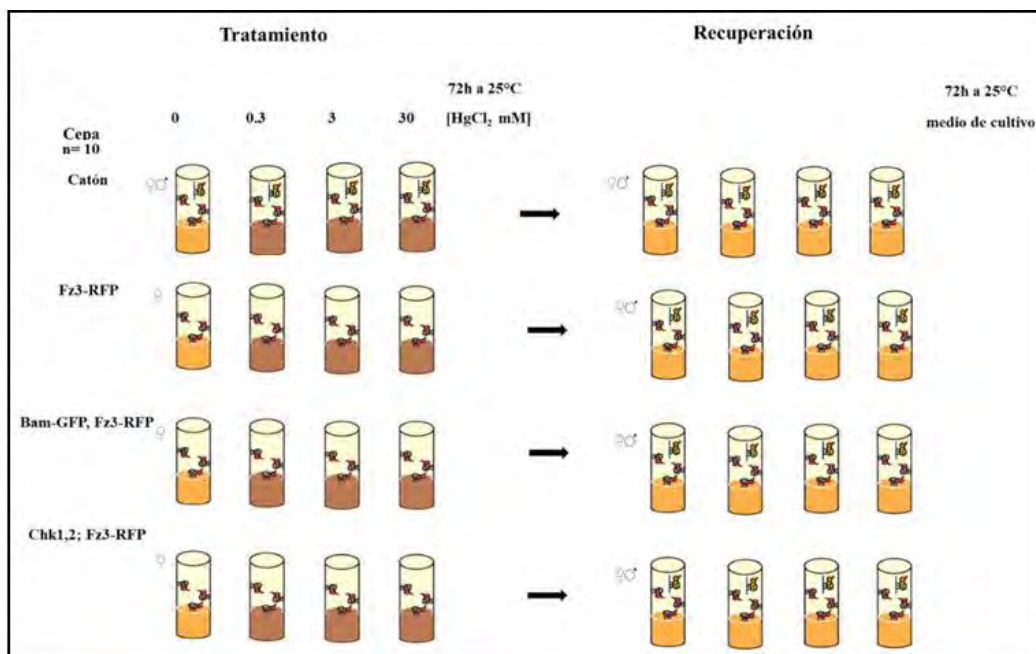


Figura 12. Esquema de tratamiento con HgCl₂.

6.4 Disección y fijación de ovarios

Después de 72 horas de exposición a HgCl_2 y 72 horas de recuperación, todas las hembras de cada cepa fueron sacrificadas para la disección de ovarios como se muestra en la figura 13. Por cada concentración de HgCl_2 se analizaron 20 ovarios (dos por organismo), los cuales fueron fijados en 300 μL de paraformaldehído (PAF, 4%,) durante 40 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró el fijador y los ovarios fueron lavados 3 veces con 500 μL de PBS 1X, después las muestras fueron almacenadas a 5 °C con 500 μl de PBS 1X. Las muestras de las cepas; *Fz3-RFP*, *Bam-GFP*, *Fz3-RFP* y *Chk1,2; Fz3-RFP* fueron divididas para su análisis mediante microscopía confocal y morfométrico (tamaño, número de huevos y de ovariolas, identificación y cuantificación de los estadios de la ovogénesis). Los ovarios de la cepa *Catón* se determinó únicamente el tamaño.

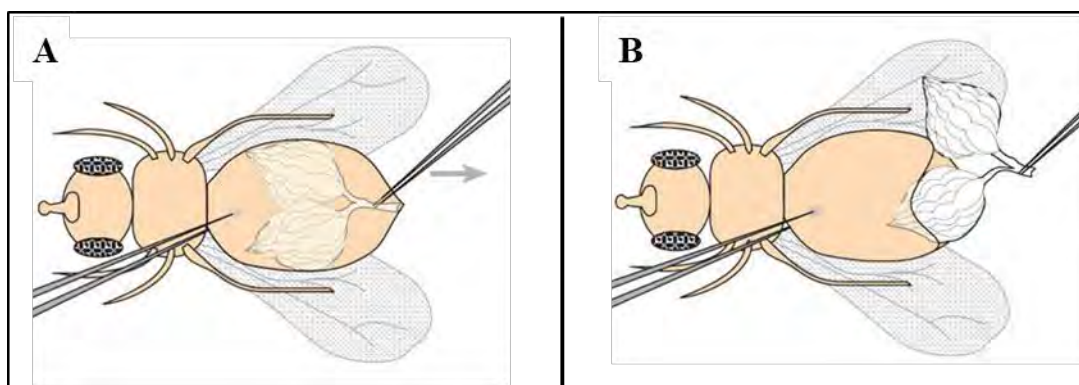


Figura 13. Imagen esquemática de disección de ovarios de *Drosophila melanogaster*. A. La mosca es sujeta con una pinza por el tórax o por la parte anterior del abdomen y con otras pinzas se realiza una incisión en la parte media del abdomen. B. A continuación se toma la parte posterior del abdomen y se jala lentamente para extraer los ovarios. Con ambas pinzas se limpian cuidadosamente para remover residuos de otros tejidos (Manning y Starz, 2015).

6.5 Análisis morfométrico

Para el análisis morfométrico se utilizaron los 20 ovarios de cada tratamiento con HgCl_2 , para determinar el tamaño (mm) se midió y obtuvo el promedio entre el largo y ancho de cada ovario con ayuda de un portaobjetos de vidrio graduado milimétricamente Vectashield (Vector Labs). (Figura 14A). Cada ovario fue disgregado en ovariolas y huevos para su cuantificación (Figura 14B). Posteriormente en cada ovariola se cuantificó y determinó el último estadio de la ovogénesis (Figura 14C).

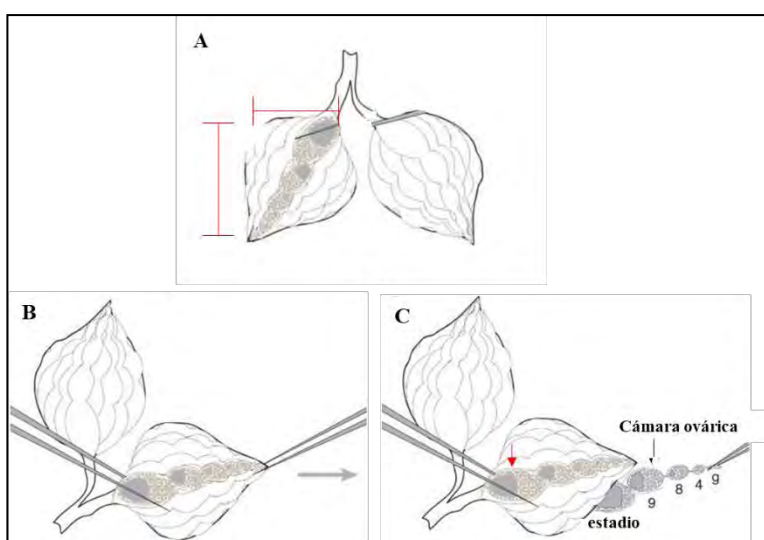


Figura 14. Medición de los ovarios y extracción de ovariolas para su análisis morfométrico de hembras expuestas y no expuestas a HgCl_2 . A. Medición de los ovarios largo y ancho. B. Disgregación y conteo de ovariolas y huevos. C. Identificación y cuantificación del último estadio de la ovogénesis en las ovariolas observado en la última cámara ovárica (flecha roja) (Manning y Starz, 2015).

6.6 Ensayo de fertilidad

Para evidenciar los efectos del cloruro de mercurio sobre la tasa de fertilidad en las hembras de las cepas; *Fz3-RFP* y *Chk1,2; Fz3-RFP*, después de 72 horas de exposición a HgCl_2 y 72 horas de recuperación con machos, las hembras y machos fueron transferidos a cajas Petri con medio de cultivo fresco sin mercurio acopladas a un frasco con una red para la captura de huevos mantenidas a 25 °C. Las cajas fueron removidas cada 12 horas para el conteo de huevos ovipositados durante 5 días. Se realizaron tres ensayos de manera independiente.

6.7 Inmunofluorescencia en microscopía confocal

Para la detección de la expresión de las proteínas VASA y Fasiclin III en el germario, después de la fijación, los ovarios se lavaron tres veces durante 5 min cada uno con PBT (PBT 1X 0,5% Tritón X-100) y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con una solución bloqueante (PBT 1X, 0,5% Tritón y 1% BSA), posteriormente se incubó durante la noche a 4 °C con el anticuerpo primario (conejo anti-VASA, 1:500, y ratón anti-Fasiclin III regalo de R. Lehmann). Las muestras se lavaron tres veces durante 20 min cada una con PBT y se incubaron 2 horas con el anticuerpo secundario (fluoresceína (FITC) AffiniPure Anti-conejo IgG (H + L), 1:400 y fluoresceína (Cy5) AffiniPure Anti-ratón IgM (H + L), 1:500), luego se lavaron tres veces durante 20 min con PBT 1X a temperatura ambiente y una vez en PBS 1X, consecutivamente se incubaron durante 5 min en una solución de PBS 1X, 1 µg / mL de DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) para la tinción de los núcleos, se montaron en portaobjetos de vidrio en Vectashield (Vector Labs). Las muestras se analizaron con LEICA TCS SP8 microscopio de fluorescencia confocal con un objetivo a 63X. El microscopio fue proporcionado por la Facultad de Ciencias UNAM (Mojica-Vázquez et al., 2018).

6.8 Análisis estadístico

El promedio del tamaño de los ovarios, número de ovariolas y huevos, de todos los organismos expuestos y no expuestos a 0, 0.3, 3 y 30 mM de HgCl₂, fueron obtenidos de tres experimentos independientes y expresados como promedios ± error estándar (E.E), se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación múltiple (Dunnet) para determinar las diferencias significativas entre los grupos experimentales y testigo de cada parámetro evaluado. La tasa de fertilidad fue evaluada mediante un ANOVA de dos vías y una prueba de comparación múltiple (Bonferroni). Todas las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el software Graphpad Prisma versión 5 (Calderón-Segura et al., 2017).

VII RESULTADOS

7.1 Morfometría de ovarios de *Drosophila melanogaster* silvestre Cantón y transgénica *Fz3-RFP* expuestos y no expuestos a cloruro de mercurio (HgCl_2).

Con el objetivo de confirmar que el HgCl_2 induce cambios morfológicos en los ovarios de *Drosophila melanogaster* silvestre (*Cantón*) y transgénica (*Fz3-RFP*), y que estos cambios no están determinados por la ausencia de machos en las primeras horas de vida de las hembras para estimular la ovogénesis o por la condición genética de las moscas, se expusieron hembras y machos de la cepa silvestre a 0, 0.3, 3 y 30 mM de HgCl_2 a 72 h y 72 h de recuperación. Paralelamente se expusieron hembras recién eclosionadas (vírgenes) de la cepa transgénica a 0, 0.3, 3 y 30 mM de HgCl_2 a 72 h y 72 h de recuperación con machos *Fz3-RFP* de la misma edad no expuestos a HgCl_2 .

Los datos evidencian que los ovarios de las hembras de ambas cepas y condiciones expuestas a 0.3 mM de HgCl_2 muestran incremento significativo en el tamaño de los ovarios comparado con el grupo testigo (0 mM de Hg) ($p < 0.001$), mientras que las hembras de la cepa silvestre y transgénica expuestas a 30 mM HgCl_2 presentan reducción significativa del tamaño de los ovarios con relación al grupo testigo ($p < 0.001$). Con 3 mM de HgCl_2 , los ovarios de ambas cepas no muestran cambios en el tamaño comparados con el grupo testigo (Tabla 6, Gráfica 1).

Tabla 6. Promedios del tamaño de los ovarios de hembras de la cepa silvestre y transgénica después 72 h de exposición a 0, 0.3, 3 y 30 mM de HgCl₂ y 72 h de recuperación.

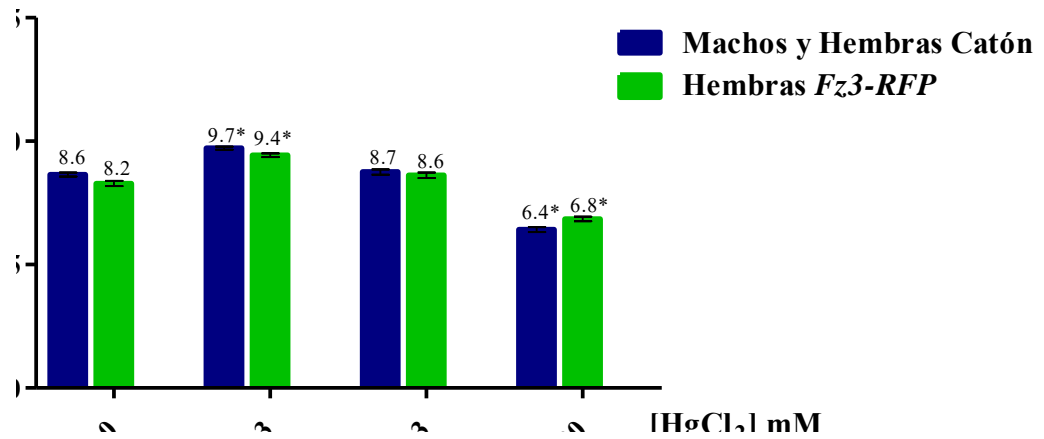
Cepa	^a Silvestre <i>Catón</i> ♂♀			^b Transgénica <i>Fz3-RFP</i> ♀		
	^c Tamaño (mm)					
HgCl ₂ mM	\bar{X}	±	EE	\bar{X}	±	EE
0	8.6	±	0.41	8.2	±	0.58
0.3	9.7*	±	0.34	9.4*	±	0.41
3	8.7	±	0.50	8.6	±	0.61
30	6.4*	±	0.58	6.8*	±	0.53

^a hembras y machos silvestres

^b hembras vírgenes de la cepa transgénica *Fz3-RFP*

^c Promedios de tres experimentos independientes (n=30)

*Diferencias significativas con respecto al grupo testigo negativo (0 mM), análisis de varianza (ANOVA) prueba post-hoc Bonferroni (p<0.001).



Grafica 1. Promedios del tamaño de los ovarios de las hembras de la cepa silvestre y *transgénica* después de 72 h de exposición a 0, 0.3, 3 y 30 mM de HgCl₂ y 72 h de recuperación. * diferencia significativa con respecto al testigo negativo (0 mM de HgCl₂) (p<0.001).

7.2. Morfometría de ovarios de hembras transgénicas (*Fz3-RFP*) expuestos y no expuestos a cloruro de mercurio (HgCl₂)

Los resultados obtenidos en hembras transgénicas después de 72 h de exposición a 0.3 mM de HgCl₂ y 72 h de recuperación, demuestran que el tamaño de los ovarios y el número de huevos aumenta significativamente (Imagen 15 B). (Tabla 7, Grafica 2 A, B). Pero la cantidad de ovariolas no se modifica con relación a los valores del grupo testigo (0 mM de HgCl₂) ($p < 0.001$) (Tabla 7, Grafica 2 C). Con 3 mM de HgCl₂, el tamaño de los ovarios (Imagen 15 C) y el número de ovariolas y huevos no se modifican con relación al grupo testigo (Tabla 9, Grafica 2 A, B, C). A 30 mM de HgCl₂, el tamaño de los ovarios disminuye significativamente (Imagen 15 D), así como el número de ovariolas y huevos con respecto a los valores del grupo testigo ($p < 0.001$) (Tabla 7, Gráfica 2, A, B, C).

Tabla 7. Promedios del tamaño de los ovarios, número de ovariolas y huevos de hembras de la cepa transgénica (*Fz3-RFP*) después de 72 h de exposición a 0, 0.3, 3, y 30 mM de HgCl₂ y 72 h de recuperación.

Cepa transgénica <i>Fz3-RFP</i>	Tamaño (mm) ^a			N. Ovariolas ^a			N. Huevos ^a		
	\bar{X}	\pm	EE	\bar{X}	\pm	EE	\bar{X}	\pm	EE
[HgCl ₂] mM									
0	8.2	\pm	0.58	20	\pm	0.13	16	\pm	1.73
0.3	9.4*	\pm	0.41	20	\pm	1.19	26*	\pm	3.34
3	8.6	\pm	0.61	18	\pm	1.51	14	\pm	3.91
30	6.8*	\pm	0.53	13*	\pm	2.74	2*	\pm	1.49

^a Promedios de 3 experimentos independientes n=10

* Diferencias significativas con respecto al grupo testigo negativo (0 mM de HgCl₂), análisis de varianza (ANOVA) prueba post-hoc Dunnet ($p < 0.001$).

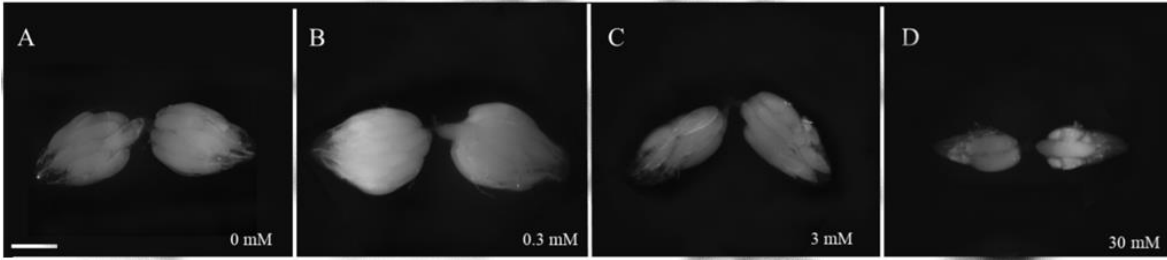
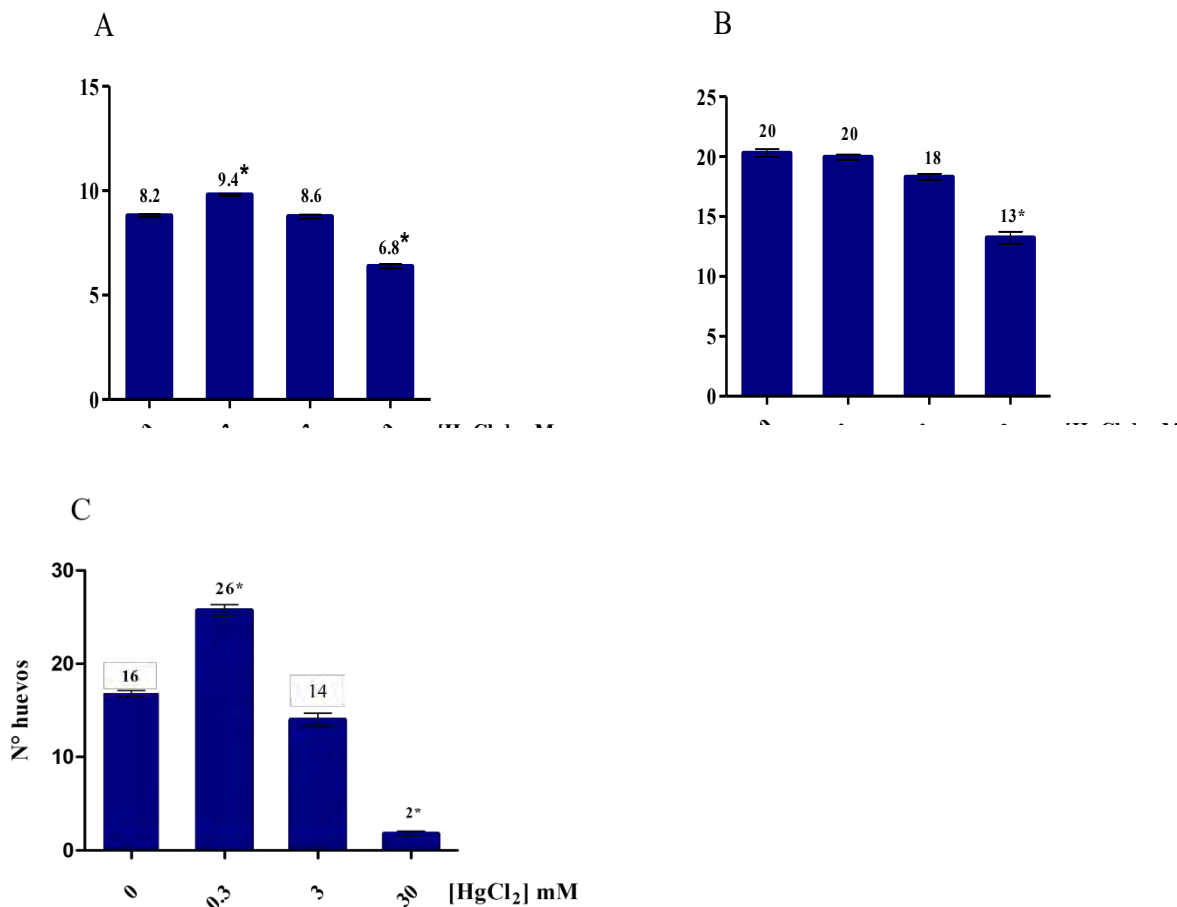


Imagen 15. Morfología de ovarios de hembras de la cepa transgénica *Fz3-RFP*. (A). Ovarios del grupo testigo. (B). Ovarios con incremento significativo del tamaño y huevos. (C). Ovarios alargados sin cambios en el tamaño. (D). Ovarios con disminución significativa del tamaño y huevos de después de 72 h de exposición a 30 mM de HgCl_2 y 72 h de recuperación. Escala 10 mm



Grafica 2. (A). Promedios del tamaño de los ovarios. (B). Número de ovariolas. (C). Número de huevos de la cepa transgénica *Fz3-RFP* expuesta a 0, 0.3, 3, y 30 mM de HgCl_2 , por 72 horas y con 72 horas de recuperación. * diferencia significativa con respecto al testigo negativo (0 mM de HgCl_2) ($p < 0.001$).

7.3 Morfometría de ovarios de *Drosophila melanogaster* de la cepa mutante *Chk1, 2; Fz3-RFP* expuestas y no expuestas a cloruro de mercurio (HgCl_2).

En estudios previos se evidenció que el HgCl₂ induce daño en el ADN y cambios morfológicos en el ovario de hembras silvestres Cantón bajo las mismas condiciones experimentales y con una respuesta dependiente de la concentración del metal. Con el fin de demostrar que el daño al ADN está implicado en los cambios morfológicos en los ovarios (Mojica-Vázquez et al., 2018), utilizamos hembras de *Drosophila melanogaster* de la cepa mutante *Chk1,2; Fz3-RFP* generada en el laboratorio.

Los resultados obtenidos en hembras mutantes, después de 72 h de exposición a 0.3 mM de HgCl₂ y 72 h de recuperación evidencian que el tamaño de los ovarios (Imagen 16 B) y el número de ovariolas no se modifican (Tabla 8, Gráfica 3 A, B), sin embargo, aumenta significativamente el número de huevos comparado con los valores del grupo testigo (0 mM) (p<0.001) (Tabla 8, Gráfica 3 C). Con 3 mM de HgCl₂, el tamaño de los ovarios (Imagen 16 C), el número de ovariolas y huevos no se altera contrastado con el grupo testigo (p<0.001) (Tabla 8, Gráfica 3 A, B, C). A 30 mM de HgCl₂ no se modifica el tamaño de los ovarios y el número de huevos (Imagen 16 D) (Tabla 8, Gráfica 3 A, B), no obstante, el número de ovariolas se reducen significativamente contrastados con los valores del grupo testigo (Tabla 8, Gráfica 3 C) (p<0.001).

Tabla 8. Promedios del tamaño de los ovarios, número de ovariolas y huevos de hembras de la cepa mutante (*Chk1,2; Fz3-RFP*) después de 72 h de exposición a 0, 0.3, 3, y 30 mM de HgCl₂ y 72 h de recuperación.

<i>Chk1,2; Fz3-RFP</i>	Tamaño (mm) ^a			N. Ovariolas ^a			N. Huevos ^a		
	\bar{X}	±	EE	\bar{X}	±	EE	\bar{X}	±	EE
[HgCl ₂] mM									
0	8.5	±	0.43	20	±	1.57	16	±	1.89
0.3	8.7	±	0.63	19	±	1.35	21*	±	2.16
3	8.7	±	0.47	17	±	1.86	19	±	2.72
30	8.2	±	0.65	16*	±	2.50	14	±	1.80

^a Promedios de 3 experimentos independientes n=10

* Diferencia significativa con respecto al grupo testigo negativo (0 mM de HgCl₂), análisis de varianza (ANOVA) prueba post-hoc Dunnett (p<0.001).

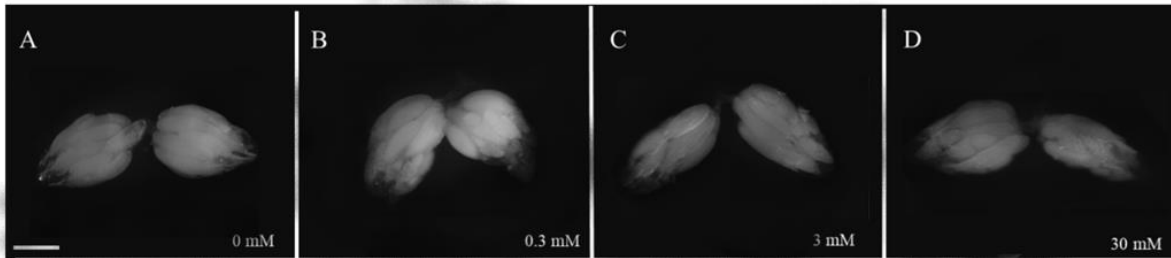
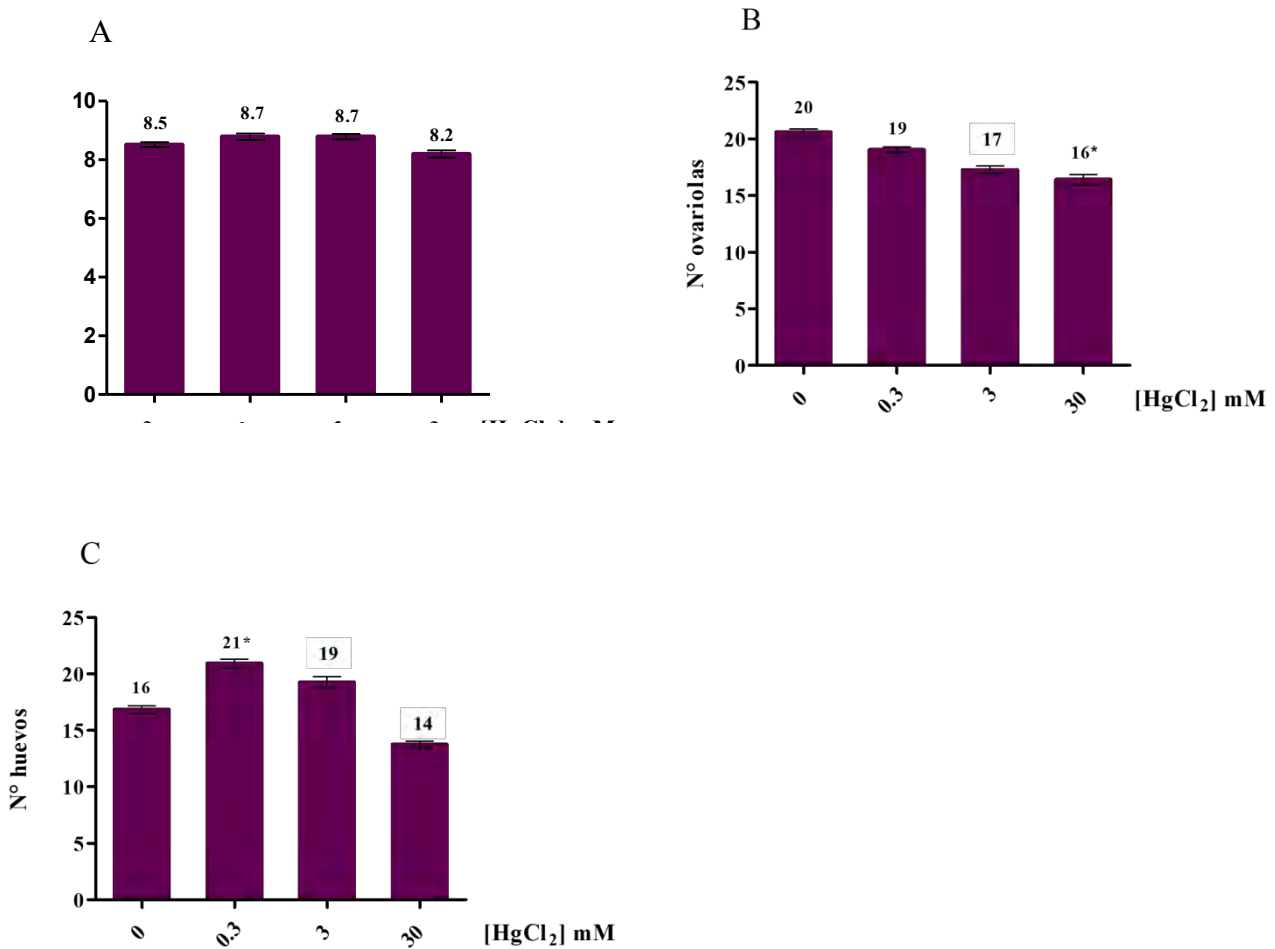


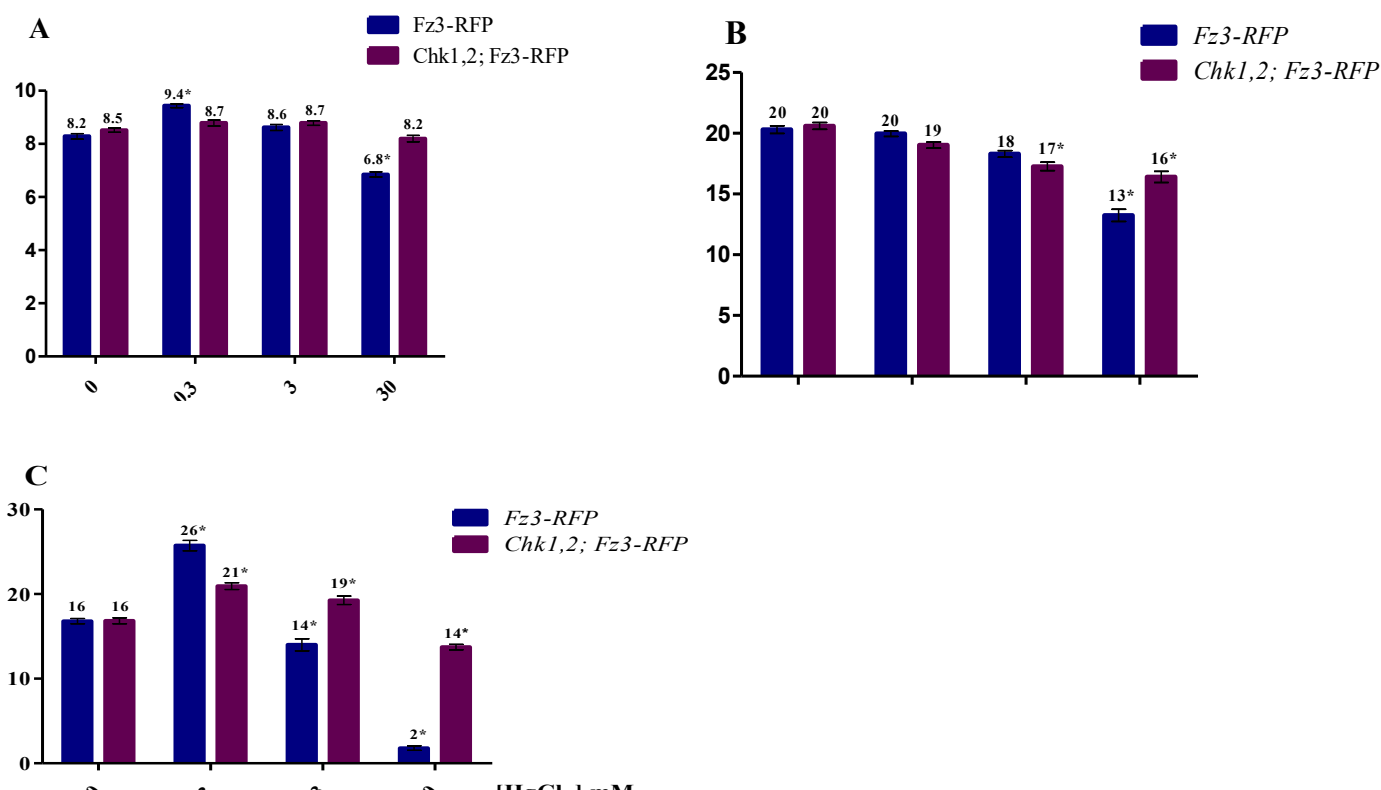
Imagen 16. Morfología de ovarios de hembras de la cepa mutante *Chkl,2; Fz3-RFP*. (A). Ovarios del grupo testigo (B, C, D). Ovarios con tamaño normal y forma irregular expuestos a HgCl_2 . Escala 10 mm.



Grafica 3. (A). Promedios del tamaño de los ovarios. (B). Número de ovariolas. (C). Número de huevos de hembras de la cepa mutante *Chkl,2; Fz3-RFP* expuestas a 0, 0.3, 3, y 30 mM de HgCl_2 , por 72 horas y con 72 horas de recuperación. * diferencia significativa con respecto al testigo (0 mM) ($p < 0.001$).

7.4 Comparación de la morfometría de ovarios de hembras de las cepa transgénica *Fz3-RFP* y mutante *Chk1,2; Fz3-RFP* expuestos y no expuestos a cloruro de mercurio (HgCl_2).

La comparación de los resultados morfométricos obtenidos de las hembras de la cepa mutante (*Chk1,2; Fz3-RFP*) evidencian recuperación en el tamaño de los ovarios de los grupos experimentales expuestos a 0.3 y 30 mM de HgCl_2 , comparados con los grupos experimentales de la cepa transgénica (*Fz3-RFP*) expuestos a 0.3 y 30 mM de HgCl_2 ($p < 0.001$) (Gráfica 4 A). A 30 mM de HgCl_2 el número de ovriolas de las hembras mutantes aumenta significativamente comparados con la cepa transgénica ($p < 0.001$) (Gráfica 4 B). Finalmente, a 0.3, y 30 mM de HgCl_2 se observan diferencias significativas en el número de huevos de hembras mutantes comparados con hembras transgénicas ($p < 0.001$) (Gráfica 4 C).



Gráfica 4. Promedios del tamaño de los ovarios (A). Número de ovriolas (B). Número de huevos (C) de la cepa mutante *Chk1,2; Fz3-RFP* comparada con la cepa transgénica *Fz3-RFP* expuestas a 0, 0.3, 3, y 30 mM de HgCl_2 , por 72 h y 72 h de recuperación. * diferencia significativa entre cada grupo experimental ($p < 0.001$).

7.5 Promedios de estadios de ovogénesis en las ovariolas de hembras de la cepa transgénica *Fz3-RFP*.

Con el objetivo de evidenciar que el proceso de la ovogénesis es afectado por la exposición a HgCl_2 , se cuantificó el último estadio de la ovogénesis presente en cada ovariola, se analizaron 100 ovariolas de cada grupo experimental (0, 0.3, 3, 30 mM de HgCl_2). Los resultados muestran que a 3 mM de HgCl_2 la frecuencia promedio de los estadios 8 (15/100) y 9 (18/100) aumenta significativamente comparada con el grupo testigo (0 mM de HgCl_2), respectivamente 8 (2/100) y 9 (9/100) ($p < 0.001$). Pero, el estadio 10a disminuye significativamente (13/100) comparado con el grupo testigo (2/100) ($p < 0.001$) (Tabla 9, Gráfica 5). A 30 mM de HgCl_2 incrementa significativamente los estadios 6 (22/100), 7 (32/100) y 8 (29/100) con respecto al grupo testigo [6 (0/100), 7 (0/100) 8 (2/100)] ($p < 0.001$). Sin embargo, los estadios 10a (4/100), 10b (1/100) y 11 (1/100) disminuyeron significativamente con relación al grupo testigo [10a (33/100), 10b (29/100) y 11 (27/100)] ($p < 0.001$). A 0.3 mM de HgCl_2 no se observaron cambios significativos en la frecuencia promedio de los estadios de ovogénesis (Tabla 9, Gráfica 5).

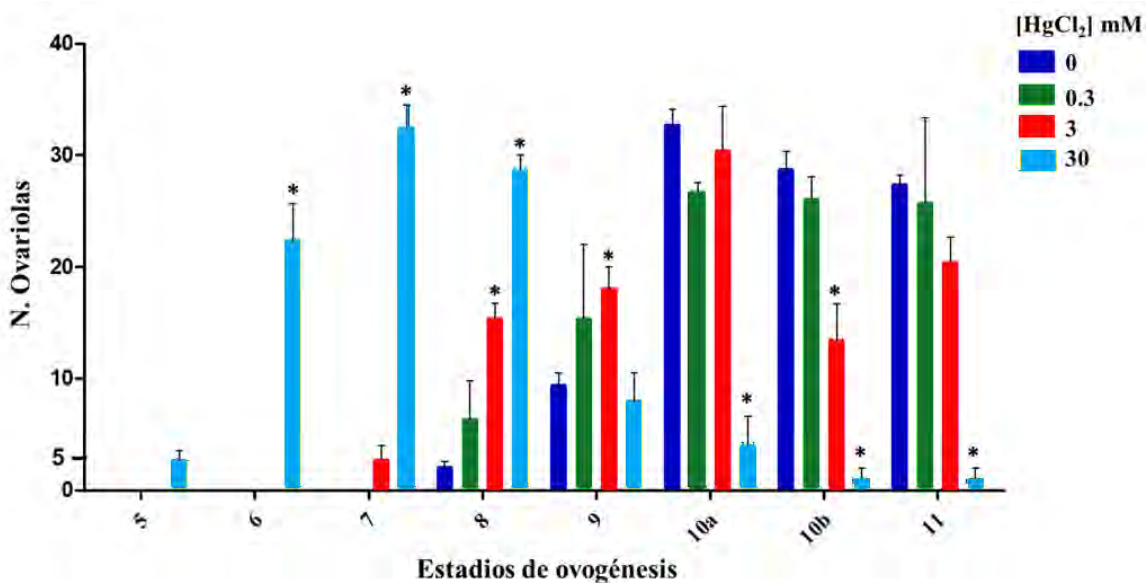
Tabla 9. Promedio de estadios de ovogénesis en las ovariolas de hembras transgénicas *Fz3-RFP* después de 72 h de exposición a 0, 0.3, 3 y 30 mM de HgCl_2 y 72 h de recuperación.

Cepa	<i>Fz3-RFP</i>								
	Estadio de ovogénesis ^a	5	6	7	8	9	10a	10b	11
N. Ovariolas ^b	$\bar{X} \pm \text{EE}$	$\bar{X} \pm \text{EE}$	$\bar{X} \pm \text{EE}$	$\bar{X} \pm \text{EE}$	$\bar{X} \pm \text{EE}$	$\bar{X} \pm \text{EE}$	$\bar{X} \pm \text{EE}$	$\bar{X} \pm \text{EE}$	$\bar{X} \pm \text{EE}$
[HgCl_2] mM									
0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	2 ± 1	9 ± 2.1	33 ± 2.5	29 ± 2.9	27 ± 1.5	
0.3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	6 ± 6	15 ± 12	27 ± 1.5	26 ± 3.6	26 ± 13	
3	0 ± 0	0 ± 0	3 ± 2.3	15* ± 2.5	18* ± 3.5	30 ± 6.6	13* ± 5.9	20 ± 4	
30	3 ± 2	22* ± 6	32* ± 3.8	29* ± 2	8 ± 4.4	4* ± 4.6	1* ± 1.7	1* ± 1.7	

^a Promedios de 3 experimentos independientes n=100

^b Número de ovariolas que presentan cada estadio de ovogénesis

*Diferencias significativas con respecto al grupo testigo negativo (0 mM de HgCl_2) análisis de varianza (ANOVA) prueba post-hoc Dunnett ($p < 0.001$).



Grafica 5. Promedios de estadios de ovogénesis en ovariolas de hembras transgénica *Fz3-RFP* después de 72 h de exposición a 0, 0.3, 3, 30 mM de $HgCl_2$, y con 72 horas de recuperación. * diferencia significativa con respecto al testigo (0 mM) ($p < 0.001$).

7.6 Promedios de estadios de ovogénesis en las ovariolas de hembras de la cepa mutante *Chk1,2; Fz3-RFP*.

El análisis de los estadios de ovogénesis en 100 ovariolas de hembras mutantes después de 72 h de exposición con 0, 0.3, 3 y 30 mM de $HgCl_2$, y 72 h de recuperación. Evidencian que a 0.3 y 3 mM de $HgCl_2$ la frecuencia en los estadios de la ovogénesis no presentan diferencias significativas con el grupo testigo (Tabla 10, Grafica 6 A, B), sin embargo, a 30 mM de $HgCl_2$ se incrementaron significativamente los estadios 8 (16/100) y 9 (27/100) con relación al grupo testigo [estadio 8 (5/100) y 9 (13/100)], y disminuyeron significativamente los estadios 10b (12/100) y 11 (5/100) con respecto al grupo testigo [10b (30/100) y 11 (25/100)] ($p < 0.001$) (Tabla 10, Gráfica 6 C).

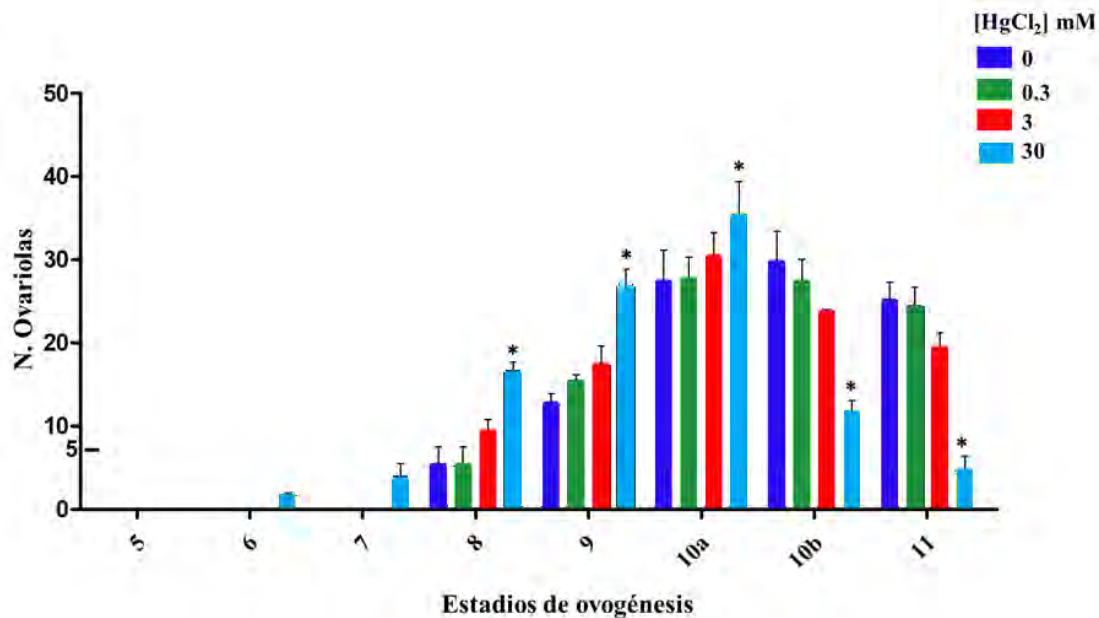
Tabla 10. Promedio de estadios de ovogénesis en las ovariolas de hembras de la cepa mutante *Chk1,2; Fz3-RFP* después de 72 h de exposición a 0, 0.3, 3 y 30 mM de HgCl₂ y 72 h de recuperación.

Cepa	<i>Chk 1,2; Fz3-RFP</i>							
Estadio de ovogénesis ^a	5	6	7	8	9	10a	10b	11
N. Ovariolas ^b	$\bar{X} \pm EE$	$\bar{X} \pm EE$	$\bar{X} \pm EE$	$\bar{X} \pm EE$	$\bar{X} \pm EE$	$\bar{X} \pm EE$	$\bar{X} \pm EE$	$\bar{X} \pm EE$
[HgCl ₂] mM								
0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	5 ± 3.8	13 ± 2.1	27 ± 6.7	30 ± 6.4	25 ± 4
0.3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	5 ± 3.8	15 ± 1.5	28 ± 4.5	27 ± 4.7	24 ± 4.2
3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	9 ± 2.5	17 ± 4	30 ± 5	24 ± 0.6	19 ± 3.2
30	0 ± 0	2 ± 0.6	4 ± 3.2	16* ± 2.3	27* ± 3.8	35* ± 7	12* ± 2.5	5* ± 3.1

^a Promedios de 3 experimentos independientes n=100

^b Número de ovariolas que presentan cada estadio de ovogénesis

*Diferencias significativas con respecto al grupo testigo negativo (0 mM de HgCl₂) análisis de varianza (ANOVA) y una prueba post-hoc Dunnet (p<0.001).



Grafica 6. Promedios de estadios de ovogénesis en ovariolas de hembras de la cepa mutante *Chk1,2; Fz3-RFP* después de 72 h de exposición a 0, 0.3, 3, 30 mM de HgCl₂ y con 72 h de recuperación. * diferencia significativa con respecto al testigo (0 mM) (p<0.001).

7.7 Tasa de fertilidad en hembras de de la cepa transgénica *Fz3-RFP*

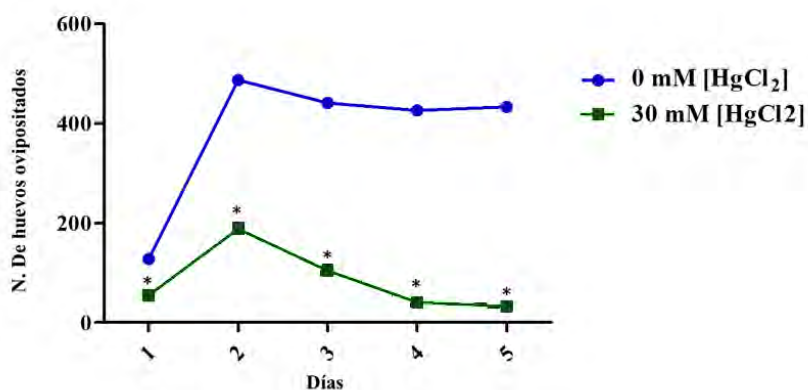
En hembras transgénicas *Fz3-RFP* después de 72 horas de exposición a 30 mM de HgCl₂ y con 72 horas de recuperación, apareadas durante 5 días con machos *Fz3-RFP* no expuestos a HgCl₂, muestran reducción significativa en el número de huevos ovipositados por día durante 5 días comparados con el grupo testigo (0 mM de HgCl₂) (p<0.001) (Tabla 11, Gráfica 12).

Tabla 11. Promedios de la tasa de fertilidad (número de huevos ovipositados por día durante 5 días), de hembras de la cepa transgénica *Fz3-RFP* después de 72 h de exposición a 0 y 30 mM de HgCl₂ y 72 h de recuperación.

Tasa de fertilidad															
Cepa	Dia 1			Dia 2			Dia 3			Dia 4			Dia 5		
<i>Fz3-RFP</i> ^a	\bar{X}	±	EE	\bar{X}	±	EE	\bar{X}	±	EE	\bar{X}	±	EE	\bar{X}	±	EE
[HgCl ₂] mM															
0	128	±	7.77	487	±	4.24	411	±	5.65	426	±	4.24	433	±	2.82
30	54*	±	4.94	188*	±	2.82	140*	±	1.41	40*	±	4.95	33*	±	0.71

^a Promedios de 3 experimentos independientes n=30

* Diferencia significativa con respecto al grupo testigo negativo (0 mM de HgCl₂) análisis de varianza (ANOVA) prueba post-hoc Dunnett (p<0.001).



Gráfica 7. Promedios de la tasa de fertilidad (número de huevos ovipositados por día, durante 5 días), de hembras de *D. melanogaster Fz3-RFP* expuestas a 0, 30 mM de HgCl₂, por 72 horas y con 72 horas de recuperación. * diferencia significativa con respecto al testigo (0 mM) (p<0.001).

7.8 Tasa de fertilidad de hembras de la cepa mutante *Chk1,2; Fz3-RFP*

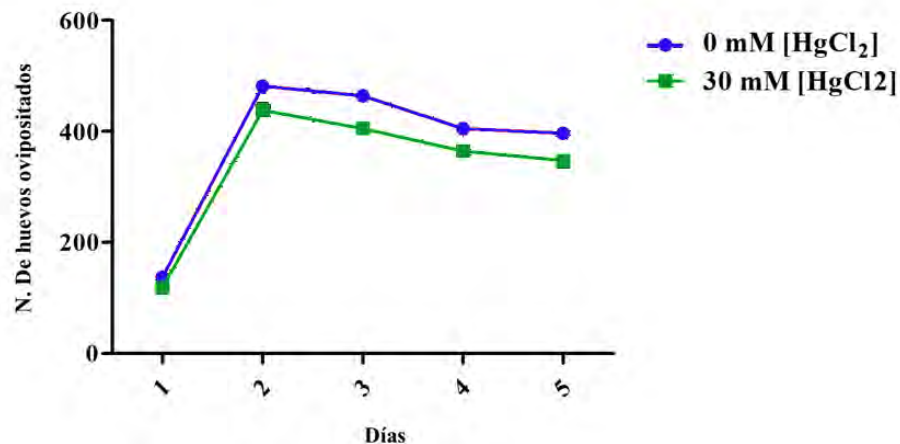
En hembras mutantes (*Chk1,2; Fz3-RFP*), después de 72 h de exposición a 30 mM de HgCl₂ y 72 h de recuperación, apareadas durante 5 días con machos mutantes *Chk1,2; Fz3-RFP* no expuestos a HgCl₂, no presentan cambios significativos en el número de huevos ovipositados por día durante 5 días comparados con el grupo testigo (0 mM de HgCl₂) (p<0.001) (Tabla 12, Gráfica 8).

Tabla 12. Promedios de la tasa de fertilidad (número de huevos ovipositados por día durante 5 días), de hembras de la cepa mutante *Chk1,2; Fz3-RFP* después de 72 h de exposición a 0 y 30 mM de HgCl₂ y con 72 h de recuperación.

Tasa de fertilidad															
Cepa	Dia 1			Dia 2			Dia 3			Dia 4			Dia 5		
<i>Chk1,2; Fz3-RFP</i> ^a	\bar{X}	±	EE	\bar{X}	±	EE	\bar{X}	±	EE	\bar{X}	±	EE	\bar{X}	±	EE
[HgCl ₂] mM															
0	137	±	4.94	481	±	3.53	464	±	7.07	405	±	5.65	397	±	4.94
30	119	±	2.82	438	±	2.82	405	±	2.82	364	±	3.53	347	±	6.36

^a Promedios de 3 experimentos independientes n=30

*Diferencia significativa con respecto al grupo testigo negativo (0 mM de HgCl₂) análisis de varianza (ANOVA) prueba post-hoc Dunnet (p<0.001).



Gráfica 8. Promedios de la tasa de fertilidad (número de huevos ovipositados por día, durante 5 días), de la cepa *Chk1,2; Fz3-RFP* expuestas a 0 y 30 mM de HgCl₂, por 72 h y 72 h de recuperación (p<0.001).

7.9 Tasa de eclosión de huevos de ensayos de fertilidad de *Fz3-RFP* y *Chk1,2-Fz3-RFP* expuestas y no expuestas a cloruro de mercurio.

Con el objetivo de determinar la tasa de eclosión y sobrevivencia de los huevos ovipositados en el ensayo de fertilidad por las hembras de las cepa trasngénica *Fz3-RFP* y mutante *Chk1,2; Fz3-RFP* expuestas a 0 y 30 mM de HgCl₂, se cuantificó la tasa de eclosión de 100 huevos.

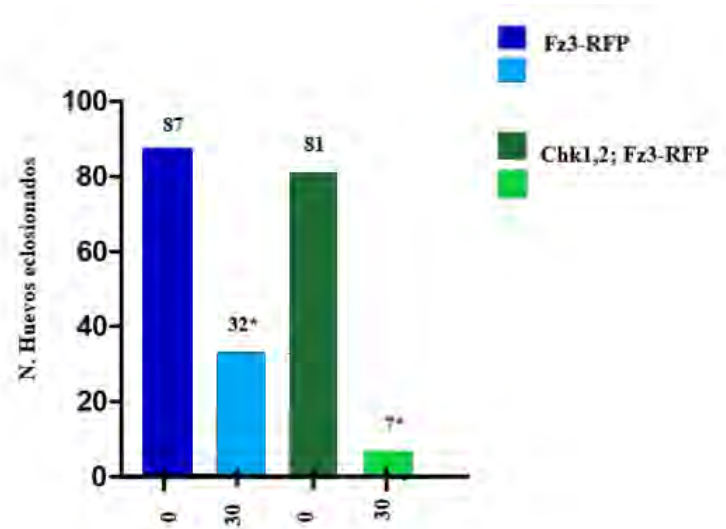
Los resultados evidenciaron reducción significativa en la tasa de eclosión de huevos ovipositados por hembras transgénicas y mutantes expuestas 30 mM de HgCl₂ contrastados con sus respectivos grupos testigo (0 mM de HgCl₂) (p<0.001). Sin embargo, el número de huevos que eclosionaron fue mayor en el cepa trasngénica comparada con la cepa mutante (Tabla 13, Gráfica 9). Los huevos que eclosionaron de la cepa trasngénica y mutante expuestas a 30 mM de HgCl₂, sobrevivieron hasta el primer y segundo instar de larva las cuales no presentaron movimiento, comparados con los huevos eclosionados por los grupos testigos que sobrevivieron hasta la etapa adulta y presentaron locomoción normal en ambas cepas.

Tabla 13. Promedios de la tasa de eclosión de huevos ovipositados por hembras de la cepa trasgénica *Fz3-RFP* y mutante *Chk1,2-Fz3-RFP* expuestas a 0 y 30 mM de $HgCl_2$ por 72 h y 72 h de recuperación.

Cepa	^a Fz3-RFP			^a Chk1,2; Fz3-RFP		
	[HgCl ₂] mM	\bar{X}	E. E	\bar{X}	E. E	E. E
0	87	±	1.54	81	±	2.51
30	32*	±	2.51	7*	±	2

^a Promedios de 3 experimentos independientes n=300

* Diferencia significativa con respecto al grupo testigo negativo (0 mM de $HgCl_2$) análisis de varianza (ANOVA) prueba post-hoc Dunnet (p<0.001).



Gráfica 9. Promedio de la tasa de eclosión de huevos ovipositados por hembras de la cepa trasgénica *Fz3-RFP* y mutante *Chk1,2-Fz3-RFP* después de 72 h de exposición a 0 y 30 mM de $HgCl_2$ y 72 h de recuperación. * diferencia significativa con respecto al testigo (0 mM) (p<0.001).

7.10 Organización celular del germario en ovariolas de hembras transgénicas Fz3-RFP expuestas y no expuestas HgCl₂ mediante microscopia de fluorescencia confocal

Con el objetivo de determinar si el HgCl₂ altera la expresión del receptor Fz3 de la vía canónica Wnt se analizó el germario de hembras de la cepa *Fz3-RFP* expuestas y no expuestas a HgCl₂, mediante de microscopia confocal.

En las imágenes del germario correspondientes a 0.3 y mM de HgCl₂ (Figura 17 G-J), se detectó incremento de células madre foliculares y sobreexpresión del receptor Fz3 en la región 2a (flechas amarillas) (G), modificación en la estructura de los quistes germinales (línea punteada amarillas) (H) y aumento del número de núcleos en las regiones 1 y 2a (I), comparado con las imágenes del germario del grupo testigo (Figura 17 C-F). En 3 mM de HgCl₂ (Figura 17 K-N). También se identificó sobreexpresión de Fz3 en la región 2a además alteraciones en la estructura celular de las células madre acompañantes y foliculares (flechas amarillas) (K), sin embargo, se observó disminución del número de quistes germinales (línea punteada amarilla) (L), de núcleos celulares y de células en la región 2a (flecha amarilla) (M) comparado con las imágenes del grupo testigo (Figura 17 C-F).

A 30 mM de HgCl₂ (Figura 17 Ñ-Q), no se observa alteración de la expresión de Fz3 (flechas amarillas) (Ñ), la estructura de los quistes germinales se encuentra alterada en todas las regiones (línea punteada amarilla) (O), además se observa disminución del de núcleos celulares (P) y del tamaño del germario, comparado con el germario del grupo testigo (Figura 17 C-F).

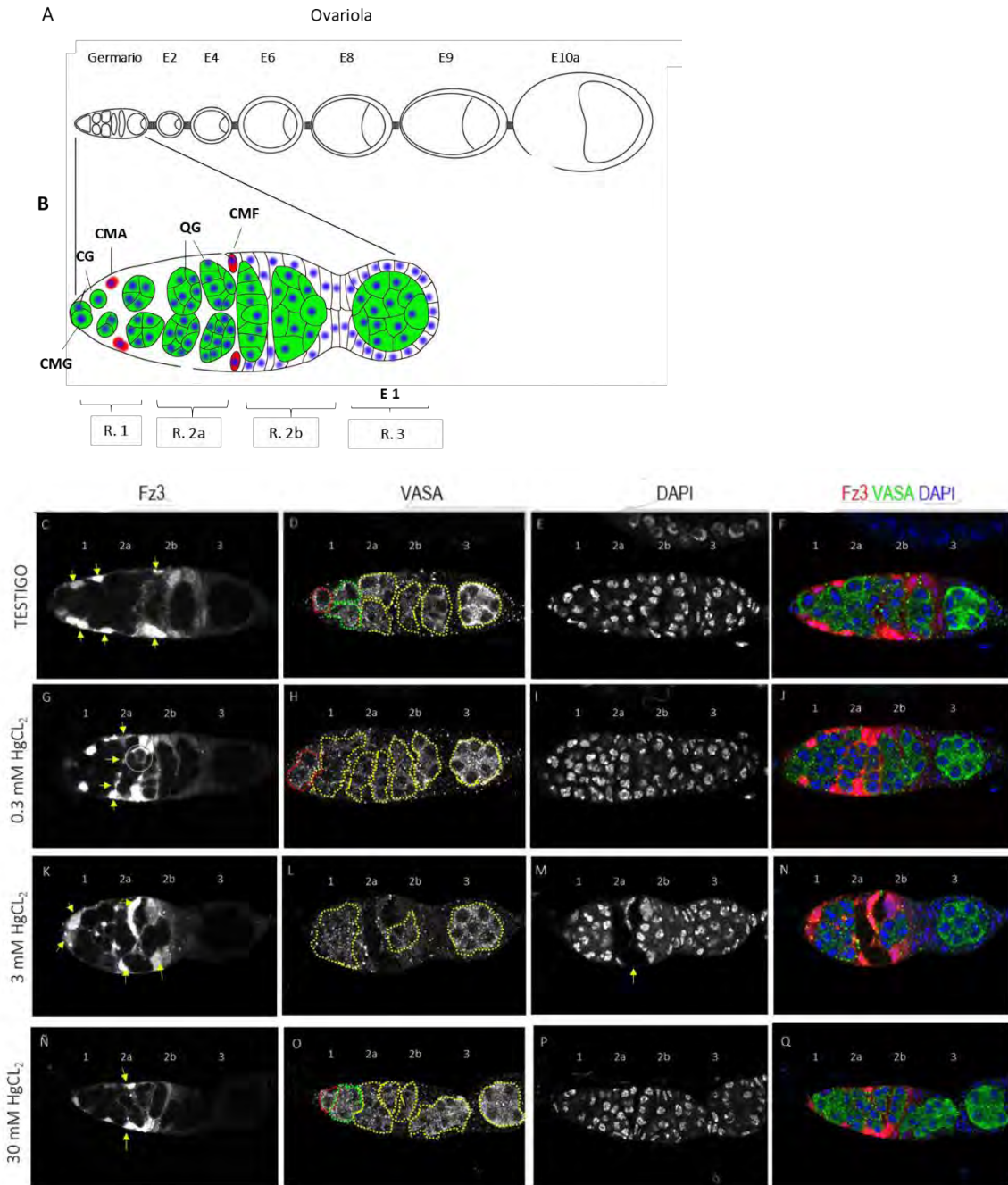


Figura 17. **A.** Imagen esquemática de una ovariola de *Drosophila melanogaster*. **B.** Amplificación del germario de una ovariola. Región 1; lugar de residencia de las células madre germinales (CGM), células germinales (CG) y células madre acompañantes (CMA). Región 2a; quistes germinales en desarrollo (QG). En el borde entre la región 2a y región 2b se ubican las células madre foliculares (CMF) y quistes germinales en desarrollo. Región 3; células foliculares y primer cámara ovárica (E1). **C-P.** Imágenes del germario de la cepa transgénica *Fz3-RFP* después de tres días de exposición a 0, 0.3, 3 y 30 mM de HgCl₂, tomadas mediante microscopía confocal. Fz3 marcando CMF y CMA en rojo, Vasa marcando a todas las células del linaje germinal CMG y QG en verde y DAPI marcando los núcleos celulares en azul, objetivo 63X, escala 10 μM.

7.11 Organización celular del germario en ovariolas de hembras transgénicas *Bam-GFP*, *Fz3-RFP* expuestas y no expuestas HgCl_2 mediante microscopia de fluorescencia confocal

Para determinar si el HgCl_2 altera la diferenciación de las células germinales y visualizar alteraciones en la vía Wnt. Se analizó el germario de hembras de la cepa transgénica *Bam-GFP*, *Fz3-RFP* expuestas y no expuestas a HgCl_2 , mediante de microscopia confocal.

Los resultados obtenidos en 0.3 mM de HgCl_2 (Figura 18 G-K), evidencian sobreexpresión de Fz3 en la región 2a (G), de Bam en las regiones 1, 2b y 3 (H) y de Fascilin III en la región 2a (I) (flechas amarillas), así como incremento en el número de quistes germinales (H) y de núcleos celulares (J) y alteraciones en la estructura de las células foliculares (I) comparadas con las imágenes del germario del grupo testigo (Figura 18 B-F).

A 3 mM de HgCl_2 (Figura L-O). Se observó en la región 2a sobreexpresión de Fz3 (L) y de Bam en las regiones 2a y 2b, la estructura y posición de los quistes se encuentra modificada en las regiones 2a y 2b (M), así como de las células foliculares en la región 2b (N) e incremento de células germinales en las regiones 2a y 2b (M y Ñ) contrastadas con las imágenes del grupo testigo (Figura 18 B-F).

En 30 mM de HgCl_2 Figura 18 P-T. La expresión de Fz3 no presenta diferencia con respecto al grupo testigo (Figura 18 B). Sin embargo, detecto sobreexpresión de Bam en las regiones 1, 2a y 2b, alteraciones en la forma y estructura de los quistes germinales y de las células foliculares, y disminución del número de celular y tamaño del germario con relación a las imágenes del grupo testigo (Figura 18 B-F).

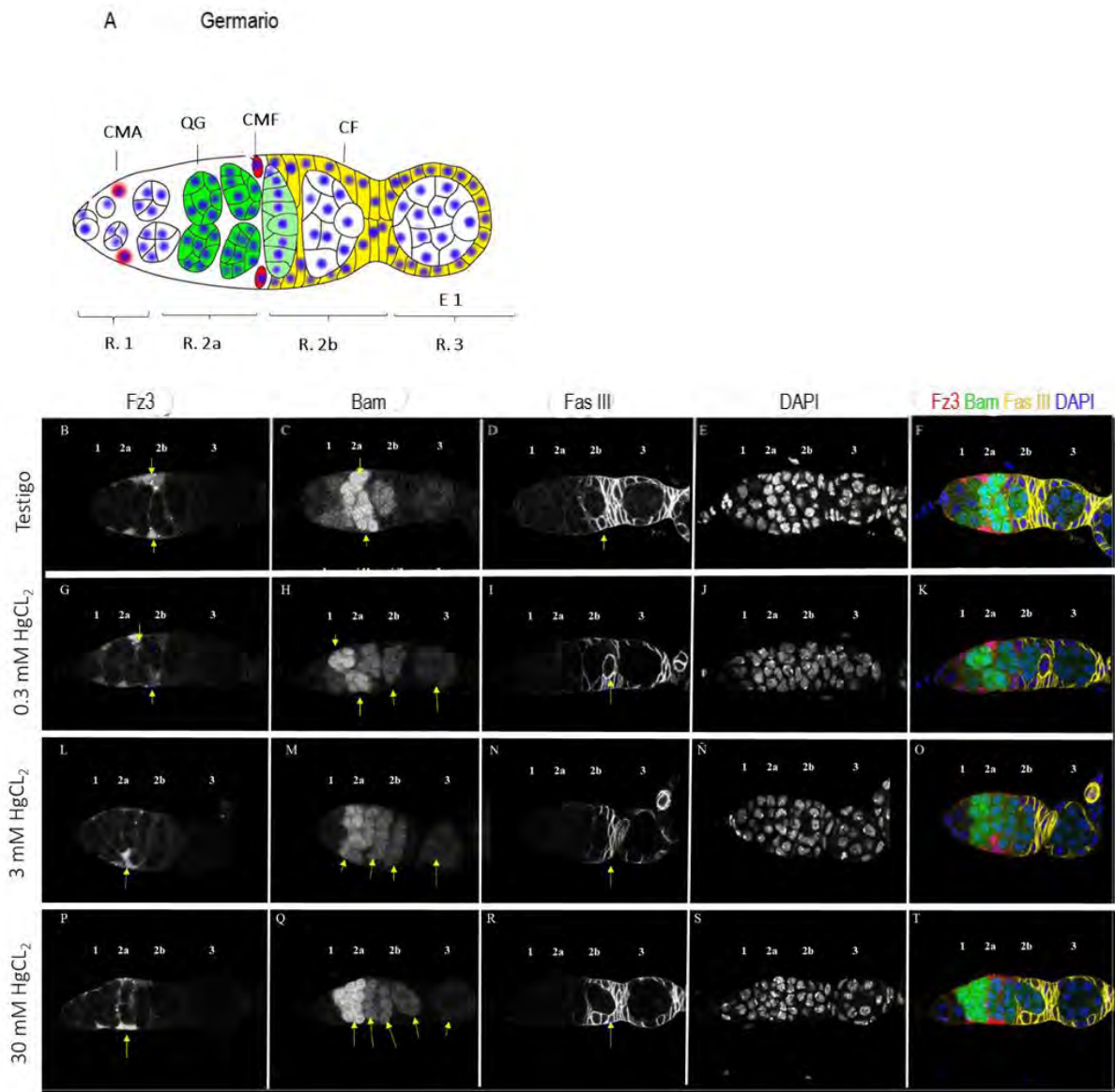


Figura 18. A. Imagen esquemática del germario de *Drosophila melanogaster*. Células madre acompañantes (CMA), quistes germinales (QG), células madre foliculares (CMF) y células foliculares (CF). **B-T.** Imágenes del germario de la cepa transgénica *Bam-GFP*, *Fz3-RFP* después de tres días de exposición a 0, 0.3, 3 y 30 mM de HgCl₂, tomadas mediante microscopia confocal. Fz3 marcando CMF y CMA en rojo, Bam marcando a las células germinales en diferencian en verde, Fasielin III marcando a las CF en amarillo y DAPI marcando los núcleos celulares en azul, objetivo 63X, escala 10 µM

7.12 Organización celular del germario en ovariolas de hembras mutantes *Chk1,2; Fz3-RFP* expuestas y no expuestas a HgCl_2 mediante microscopia de fluorescencia confocal

Para establecer si el daño al ADN está involucrado en los efectos a nivel celular observados en el germario de ovarios expuestos a HgCl_2 . Se analizó el germario de hembras de la cepa mutante *Chk1,2; Fz3-RFP* expuestos y no expuestos a HgCl_2 , mediante microscopia confocal.

El análisis de las imágenes de germario correspondientes a 0.3, 3, 30 mM de HgCl_2 (Figura 19 F-P), no se identificaron cambios en la morfología y número de células foliculares y germinales comparadas con las imágenes del grupo testigo (Figura 19 B-E). No obstante, se observó sobreexpresión de Fz3 en la región 2a (Figura 19 imágenes F y J flechas amarillas, N recuadro amarillo).

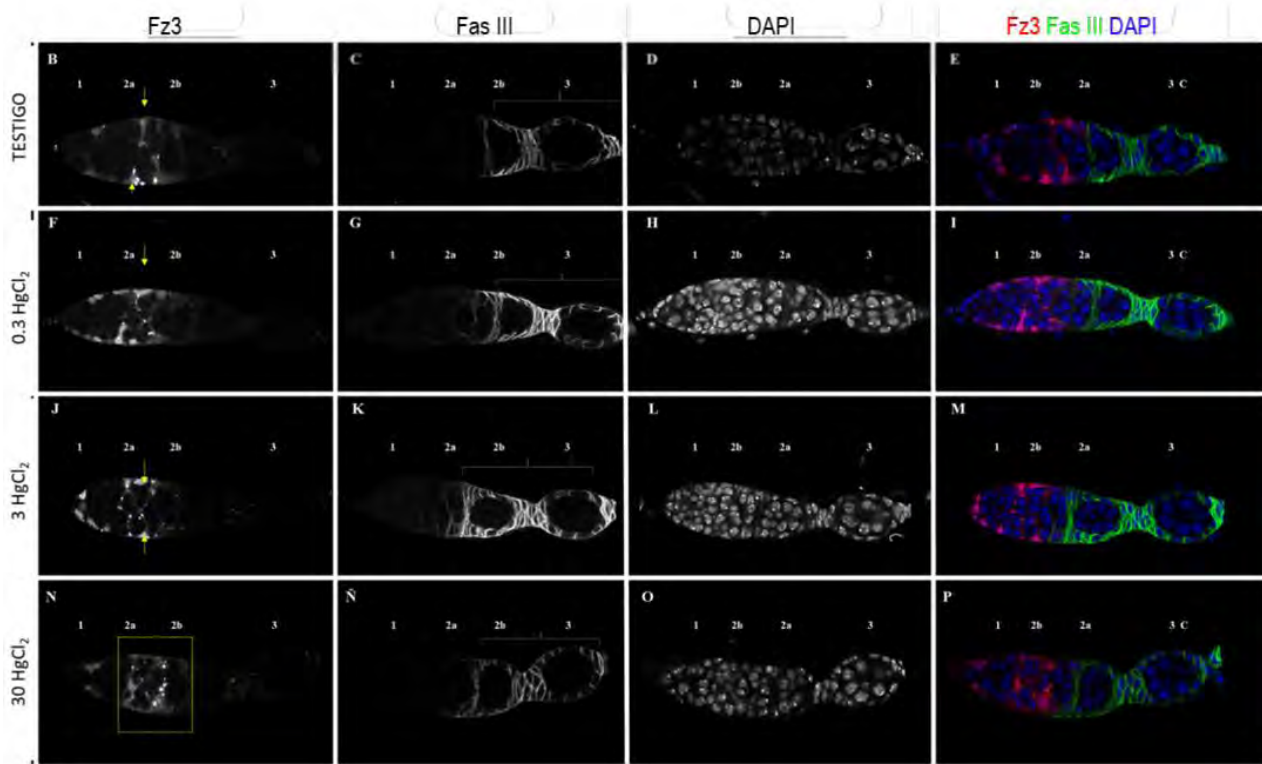
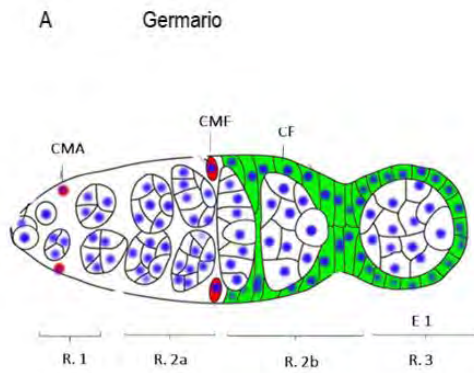


Figura 19. A. Imagen esquemática del germario de *Drosophila melanogaster*. Células madre acompañantes (CMA), células madre foliculares (CMF) y células foliculares (CF). **B-P.** Imágenes del germario de la cepa mutante *Chk1,2; Fz3-RFP* después de tres días de exposición a 0, 0.3, 3 y 30 mM de HgCl₂, tomadas mediante microscopia confocal. Fz3 marcando CMF y CMA en rojo, Fasielin III marcando a las CF en verde y DAPI marcando los núcleos celulares en azul, objetivo 63X, escala 10 μM

VIII DISCUSIÓN

La contaminación por mercurio representa una gran amenaza para la salud humana, ya que es un metal pesado que se incorpora fácilmente al ciclo del agua y a la cadena alimentaria a través de la bioacumulación en los organismos. Diversos estudios han evidenciado que este metal afecta el sistema reproductor, los niveles hormonales y la fertilidad de los organismos, incluyendo los seres humanos. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales altera la función reproductora son poco conocidos. En un estudio previo, se demostró que el cloruro de mercurio (HgCl_2) induce cambios morfológicos, estructurales y daño al ADN en las células del ovario de *Drosophila melanogaster* silvestre (Cantón) expuestas a 24, 48 y 72 h a 0.3, 3 y 30 mM de HgCl_2 y con 24 h y 72 h de recuperación (Mojica et al., 2017).

Con el fin de elucidar algunos mecanismos moleculares que intervienen en la reprotoxicidad del mercurio. Este trabajo fue diseñado para analizar los efectos del mercurio en la vía de señalización Wnt en ovarios de *Drosophila melanogaster* transgénica *Fz3-RFP* y silvestre, y su asociación con los cambios en la morfología, estructura y la fertilidad, después de 72 h de exposición a concentraciones de 0.3, 3 y 30 mM de HgCl_2 y con 72 h de recuperación. Así como, el papel del daño en el ADN con la cepa mutante de *D. melanogaster Chk1,2; Fz3-RFP*.

Los resultados obtenidos de este trabajo evidencian que la exposición de 0.3 HgCl_2 aumenta significativamente la expresión de la vía Wnt, el tamaño de los ovarios (hipertrofia) y el número de huevos con relación al grupo testigo. El análisis estructural con inmunofluorescencia en microscopia confocal del germario del ovario de *Drosophila melanogaster* transgénica *Fz3-RFP*, con los marcadores Fz3 en células madre foliculares, Bam para la diferenciación de células germinales, VASA en el linaje germinal, Fasiclin III en células foliculares y DAPI para visualizar el ADN en los núcleos, muestran alteraciones estructurales del germario, como aumento en el número de las células madre foliculares y en las células foliculares en la región 2a; células germinales y quistes en las regiones 2a y 2b germinales con incremento de número de células. Posiblemente, la activación de la vía de Wnt inhibió la vía BMP, que a su vez estimuló la sobreexpresión de Bam, lo cual indujo la proliferación de toda la estirpe germinal y el aumento en el desarrollo de quistes germinales (King, 2001). Es bien conocido que la sobreexpresión de los componentes de la vía Wnt

como *wg*, *fz2*, *dsh* y *armadillo* en los ovarios de *Drosophila melanogaster* mutantes, inducen la división y alteración de las células foliculares en las ovariolas, lo que sugiere para este estudio que la sobreexpresión de Wnt estimuló la proliferación excesiva y descontrolada de las células foliculares en el germario, lo que condujo a la hipertrofia de los ovarios y a la gran producción de huevos en la cepa transgénica *Fz3-RFP* de *D. melanogaster* (Forbes et al., 1996, King et al., 2001; Zhang y Kalderon, 2001).

La sobreexpresión de la vía Wnt en el germario de los ovarios expuestos a 0.3 mM de HgCl₂, en la cepa transgénica *Fz3-RFP*, fue confirmada con la sobreexpresión del receptor Fz3, el cual es blanco transcripcional de la vía Wnt lo cual demuestra su activación en este modelo *Drosophila* (Dann, 2001). Probablemente, el mercurio actúa como agonista del ligando *wg*, interaccionando con el sitio de unión y activación del receptor Fz3, que es un dominio rico en cisteína con grupos sulfhidrilos, en el cual el mercurio puede interaccionar y activar la vía de señalización Wnt (Wong, 2003). Evidenciado por el incremento en la diferenciación y proliferación células foliculares. Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con lo publicado en el pez gato (*Clarias geriepinus*), después de 15 días de exposición a 0.08 mg de HgCl₂, revelaron daño severo en el epitelio folicular que rodea a los ovocitos (Masarat, 2014). Altunkaynak (2016), publicó alteraciones histo-morfométricas de los ovarios de rata Wistar expuestos durante 45 días a 1 mg de HgO, con reducción en el número de folículos primordiales, primarios y de Graaf; y alteraciones en las células foliculares. Otro estudio realizado en neuronas *in vitro* de *Drosophila melanogaster* mostraron que el metilmercurio hiperactiva la vía Notch, la cual está implicada en la proliferación celular en sistema nervioso (Bland, 2006). Sin embargo, otras investigaciones reportan reducción de la expresión de la vía Wnt y de los genes GSK3 β , en células de riñón (HepG2) de pez cebra después de 7 días de exposición a 100 y 600 μ g/L de HgCl₂ (Choong, 2010).

En los ovarios de *Drosophila melanogaster* transgénica *Fz3-RFP*, después de 72 h de exposición a 3 mM de HgCl₂ y con 72 h de recuperación produjo también la sobreexpresión de Bam y de la vía de señalización Wnt. Sin embargo, no hubo modificaciones en el tamaño y número de ovariolas, no obstante, el número de huevos se redujo significativamente con relación al grupo testigo. El análisis estructural del germario del ovario expuesto a esta concentración, muestran alteraciones y reducción de las células madre foliculares y de las

células foliculares en la región 2a y 2b, así como incremento del número de quistes germinales con reducción celular y del estadio 11 de la ovogénesis. Probablemente, estos efectos observados son debido a la inducción de daño en el ADN en las células ováricas y a la sobreexpresión de Fz3 y Bam y también a la producción de especies reactivas de oxígeno aumentando el estrés oxidante que quizás incrementó la actividad de los mecanismos antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, y glutatión) y de la reparación al genoma lo que permitió que el mercurio no interfiriera con la división y diferenciación de las células germinales del germario y con el tamaño del ovario, evidenciado por la morfología y ovogénesis normal. Aun cuando se observó disminución de huevos y del estadio 11 de ovogénesis estos efectos no modificaron tamaño del ovario. Algunos estudios reportan que la función ovárica puede ser afectada por inducción de daño al ADN y a la carencia de reparación del daño (Hoyer, 2005; Choong, 2010).

En los ovarios de *Drosophila melanogaster* transgénica *Fz3-RFP*, después de 72 h de exposición a 30 mM de HgCl₂ y con 72 h de recuperación produjo también la sobreexpresión de la vía de señalización Wnt y de Bam en el germario. Además, se redujo el tamaño de los ovarios (hipotrofia), el número de ovariolas y de huevos con relación al grupo testigo. El análisis estructural del germario muestra alteraciones y descenso de las células madre foliculares y de las células foliculares en la región 2a y 2b, así como disminución del número de quistes germinales con menor número de células y de los estadios 10a 10b y 11 de la ovogénesis. Posiblemente, estos efectos observados son el resultado del daño severo del ADN en las células ováricas (Mojica et al., 2018), y a la incapacidad de los mecanismos de reparación del daño en el genoma que consecuentemente indujeron a la muerte celular, lo cual fue mostrado por la reducción celular en el germario y de los estadios 10a, 10b y 11 de la ovogénesis, que consecuentemente condujo a la reducción de huevos en las ovariolas y del tamaño de los ovarios. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Dey (1989), quien observó daño en el ADN de las células ováricas, alteraciones en la ovogénesis y disminución del peso de los ovarios en hembras de pez serpiente (*Lepidocephalichthys thermalis*).

Para confirmar si el daño al ADN interviene en la recuperación del fenotipo normal en los ovarios de *D. melanogaster Fz3-RFP* expuestas a 30 mM de HgCl₂ y si la proliferación de las células germinales en germario se inhibe o se bloquea, se expusieron hembras mutantes

Chk1,2; Fz3-RFP (generadas en el laboratorio) a 0, 0.3, 3 y 30 mM de HgCl₂ por 72 horas y con 72 horas de recuperación.

La respuesta al daño del ADN en ovarios de *Drosophila*, esta mediada principalmente por las cinasas Grp y Mnk, homólogas en mamíferos de Chk-1 y Chk-2 respectivamente, que se activan por la proteína ataxia-telangiectasia mutada (ATM) en respuesta a roturas de ADN de doble cadena y monocatenarias, respectivamente o por la inducción de estrés oxidante (Watters, 2003). Después de su activación por ATM, Chk-2 fosforila varias proteínas que detienen transitoriamente el ciclo celular e inhiben la replicación de ADN asegurando su reparación (Mannuss et al., 2012).

A 0.3 mM de HgCl₂ la sobreexpresión de la vía Wnt y de Bam es similar a la transgénica *Fz3-RFP*, además se incrementa significativamente el número de huevos comparados con su testigo (0 mM de HgCl₂ cepa *Chk1,2; Fz3-RFP*) y se altera la morfología de los ovarios. Estos efectos confirman el papel relevante de la vía de señalización Wnt en la proliferación y diferenciación de las células germinales y somáticas en el germario, así como en el desarrollo de las cámaras ováricas y a la producción de huevos en el ovario.

En 3 mM la sobreexpresión de la vía Wnt es similar a la transgénica *Fz3-RFP*, sin modificaciones estructurales en el germario, en el tamaño del ovario en el número de ovariolas y huevos, comparados con su grupo testigo. No obstante, la morfología de los ovarios fue afectada. Sin embargo, al no detectar daño al ADN por la ausencia de las cinasas 1 y 2 las células somáticas y germinales en el germario prosiguieron su proliferación y diferenciación con el daño acumulado quizás el mercurio altera otros mecanismos moleculares que intervienen para el remodelaje del ovario como las vías factor de crecimiento transformante, factor beta de crecimiento transformante el factor de crecimiento fibroblástico y el citoesqueleto celular (Their, 2003).

Con la concentración de 30 mM HgCl₂ hay sobreexpresión de la vía Wnt en el germario de los ovarios de *D. melanogaster Chk1,2; Fz3-RFP*, sin modificaciones estructurales en el

germario, en el tamaño del ovario en el número de huevos, sin embargo, el estadio de la ovogénesis 10b disminuyó más del 50 %, el 11 más del 75% y el 25% en el número de ovariolas comparados con el grupo testigo. Aun cuando la producción de huevos no se vio afectada, posiblemente el mercurio afectó la calidad de éstos, bloqueando la síntesis del vitelo y la transferencia del citoplasma de las células nodrizas al ovocito (Huelsmann et al., 2013). Estos resultados concuerdan con lo publicado por Masarat (2014), quien observó reducción de la diferenciación de los ovocitos pre vitelogénicos a vitelogénicos en hembras de pez gato (*Clarias geriepinus*), después de ser expuestas a 0.08 mg de HgCl₂ por 45 días.

Finalmente, en este estudio se analizó el efecto de 30 mM de HgCl₂ en la fertilidad de las hembras de la cepa transgénica *Fz3-RFP* y mutante *Chk1,2; Fz3-RFP* (apareadas con machos no expuestos al metal y de sus respectivas cepas), después de 72 h de exposición y con 72 h de recuperación, mediante la tasa de oviposición durante 5 días. En la cepa *Fz3-RFP* se observó disminución significativa del número de huevos ovipositados por día con relación al grupo testigo (0 mM de HgCl₂ *Fz3-RFP*). Contrariamente en lo encontrado en la cepa mutante en la cual no se presentaron diferencias significativas en la tasa de oviposición por día comparadas con su grupo testigo. La tasa de eclosión de los huevos de ambas cepas indica que el cloruro de mercurio afecta la viabilidad de los embriones, quizás por la poca acumulación de vitelo en el huevo y la falta de transferencia del citoplasma de las células nodrizas al ovocito, o por la acumulación de daño en el ADN que no permitió concluir el desarrollo normal del ovocito afectando la endoreplicación de las células nodrizas y foliculares y consecuentemente alterando la síntesis de proteínas que intervienen en la embriogénesis temprana (De Flora, 1994; Bahía, 1999; Amorim, 2000).

Además, se observó que del 100% de huevos procedentes de las hembras *Fz3-RFP* solamente el 32% y el 3% para la cepa mutante *Chk1,2; Fz3-RFP* eclosionaron y se desarrollaron hasta el primer y segundo instar de larva. Sin embargo, estas mostraron alteraciones en la locomoción con lo cual confirma que el cloruro de mercurio afecta el sistema nervioso central y periférico, así como inhibición e inactivación de las vías señalización neuromuscular para la locomoción (Wu, 1985; Bhardwaj, 2009).

IX CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

- a) A 0.3, 3 y 30 mM de HgCl₂ aumenta significativamente la expresión de la vía Wnt y de Bam en el germario de las cepas transgénica *Fz3-RFP* y mutante *Chk1,2: Fz3-RFP*.
- b) A 0.3 mM de HgCl₂ en las cepas transgénica *Fz3-RFP* y mutante *Chk1,2: Fz3-RFP*, induce hipertrofia de los ovarios, incremento de las células madre foliculares y foliculares en las región 2a y 2b del germario, y número de quistes germinales con aumento en el número de células y de huevos. Excepto que en la cepa mutante no se modificó el tamaño de los ovarios.
- c) A 3 mM de HgCl₂ en las cepas transgénica *Fz3-RFP* y *Chk1,2: Fz3-RFP*, no causa modificaciones en el tamaño de los ovarios, sin embargo, incrementa las células madre foliculares y foliculares en las región 2a y 2b del germario, y el número de quistes germinales con disminución en el número de células y del estadio 11 de la ovogénesis y de huevos. No obstante, en la cepa mutante la ovogénesis y el número de huevos no fueron afectados.
- d) A 30 mM de HgCl₂ en las cepas transgénica *Fz3-RFP* y *Chk1,2: Fz3-RFP*. En *D. melanogaster Fz3-RFP* produce hipotrofia de los ovarios, reduce las células madre foliculares y foliculares en las región 2a y 2b del germario, y el número de quistes germinales con disminución en el número de células y de los estadios 10a, 10b y 11 de la ovogénesis; el número de ovariolas y de huevos. En la cepa mutante se altera la morfología del ovario se reduce el estadio 10b y 11 de la ovogénesis.
- e) A 30 mM de HgCl₂ en las cepas transgénica *Fz3-RFP* se reduce la fertilidad y en la cepa *Chk1,2: Fz3-RFP*, la tasa de fertilidad no se modifica.

- f) A 30 mM de HgCl₂ en las cepas transgénica *Fz3-RFP* y *Chk1,2: Fz3-RFP*, la viabilidad de los embriones disminuye y el desarrollo larvario únicamente alcanza el primero y segundo instar de larva.
- g) A 30 mM de HgCl₂ en las cepas transgénica *Fz3-RFP* y *Chk1,2: Fz3-RFP*. Los organismos del primer segundo e instar de larva no presentan movimiento y locomoción

X REFERENCIAS

Adachi, K. Z. (2007). "Beta-catenin signaling promotes proliferation of progenitor cells in the adult mouse subventricular zone." *Stem Cells* 25(11): 2827-2836.

Adams, M. D., Celniker S. E. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*." *Science* 287(5461): 2185-95.

Adamson, C., Dennis, C., Delaney, S., Christiansen, J., Monkley, S., Kozak, C. (1994). Isolation and Genetic Mapping of Two Novel Members of the Murine Wnt Gene Family, Wnt11 and Wnt12, and the Mapping of Wnt5a y Wnt7a. *Genomics*; 24(1):9-13.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2005). Signaling Pathways That Depend on Regulated Proteolysis. En: *Molecular Biology of the Cell*. (Eds) Garland Science 4th. Edición. New York: Garland Science p. 893-899

Allen, J. W., Shanker, G., Tan, K. H., Aschner, M. (2002). The consequences of methylmercury exposure on interactive functions between astrocytes and neurons, *Neurotoxicology* 23; 755–759.

Altunkaynak, Z. B., Akgül, N. Yahyazadeh, A. (2016). Effect of mercury vapor inhalation on rat ovary: Stereology and histopathology.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). (1999). Toxicological Profile for Mercury. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service;

Altshuler, I., Demiri, B., Xu, S., Constantin, A., Yan, N. D., Cristescu, M. E. (2011). An integrated multi-disciplinary approach for studying multiple stressors in freshwater ecosystems: *Daphnia* as a model organism. *Integr Comp Biol*. 51 (4):623–33. pmid: 21873644.

Amorim, M. I., Mergler, D., Bahia, M. O., Dubeaum H., Miranda, D., Lebel, J., Burbano, R. R., Lucotte, M. (2000). Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury

contamination in the Brazilian Amazon. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 72: 497-507.

Arabi, M., Heydarnejad, M. S. (2007). In vitro mercury exposure on spermatozoa from normospermic individuals. *Pak J Biol Sci*; 10: 2448–53.

Aschner, M., Aschner, J. L. (1990). Mercury neurotoxicity: mechanisms of blood–brain barrier transport. *Neurosci Biobehav Rev* 14:169-176.

Aschner, M., Mullaney, K. J., Wagoner, D., Lash, L. H., Kimelberg, H. K. (1994). Intracellular glutathione (GSH) levels modulate mercuric chloride and methylmercuric chloride (MeHgCl)-induced amino acid release from neonatal rat primary astrocytes cultures. *Brain Res.* 664, 133.

Aten, J., Bosman, C. B., Rozing, J., Stijnen, T., Hoedemaeker, P. J., Weening, J. J. (1988). Mercuric chloride-induced autoimmunity in the Brown Norway rat. *Am. J.* 133, 127-138.

Atchison, W. D., Hare, M. F. (1994). Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity, *FASEB J.* 8 622–629.

Bahia, M. O., Amorim, M. I., Burbano, R. R., Dubeau, H. (1999). Genotoxic effects of mercury on in vitro cultures of human cells. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 71: 437-443.

Bakir, F., Damluji, S. F., Amin-Zaki, L., Murtadha, M., Khalidi, A., al-Rawi, N. Y., Tikriti, S., Dahahir, H. I. Clarkson, T. W., Smith, J. C., Doherty, R. A. (1973). Methylmercury poisoning in Iraq. *Science.* 181:230–241.

Barnes, J. L., McDowell, E. M., McNeil, J. S., Flamenbaum, W., Trump, B. F. (1980). Studies on the pathophysiology of acute renal failure. V. Effect of chronic saline loading on the progression of proximal tubular injury and functional impairment following administration of mercuric chloride in the rat. *Virchows Arch. [B]* 32, 233-260.

Bate, M., Martinez, A. (1993). The Development of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1: 287-93.

Banziger, C., Soldini, D., Schutt, C., Zipperlen, P., Hausmann, G., Basler, K. (2006). Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells. *Cell*. 125:509-22.

Bastock, R., St Johnston, D. (2008). *Drosophila* oogenesis. *Curr Biol*. 18: R1082–7.

Berlin, M., Gibson, S. (1963). Renal uptake, excretion and retention of mercury: Part I. A study in the rabbit during infusion of mercuric chloride. *Archives of Environmental Health*, 6:56–63.

Berlin, M. (1986). Mercury. *Handbook on the Toxicology of Metals*. 2nd ed. Vol. II: Specific metals, pp. 387-445. Elsevier/North Holland, Amsterdam.

Barregard, L., Hogstedt, B., Schutz, A., Karlsson, A., Sallsten, G., Thiringer, G. (1991). Effects of occupational exposure to mercury vapor on lymphocyte micronuclei. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*, 17(4):263–268.

Bhardwaj, A., Kar, J. P., Thakur, O. P., Srivastava, P., Sehgal, H. K. (2009). Electrical characteristics of PbSe nanoparticle/Si heterojunctions. *J Nanosci Nanotechnol*; 9(10):59537.

Biber, T. L., Mylle, M., Baines, A. D., Gottschalk, C. W., Oliver, J. R., MacDowell, M.C. (1968). A study by micropuncture and microdissection of acute renal damage in rats. *Am. J. Med*~ 44, 664-705.

Bischof, J., Basler, K. (2008). Recombinases and their use in gene activation, gene inactivation, and transgenesis. In: Dahmann C, editor. *Drosophila Methods and Protocols*. ed: Humana Press. pp. 175-195.

Bland, C. E., Kimberly, P., Rand, M. D. (2003). Notch induced proteolysis and nuclear localization of the delta ligand. *J Biol Chem*; 278:13607–10.

Boening, D. W. (2000). Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere*, 40(12), 1335-1351.

Bonacker, D., Stoiber, T., Wang, M. (2004). Genotoxicity of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule function. *Arch Toxicol*. 140: 75-81.

Boudou, A., Ribeyre, F. (1997). Aquatic ecotoxicology: from the ecosystem to cellular and the molecular levels. *Environ. Sci.* 105, 21-35.

Bratton, S. B., MacFarlane, M., Cain, K., Cohen, G. M. (2000). Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis, *Exp. Cell. Res.* 25627–33.

Brunke, E. G. (2010). Gaseous elemental mercury depletion events observed at Cape Point during 2007-2008. *Atmospheric Chemistry and Physics*. 10-1121.

Bulleit, R. F., Cui, H. (1998). Methylmercury antagonizes the survival-promoting activity of insulin-like growth factor on developing cerebellar granule neurons, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 153 161–168.

Buszczak, M., Paterno, S., Lighthouse, D., Bachman, J., Planck, J. (2007). The Carnegie protein trap library: a versatile tool for *Drosophila* developmental studies. *Genetics* 175: 1505-1531.

Calvi, B. R., Lilly, M. A., Spradling, A. C. (1998). Cell cycle control of chorion gene amplification. *Genes Dev.* 12:734–44.

Campos-Ortega, J. A., Hartenstein, V. (1985). The Embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Springer-Verlag, Berlin 16 (10): 947-59.

Cantoni, R., Christie, N. T., Robison, S. H., Costa, M. (1984). Characterization of DNA lesions produced by HgCl₂ in cell culture systems, *Chem.-Biol. Interact.* 49:209–224.

Castoldi, A. F., Barni, S., Turin, I., Gandini, C., Manzo, L. (2000). Early acute necrosis, delayed apoptosis and cytoskeletal breakdown in cultured cerebellar granule neurons exposed to methylmercury, *J. Neurosci. Res.* 59 775–787.

Cebulska-Wasilewska, A. (2005). Occupational exposure to mercury vapour on genotoxicity and DNA repair. *Mutan Res.* 586: 102-114.

Ceccatelli, S., Dare, E., Moors, M. (2010). Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. *Chem Biol Interact*; 188 (2):301-308.

Cember, H., Gallagher, P., Faulkner, A. (1968). Distribution of mercury among blood fractions and serum proteins. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 29:233–237.

Chou, T. B., Perrimon, N. (1992). Use of a yeast site-specific recombinase to produce female germline chimeras in *Drosophila*. *Genetics* 131: 643-653.

Choy, C. M., Lam, C. W., Cheung, L.T., Briton-Jones, C. M., Cheung, L.P. (2002). Infertility, blood mercury concentrations and dietary seafood consumption: a case–control study. *BJOG*; 109: 1121–5.

Colquitt, P. J. (1995). The effect of occupational exposure to mercury vapour on the fertility of female dental assistants. *Occup Environ Med.* 52(3):214

Córdoba, D., Cuesta, F. (2000). Intoxicación por mercurio. *Toxicología*. Editor Darío Córdoba Palacio. 4ª edición. Editorial Manual Moderno. Colombia, Bogotá, pp 237-248.

Cuevas, M., Lee, J. K., Spradling, A. C. (1996). Alpha-spectrin is required for germline cell division and differentiation in the *Drosophila* ovary. *Development*; 122:3959-3968.

Clarkson, T. W., Gatzky, J., Dalton, C. (1961). Studies on the equilibration of mercury vapor with blood. Rochester, NY, University of Rochester Atomic Energy Project, Division of Radiation Chemistry and Toxicology.

Clarkson, T. W. (2002). The Three Modern Faces of Mercury. *Environ Health Perspect.* 110 (suppl 1):11–23.

Clarkson, T. W., Magos, L. (2006). The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit Rev Toxicol.* 36(8):609-662.

Clément, G., Braunschweig, R., Pasquier, N., Bosman, F. T., Benhattar, J. (2006). Alterations of the Wnt signaling pathway during the neoplastic progression of Barrett's esophagus. *Oncogene*; 25:3084-3092.

Chang, L. W. (1977). Neurotoxic effects of mercury: a review. *Environ Response*; 14 (3):329-373.

Chamanza, R., Wright, J. A. (2015). Review of the comparative anatomy, histology, physiology and pathology of the nasal cavity of rats, mice, dogs and non-human primates. Relevance to inhalation toxicology and human health risk assessment. *J Comp Pathol.* 153(4):287–314. pmid: 26460093.

Chen, C., Qu, L., Li, B., Xing, L., Jia, G., Wang, T., Chai, Z. (2005). Increased oxidative DNA damage, as assessed by urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine concentrations, and serum redox status in persons exposed to mercury. *Clinical Chemistry*, 51(4), 759-767.

Chen, D., McKearin, D. (2005). Gene circuitry controlling a stem cell niche. *Curr Biol.* 15:179-184.

Chen, Y. W., Huang, C.F., Tsai, K. S., Yang, R. S., Yen, C.C., Yang, C. Y. (2006). Methylmercury induces pancreatic beta-cell apoptosis and dysfunction. *Chem Res Toxicol*; 19 (8): 1080-1085.

Clarkson, T. W. (1972). The pharmacology of mercury compounds, *Annu. Rev. Pharmacol.* 12; 375–406.

Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell.* 127:469-80.

Clifton, J.C. (2007). Mercury exposure and public health. *Pediatr Clin North Am*; 54(2):237-269.

Dai, Y. J., Jia, Y. F., Chen, N., Bian, W. P., Li, Q. K., Ma, Y. B. (2014). Zebrafish as a model system to study toxicology. *Environ Toxicol Chem.* 33 (1):11–7. Epub 24307630.

Dare, E. Gotz, M. E., Zhivotovsky, B., Manzo, L., Ceccatelli, S. (2000). Antioxidants J811 and 17 beta-estradiol protect cerebellar granule cells from methylmercury induced apoptotic cell death, *J. Neurosci. Res.* 62 557–565.

Dare, E., Gorman, A. M., Ahlbom, E., Gotz, M., Momoi, T., Ceccatelli, S. (2001) Apoptotic morphology does not always require caspase activity in rat cerebellar granule neurons, *Neurotoxic. Res.* 3 501–514.

Dare, E., Li, W., Zhivotovsky, B., Yuan, X., Ceccatelli, S. (2001). Methylmercury and H₂O₂ provoke lysosomal damage in human astrocytoma D384 cells followed by apoptosis, *Free Radic. Biol. Med.* 30 1347–1356.

Davis, B. J., Price, H. C., O'Connor, R.W., Rowland, A.S., Morgan, D. L. (2001). Mercury vapor and female reproductive toxicity. *Toxicol Sci.* 59(2):291-296.

Danscher, G., Horsted-Bindslev, P., Rungby, J. (1990). Traces of mercury in organs from primates with amalgam fillings. *Experimental and Molecular Pathology*, 52 (3):291-299.

De Flora, S., Benniceli, C., Bagnasco, M. (1994). Genotoxicity of mercury compounds. A review. *Mutation Research*, 317: 57-79.

del Valle Rodríguez, A., Didiano, D., Desplan, C. (2012). Power tools for gene expression and clonal analysis in *Drosophila*. *Nat Methods* 9: 47-55.

De Rosis, F., Anastasio, S. P., Selvaggi, L., Beltrame, A., Moriani, G. (1985). Female reproductive health in two lamp factories: effects of exposure to inorganic mercury vapour and stress factors. *British Journal of Industrial Medicine*. 42(7), 488-494.

Demerec, M., Kaufmann, B. P. (2005). *Drosophila Guide: Introduction to the Genetics and Cytology of Drosophila Melanogaster*. Carnegie Institution of Washington.

Deng, W. M., Althausen, C., Ruohola-Baker, H. (2001). Notch-Delta signaling induces a transition from mitotic cell cycle to endocycle in *Drosophila* follicle cells. *Development*. 128:4737–46.

Dey, S., Bhattacharya, S. (1989). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Volume 17, Issue 2. Pages 247-257.

Dickman, M. D., Leung, K. M. (1998). Mercury and organochlorine exposure from fish consumption in Hong Kong. *Chemosphere*; 37: 991–1015.

Diegelmann, S., Bate, M., Landgraf, M. (2008). Gateway cloning vectors for the LexA-based binary expression system in *Drosophila*. *Fly (Austin)* 2: 236-239.

Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K. C., Barinova, Y. (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* 448: 151156.

Di Prieto, A. (2008). Biomonitoring of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of subject's whit dental restorative fillings. *Mutan Res.* 650: 115-22.

Dosen, G., Tenstad, E., Nygren, M. K., Stubberud, H., Funderud, S., Rian, E. (2006). Wnt expression and canonical Wnt signaling in human bone marrow B lymphopoiesis. *BMC Immunology.* 7:13.

Drummond-Barbosa, D., Spradling, A. C. (2001). Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during *Drosophila* oogenesis. *Developmental biology.* 231(1), 265-278.

Duchek, P, Somogyi, K., Jékely, G., Beccari, S., Rorth, P. (2001). Guidance of cell migration by the *Drosophila* PDGF/VEGF receptor. *Cell.* 107:17–26.

Elliott, D. A., Brand, A. H. (2008). The GAL4 system: a versatile system for the expression of genes. In: Dahmann C, editor. *Drosophila Methods and Protocols.* ed: Humana Press. pp.79-95.

EPA. (2007). Treatment Technologies for Mercury in Soil, Waste, and Water. <http://www.epa.gov/tio/download/remed/54r07003.pdf>.

EPA. (1997). Mercury Study Report to Congress, Volume II, Fate and Transport of Mercury in the Environment. <http://www.epa.gov/ttn/oarpg/t3/reports/volume3.pdf>.

Fambrough, D., Pan, D., Rubin, G. M., Goodman, C. S. (1996). The cell surface metalloprotease/disintegrin Kuzbanian is required for axonal extension in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93:13233–8.

Farraj, A. K., Hazari, M. S., Cascio, W. E. (2011). The utility of the small rodent electrocardiogram in toxicology. *Toxicol Sci: an official journal of the Society of Toxicology*. 21(1):11–30. pmid: 21278051.

Fergusson, J. E. (1990). *The heavy elements: Chemistry, Environmental Impact and Health effects*, Pergamon, Oxford.

Ferguson, S. B., Blundon, M. A., Klovstad, M. S., Schüpbach, T. (2012). Modulation of *gurken* translation by insulin and TOR signaling in *Drosophila*. *J Cell Sci*, 125 (6), 1407-1419.

Figuroa-Navarrete, A. (1985). Mercurio y metilmercurio. Curso básico de toxicología ambiental (pp.183-204). ECO. [en línea] <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/eco/016750/016750-00.pdf>.

Flora, S. J., Mittal, M., Mehta, A. (2008). Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res*; 128 (4):501-523.

Fonfria, E., Dare, E., Benelli, M., Sunol, C., Ceccatelli, S. (2002). Translocation of apoptosis inducing factor in cerebellar granule cells exposed to neurotoxic agents inducing oxidative stress, *Eur. J. Neurosci*. 16 2013–2016.

Forbes, A. J., Lin, H., Ingham, P. W., Spradling, A. C. (1996). Hedgehog is required for the proliferation and specification of ovarian somatic cells prior to egg chamber formation in *Drosophila*. *Development*. 122:1125-1135.

Forbes A. J., Lehmann R. (1998). Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of *Drosophila* germline stem cells. *Development*; 125:679-690.

Fossato da Silva, D. A. Teixeira, C., Wellerson, T. R., Scarano, A. Favaretto, C., Fernández, D., Grotto, F., Barbosa, Jr., Wilma, D. G. (2011). Effects of methylmercury on male reproductive functions in Wistar rats *Reproductive Toxicology* 31 (2011) 431–439.

Friberg, L., Nordberg, F. (1973). Inorganic mercury a toxicological and epidemiological appraisal. In: Miller MW, Clarkson TW, eds. *Mercury, mercurial and mercaptans*. Springfield, IL, Charles C. Thomas, pp. 5–22.

Friberg, L., Mottet, N. K. (1989). Accumulation of methylmercury and inorganic mercury in the brain. *Biol Trace Elem Res*; 21:201-206.

Frustaci, A., Magnavita, N., Chimenti, C., Caldarulo, M., Sabbioni, E., Pietra, R. (1999). Marked elevation of myocardial trace elements in idiopathic dilated cardiomyopathy compared with secondary cardiac dysfunction. *J Am Coll Cardiol*; 33 (6):1578-1583.

Fu, X. W. (2010). Atmospheric Gaseous Elemental Mercury (GEM) Concentrations and Mercury Depositions at a High-Altitude Mountain Peak in South China. *Atmospheric Chemistry and Physics*. 10-2425.

Fujimura, M., Usuki, F., Sawada, M., Takashima, A. (2009). Methylmercury induces neuropathological changes with tau hyperphosphorylation mainly through the activation of the C-jun-N-terminal kinase pathway in the cerebral cortex, but not in the hippocampus of the mouse brain, *Neurotoxicology* 30 1000–1007.

Galaor, I., Gloner, D., Hausberger, B., Höflein, M., Probst, G., Scheffel, R., Thamm, S., Voel, N.V. (1998). Las minas hispanoamericanas a mediados del siglo XVIII. Vervuert Verlag, Frankfurt.

Gantz, V. M., Bier, E. (2016). The dawn of active genetics. *BioEssays* 38: 50-63.

Ghaffari, M. A., Motlagh, B. (2011). In vitro effect of lead, silver, tin, mercury, indium and bismuth on human sperm creatine kinase activity: a presumable mechanism for men infertility. *Iranian biomedical journal*. 15(1/2), 38.

Gilmour, C. C., Henry, E. A. (1991). Mercury methylation in aquatic systems affected by acid deposition. *Environmental Pollution*. 71(2– 4):131–169.

Gochfeld, M. (2003). Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. *Ecotoxicology and environmental safety*. 56 (1), 174-179.

Goldman, L. R., Shannon, M. W. (2001). American Academy of Pediatrics: Committee on Environmental Health. Technical report: mercury in the environment: implications for pediatricians. *Pediatrics*; 108(1):197-205.

Graff, R. D., Falconer, M. M., Brown, D. L., Reuhl, K. R. (1997). Altered sensitivity of posttranslationally modified microtubules to methylmercury in differentiating embryonal carcinoma-derived neurons, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144 215–224.

Grandjean, P., Landrigan, P. J. (2014). Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *The Lancet Neurology*. 13(3), 330-338.

Gundacker, C., Gencik, M., Hengstschlager, M. (2010). The relevance of the individual genetic background for the toxicokinetics of two significant neurodevelopmental toxicants: mercury and lead. *Mutat Res*; 705 (2):130-140.

Guzzi, G., La Porta, C. A. (2008). Molecular mechanisms triggered by mercury. *Toxicology*; 244 (1):1-12.

Halbach, S., Clarkson, T. W. (1978). Enzymatic oxidation of mercury vapor by erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 523:522–531.

Hansen, J. C. (2005). Exposure of Arctic populations to methylmercury from consumption of marine food. *International Journal of Circumpolar Health*. 64:2.

Harada, M., Nakachi, S., Cheu, T., Hamada, H., Ono, Y., Tsuda, T. (1999). Monitoring of mercury pollution in Tanzania: relation between head hair mercury and health. *Sci Total Environ*; 227 (2-3):249-256.

Hardisson, A. (1981). La contaminación por mercurio en especies marinas. Su importancia bromatológica. *Boletín Informativo de los Colegios Oficiales de Farmacéuticos de las Provincias de Santa Cruz de Tenerife y Las Palmas de Gran Canaria*. Mayo, 29-33.

Harris, R., Krabbenhoft, D. P., Mason, R., Murray, M. W., Reash, R., Saltman, T. (2007). Monitoring and evaluating trends in methylmercury accumulation in aquatic biota. SETAC, Florida, 2p.

Hartman, T. R., Stochlic, T. I., Ji, Y., Zinshteyn, D., O'Reilly, A. M. (2013). Diet controls *Drosophila* follicle stem cell proliferation via Hedgehog sequestration and release. *J Cell Biol*. 201 (5) 741-757.

Henderson, D. S. (2004). *Drosophila* cytogenetics protocols (Vol. 247). Springer Science & Business Media. Pág. 89-92.

Homma-Takeda, S., Kugenuma, Y., Iwamuro, T., Kumagai, Y., Shimojo, N. (2001). Impairment of spermatogenesis in rats by methylmercury: involvement of stage- and cell-specific germ cell apoptosis. *Toxicology*; 169: 25–35.

Huang, J., Zhou, W., Dong, W., Watson, A. M., Hong, Y. (2009). From the Cover: Directed, efficient, and versatile modifications of the *Drosophila* genome by genomic engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 8284-8289.

Huang, W., Massouras, A., Inoue, Y., Peiffer, J., Ramia, M., Tarone, A. M. (2014). Natural variation in genome architecture among 205 *Drosophila melanogaster* Genetic Reference Panel lines. *Genome Res.* 24 (7):1193–208. pmid: 24714809.

Hudson, A. M., Cooley, L. (2014). Methods for studying oogenesis. *Methods*, 68, 207-217.

Huelsmann, S., Yläanne, J., Brown, N. H. (2013). Filopodia-like Actin Cables Position Nuclei in Association with Perinuclear Actin in *Drosophila* Nurse Cells. *Dev Cell.* 26:60415.

Hummel, T., Klambt, C. (2008). P-element mutagenesis. In: Dahmann C, editor. *Drosophila Methods and Protocols*. 2008/07/22 ed: Humana Press. pp. 97-117.

Hursh, J. B, Cherian, M. G., Clarkson, T. W., Vostal, J. J., Mallie, R. V. (1976). Clearance of mercury (197 Hg, 203 Hg) vapour inhaled by human subjects. *Arch Environ Health* 31:302-309.

Iavicoli, I., Fontana, L., Bergamaschi, A. (2009). The effects of metals as endocrine disruptors. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*; 12(3):206-223.

InSug, O. S. Datar, C. J., Koch, I. M., Shapiro, B. J. (1997). Mercuric compounds inhibit human monocyte function by inducing apoptosis: evidence for formation of reactive oxygen species, development of mitochondrial membrane permeability transition and loss of reductive reserve, *Toxicology* 124 211–224.

Jacob-Ferreira, A. L., Passos, C. J., Jordao, A. A., Fillion, M., Mergler, D., Lemire., M., Tanus-Santos, J. E. (2009). Mercury Exposure Increases Circulating Net Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 Activities. *Basic & clinical pharmacology & Toxicology*, 105 (4), 281-288.

Jenkins, V. K., Timmons, A. K., McCall, K. (2013). Diversity of cell death pathways: insight from the fly ovary. *Trends Cell Biol.* 23:567–74.

Johnson, M. L., Rajamannan, N. (2006). Diseases of Wnt signaling. *Rev Endocr Metab Disord*; 7 (12): 4149.

Joshi, D., Mittal, D. K., Shukla, S., Srivastav, A. K. (2012). Therapeutic potential of N-acetyl cysteine with antioxidants (Zn and Se) supplementation against dimethylmercury toxicity in male albino rats. *Exp Toxicol Pathol*; 64 (1-2):103-108.

Kalender, S., Gokce, U., Fatma, D., Filiz, U., Meltem, A. (2013). Mercuric chloride-induced testicular toxicity in rats and the protective role of sodium selenite and vitamin E. *Food and Chemical Toxicology* 55; 456–462.

Kaminker, J., Bergman, C., Kronmiller, B., Carlson, J., Svirskas, R. (2002). The transposable elements of the *Drosophila melanogaster* euchromatin: a genomics perspective. *Genome Biology* 3: research 0084.0081 - 0084.0020.

Kazantzis, G. (2002). Mercury exposure and early effects: an overview. *Med Lav*; 93(3):139-147.

Keck, C. M., Bergmann, E., Ernst, C., Muller, S., Kliesch, E., Nieschlag, E. (1993). Autometallographic detection of mercury in testicular tissue of an infertile man exposed to mercury vapor. *Reprod. Toxicol.* 7, 469-475.

Kelso, R. J., Buszczak, M., Quinones, A. T., Castiblanco, C., Mazzalupo, S. (2004). Flytrap, a database documenting a GFP protein-trap insertion screen in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res* 32 Database issue: D418-D420.

Kerper, L. E, Ballatori, N., Clarkson, T. W. (1992). Methyl mercury transport across the blood–brain barrier by an amino acid carrier. *Am J Physiol.* 262: 761–5.

Khan, A. T., Atkinson, A., Graham, T. C., Thompson, S. J., Ali, S., Shireen, K. F. (2004). Effects of inorganic mercury on reproductive performance of mice. *Food Chem Toxicol.* 42(4):571-7.

Kim, H. J., Koedrith, P., Seo, Y. R. (2015). Ecotoxicogenomic approaches for understanding molecular mechanisms of environmental chemical toxicity using aquatic invertebrate, *Daphnia* model organism. *Int J Mol Sci.* 16(6): 12261–87. pmid: 26035755.

Kim, S. H., Sharma, R. P. (2004). Mercury-induced apoptosis and necrosis in murine macrophages: role of calcium-induced reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase signaling. *Toxicology and applied pharmacology*, 196(1), 47-57.

King, F. J., Szakmary, A., Cox, D. N., Lin, H. (2001). Yb modulates the divisions of both germline and somatic stem cells through piwi- and hh-mediated mechanisms in the *Drosophila* ovary. *Mol Cell*; 7:497-508.

Kirilly, D., Spana, E. P., Perrimon, N., Padgett, R.W., Xie, T. (2005). BMP signaling is required for controlling somatic stem cell self-renewal in the *Drosophila* ovary. *Dev Cell.* 9:651-662.

Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., De Boeck, M., Decordier, I. (2002). Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutation Research*, 504: 137-148.

Kirikoshi, H., Katoh, M. (2002). Expression of WNT7A in human normal tissues and cancer, and regulation of WNT7A and WNT7B in human cancer. *Int J Onco*; 21(4):895-900.

Kohler, R. E. (1993). "Drosophila: a life in the laboratory." *J Hist Biol* 26(2): 281-310

Koos, B. J., Longo, L. D. (1976). Mercury toxicity in the pregnant woman, fetus and newborn infant. A review. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 126,390-409.

Kühl, M., Sheldahl, L. C., Malbon, C. C., Moon, R. T. (2000). Ca^{2+} calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J Biol Chem.* 275:12701-11.

Kudo, A., Fujikawa, Y., Miyahara, S., Zheng, J., Takigami, H., Sugahara, M., Muramatsu, T. (1998). Lessons from minamata mercury pollution. Japan-After a continuous 22 years of observation. *Water Sci Technol.* 38: 187–193.

Lamperti, A. A., Printz, R. H. (1973). Effects of mercuric chloride on the reproductive cycle of the female hamster. *Biology of Reproduction.* 8, 378-387.

LeBel, C. P., Ali, M., McKee, S. C. (1990). Bondy, Organometal-induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2,7-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 104 17–24.

Lee, C. H., Dixon, R. L. (1975). Effects of mercury on spermatogenesis studied by velocity sedimentation cell separation and serial mating. *J Pharmacol Exp Ther*; 194: 17181.

Lee, C. H., Lin, R. H. (1997). Distinct genotoxicity of phenylmercury acetate in human's lymphocytes. *Mutan Res.* 392: 269-76.

Lee, C. H. (2000). Sources, sinks and Levels of Atmospheric Mercury in the UK. http://www.aeat.com/netcen/airqual/reports/dera_hg/dera_hg1.pdf.

Li, S. J., Zhang, S. H., Chen, H. P., Zeng, C. H., Zheng, C. X. (2010). Mercury-induced membranous nephropathy: clinical and pathological features. *Clin J Am Soc Nephrol*; 5(3):439-444.

Li, P., Feng X. B., Qiu, G. L., Shang, L. H., Li, Z. G. (2009). Mercury pollution in Asia: A review of the contaminated sites. *J Hazard Mater.* 168:591–601.

Li, Y., Jiang, Y., Yan, X. P. (2006). Probing mercury species-DNA interactions by capillary electrophoresis with on-line electrothermal atomic absorption spectrometric detection. *Anal Chem.* 78: 6115-20.

Lin, H., Yue, L., Spradling, A. C. (1994). The *Drosophila* fusome, a germline-specific organelle, contains membrane skeletal proteins and functions in cyst formation. *Development*; 120:947-956.

Liu, W., Deng, Y., Liu, Y., Gong, W., Deng, W. (2013). Stem cell models for drug discovery and toxicology studies. *J Biochem Mol Toxicol.* 27(1): 17–27. pmid: 23293059.

Liu, X. Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c, *Cell* 86 147–157.

Logan, C. Y., Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 20:781-810.

Lofroth, G. (1970). Methylmercury, a review hazards and side effects associated with the emission of mercury compounds into natural systems, Stockholm.

Lowe, N., Rees, J. S., Roote, J., Ryder, E., Armean, I. M. (2014). Analysis of the expression patterns, subcellular localisations and interaction partners of *Drosophila* proteins using a pigP protein trap library. *Development* 141: 3994-4005.

Lund, B. O., Miller, D. M., Woods, J. S. (1993). Studies on Hg(II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol*; 45 (10):2017-2024.

Maas, C., Brück, W., Haffner, H. T., Schweinsberg, F. (1996). Investigations on cerebral mercury from dental amalgam fillings through a direct nose brain transport. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin*, 198:275– 291.

Mackay, T. F., Richards, S., Stone, E. A., Barbadilla, A., Ayroles, J. F., Zhu, D. (2012). The *Drosophila melanogaster*, Genetic Reference Panel. *Nature*. 482(7384):173–8. pmid: 22318601.

Magos, L. (1967). Mercury–blood interaction and mercury uptake by the brain after vapor exposure. *Environmental Research*, 1:323–337.

Magos, L., Clarkson T. W., Hudson, A. R. (1989). The effects of dose of elemental mercury and first-pass circulation time on exhalation and organ distribution of inorganic mercury in rats. *Biochem Biophys Acta*. 991: 85–9.

Magos, L., Clarkson T. W. (2006). Overview of the clinical toxicity of mercury. *Ann Clin Biochem*; 43 (Pt 4):257-268.

Mahaffey, K. R. (1999). Methylmercury: a new look at the risks. *Public Health Rep*; 114 (5):396-399.

Mahowald, A. P., Kambyzellis, M. P. (1980). The genetics and biology of *Drosophila*. E. d m. Ashburner Academic Press.

Malhotra, S., Kincade, P. (2009). Wnt-Related molecules and signaling pathway equilibrium in hematopoiesis. *Cell Stem Cell*. 4, 27-36.

Mahowald, A. P., Goralski, T. J., Caulton, J. H. (1983). In vitro activation of *Drosophila* eggs. *Developmental biology*, 98(2), 437-445.

Manning, L., Starz-Gaiano, M. (2015). Culturing *Drosophila* Egg Chambers and Investigating Developmental Processes Through Live Imaging. *Drosophila Oogenesis: Methods and Protocols*, 73-88.

Martinez, C. S., Torres, J. G. D., Peçanha, F. M., Anselmo-Franci, J. A., Vassallo, D. V., Salaices, M., Wiggers, G. A. (2014). Chronic exposure to low concentrations of HgCl₂ impairs sperm quality: Hormonal imbalance and oxidative stress as potential routes for reproductive dysfunction in rats. *PloS One*, 9 (11), 111202.

Marty, M. S., Atchison, W. D. (1997). Pathways mediating Ca²⁺ entry in rat cerebellar granule cells following in vitro exposure to methyl mercury, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 147 319–330.

Mazzalupo, S., Cooley, L. (2006). Illuminating the role of caspases during *Drosophila* oogenesis. *Cell Death & Differentiation*, 13(11), 1950-1959.

McGregor, A. J., Mason, H. J. (1991). Occupational mercury vapour exposure and testicular, pituitary and thyroid endocrine function. *Hum Exp Toxicol*; 10 (3):199-203.

Meyer-Baron, M., Schaepers, M., Thriel, C., Seeber, A. (2004). Neurobehavioural test results and exposure to inorganic mercury in search of dose-response relations. *Arch Toxicol*, 78: 207–11.

Miller, S., Pallan, S., Gangji, A. S., Lukic, D., Clase, C. M. (2013). Mercury-associated nephrotic syndrome: a case report and systematic review of the literature. *Am J Kidney Dis*; 62(1):135-138.

Minoia, C., Ronchi, A., Pigatto, P., Guzzi, G. (2009). Effects of mercury on the endocrine system. *Crit Rev Toxicol* ;39(6):538.

Miura, K. N. (1989). Mechanism of cytotoxicity of methylmercury. With special reference to microtubule disruption, *Biol. Trace Element Res.* 21 313–316.

Miura, K., Koide, N., Himeno, S., Nakagawa, I., Imura, N. (1999). The involvement of microtubular disruption in methylmercury-induced apoptosis in neuronal and nonneuronal cell lines, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 160 279–288.

Miyamoto, K. H., Nakanishi, S., Moriguchi, N., Fukuyama, K., Eto, J., Wakamiya, K., Murao, K., Arimura, M. (2001). Involvement of enhanced sensitivity of Nmethyl-d-aspartate receptors in vulnerability of developing cortical neurons to methylmercury neurotoxicity, *Brain Res.* 901 252–258.

Mohamed, M. K., Lee, W. I., Mottet, N. K., Burbacher, T. M. (1986). Laser light-scattering study of the toxic effects of methylmercury on sperm motility. *J Androl*; 7: 115.

Mojica-Vázquez, L. H., Oyallon, J., Madrigal-Zárraga, D., González-Marín, B., Carmen Martínez-Valenzuela, C., Calderón-Segura, M. E. (2018). Analysis of DNA damage, Structural Organization of the Ovary Germarium and fertility in *Drosophila melanogaster* after exposure to mercury. *Reproductive Toxicology*.

Molina, C. I., Gibon, F. M., Sánchez, Y., Achá-Dario, A., Benefice, E., Guimaraes, J. R. (2010). Implicancia ambiental del mercurio en ecosistemas acuáticos de la Amazonía: Situación en Bolivia. *Revista Virtual REDESMA [online]*. Vol.4, n.2, pp. 25-42. ISSN 1995-1078.

Mozaffarian, D, Rimm, E. B. (2006). Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. *JAMA*; 296 (15):1885-1899.

Mundy, W.R., Freudenrich, T. M. (2000). Sensitivity of immature neurons in culture to metal-induced changes in reactive oxygen species and intracellular free calcium, *Neurotoxicology* 21 1135–1144.

Nagashima, K., Fujii, Y., Tsukamoto, T., Nukuzuma, S., Satoh, M., Fujita, M., Fujioka, Y., Akagi, H. (1996). Apoptotic process of cerebellar degeneration in experimental methylmercury intoxication of rats, *Acta Neuropathol.* 91 72–77.

Nagashima, K. (1997). A review of experimental methylmercury toxicity in rats: neuropathology and evidence for apoptosis, *Toxicol. Pathol.* 25 624–631.

Naganuma, A., Furuchi, T., Miura, N., Hwang, G. W., Kuge, S. (2002). Investigation of intracellular factors involved in methylmercury toxicity. *Tohoku J Exp Med*; 196 (2): 6570.

Nagarkar-Jaiswal, S., Lee, P. T., Campbell, M. E., Chen, K., Anguiano-Zarate S. (2015). A library of MiMICs allows tagging of genes and reversible, spatial and temporal knockdown of proteins in *Drosophila*. *Elife* 4.

Nielsen, J. B., Kudsk, F. (1965). Absorption of mercury vapor from the respiratory tract in man. *Acta Pharmacol Toxicol.* 23: 250–62.

Nielsen J. B., Andersen, O. (1990). Disposition and retention of mercuric chloride in mice after oral and parenteral administration. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 30 (3):167–180.

Nishioku, T., Takai, N., Miyamoto, K., Murao, K., Hara, C., Yamamoto, K., Nakanishi, H. (2000). Involvement of caspase 3-like protease in methylmercury-induced apoptosis of primary cultured rat cerebral microglia, *Brain Res.* 871 160164.

Ni, J. Q., Liu, L., P., Binari, R., Hardy, R., Shim, H. S. (2009). A *Drosophila* resource of transgenic RNAi lines for neurogenetics. *Genetics* 182: 1089-1100.

Nusse, R. (2008). Wnt signaling and stem cell control. *Cell Res.* 18, 523-527.

Nylander, M., Weiner, J. (1991). Mercury and selenium concentrations and their interrelations in organs from dental staff and the general population. *Br J Ind Med*; 48(11):729-734.

O'Brien, P. J. (2014). High-content analysis in toxicology: screening substances for human toxicity potential, elucidating subcellular mechanisms and in vivo use as translational safety biomarkers. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 115 (1): 4–17. pmid: 24641563.

O'Grady, P. M., Markow, T. A. (2009). Phylogenetic taxonomy in *Drosophila*: problems and prospects. *Fly*, 3(1), 10-14.

Ogura, H., Takeuchi, T., Morimoto, K. (1996). A comparison of the 8-hydroxydeoxyguanosine, chromosome aberrations and micronucleus techniques for the assessment of the genotoxicity of mercury compounds in human blood lymphocytes. *Mutation Research*, 340: 175-182.

Oliveira, D. B., Foster, G., Savill, J., Syme, P. D., Taylor, A. (1987). Membranous nephropathy caused by mercury-containing skin lightening cream. *Postgrad Med J*; 63 (738):303-304.

Olovnikov, I. A., Kalmykova, A. I. (2013). piRNA clusters as a main source of small RNAs in the animal germline. *Biochemistry (Moscow)*, 78(6), 572-584.

Organización Mundial de la Salud. (2016). El mercurio y la salud. [en línea] disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs361/es/>.

Orr-Weaver, T. L., Spradling, A. C. (1986). *Drosophila* chorion gene amplification requires an upstream region regulating s18 transcription. *Mol Cell Biol.* 6:4624–33.

Orr-Weaver, T. L. (1991). *Drosophila* chorion genes: cracking the eggshell's secrets. *Bioessays*, 13 (3), 97-105.

Oyama, Y. Y., Yamazaki, Y., Okada, K., Takahama, M., Satoh, H. (2000). Toxicity of methylmercury conjugated with l-cysteine on rat thymocytes and human leukemia K562 cells in comparison with that of methylmercury chloride, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 94955.

Pacyna, E. G., Pacyna, J. M., Steenhuisen, F., Wilson, S. (2006). Global anthropogenic mercury emission inventory. *Atmos Environ.* 2006; 40:4048–4063.

Palmeira, C. M., Madeira, C. (1997). Mercuric chloride toxicity in rat liver mitochondria and isolated hepatocytes. *Environ Toxicol Pharmacol*; 3:229–235.

Pan, D., Rubin, G. M. (1997). Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell*; 90:27180

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.

Pearson, J. R., Zurita, F., Tomás-Gallardo, L., Díaz-Torres, A., Franze, K., Martín-Bermudo, M. D., González-Reyes, A. (2016). ECM-Regulator timp Is Required for Stem Cell Niche Organization and Cyst Production in the *Drosophila* Ovary. *PLoS Genet*, 12(1), e 1005763.

Pérez, D. (1999). Mercury levels in Mole Crabs *Hippa cubensis*, *Emerita brasiliensis*, *E. portoricencis* and *Lepidopa richmondi* (Crustacea: Decapoda: Hippidae) from a Sandy Beach at Venezuela. *Bull Environ Contam Toxicol* 63: 320-326.

Peraza, M. A., Ayala-Fierro, F., Barber, D. S., Casarez, E., Rael, L. T. (1998). Effects of micronutrients on metal toxicity. *Environ Health Perspect*; 106 Suppl 1:203-216.

Pfeiffer, W.C., Lacerda, L. D. (1988). Mercury inputs in the Amazon region. *Environ Technol Lett.* 9:325–330.

Pfeiffer, B. D., Ngo, T. T., Hibbard, K. L., Murphy, C., Jenett, A. (2010). Refinement of Tools for Targeted Gene Expression in *Drosophila*. *Genetics* 186: 735755.

Piotrowski, J., Trojanowska, B., Wisniewska-Knypl, J. M., Bowlanowska, W. (1973). Further investigations on binding and release of mercury in the rat. In: Miller MW, Clarkson TW, eds. *Mercury, mercurials and mercaptans*. Springfield, IL, Charles C. Thomas, p. 247.

Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). (2005). Evaluación mundial sobre el mercurio. PNUMA, Productos Químicos, Ginebra, pág. 32-98.

Prokop, A. (2017). What is Developmental Biology – and why is it important? *Open Access Government* 17, 121-12.

Rahlenbeck, S. I., Burberg, A., Zimmermann, R. D. (1999). Lead and Cadmium in Ethiopian vegetables. *Bull Environ Contam Toxicol* 62: 30-33.

Rao, M. V. (1989). Toxic effects of methylmercury on spermatozoa in vitro. *Experientia*; 45: 985–7.

Rao, M. V, Chinoy, N. J, Suthar M. B. (2001). Role of ascorbic acid on mercuric chloride induced genotoxicity in human blood cultures. *Toxicol in vitro*. 15:649-54.

Reya, T., Clevers, H. (2005). Wnt signaling in stem cells and cancer. *Nature*. 434:843850.

Rice, G. E., Ambrose, R. B., Bullock, O. R., Smawtout, J. (1997). Mercury study report to Congress. Durham: US Environmental Protection Agency; p. 1.1-6.30.

Rizzo, A., Furst, A. (1972). Mercury teratogenesis in the rat. Proc. West. Pharmacol. SOC. 15, 52-54.

Rodríguez-Arnaiz, R. (1967). Efecto de la radiación ionizante y de la actinomicina sobre la no disyunción de los cromosomas de *Drosophila melanogaster*. Tesis profesional. UNAM, México.

Rodríguez-Arnaiz, R. (2003). *Drosophila* como organismo modelo en la Biología Experimental. Biología celular y molecular L. F. Jiménez y H. Merchant (Eds.) Editorial Pearson Education (Addison Wesley-Prentice Hall) pp 761-791. ISBN 970-26-0387-0.

Rodríguez-López, M. A., Navarro, M., Cabrera, C., López, M. C. (2001). Elementos Tóxicos en Alimentos, Bebidas y Envases. Alimentaria. 23-31.

Rooke, J, Pan, D., Xu, T., Rubin, G. M. (1996). A conserved metalloprotease disintegrin protein with two roles in *Drosophila* neurogenesis. Science; 273:1227–31.

Rørth, P. (1996). A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 12418-12422.

Rowland, A. S., Baird, D. D., Weinberg, C. R., Shore, D. L., Shy, C. M., Wilcox, A. J. (1994). The effect of occupational exposure to mercury vapour on the fertility of female dental assistants. Occupational and Environmental Medicine, 51(1), 28-34.

Rudrapatna, V. A., Cagan, R. L., Das, T. K. (2012). *Drosophila* cancer models. Developmental Dynamics, 241(1), 107-118.

Rytuba, J. J., Seal, R. R., Foley, N. K. (2002). Mercury geoenvironmental models, in progress son geoenviromental models for selected mineral deposit types. <http://pubs.usgs.gov/of/2002/of02-1995/>.

Saijoh, K. T., Fukunaga, H., Katsuyama, M. J., Lee, K. (1993). Effects of methylmercury on protein kinase A and protein kinase C in the mouse brain, *Environ. Res.* 63 264–273.

Sanderson, M. P., Erickson, S. N., Gough, P. J., Garton, K. J., Wille, P. T., Raines E. W. (2005). ADAM mediates ectodomain shedding of the betacellulin precursor activated by p-aminophenylmercuric acetate and extracellular calcium influx. *J Biol Chem*; 280: 182637.

Sanz-Gallén, P., Nogué, S., Corbella, J. (1993). Metales. *Toxicología Clínica*. Luis Marruecos, Santiago Nogué y Joan Nolla. Springer-Verlag Ibérica S.A., Barcelona, pp 275291.

Sapin, C., Druet, E., Druet, P. (1977). Induction of anti-glomerular basement membrane antibodies in the Brown-Norway rat by mercuric chloride. *Clin. Exp. Inzmunol.* 28,173-179.

Sarafian, T. A., Verity, M. A. (1991) Oxidative mechanisms underlying methyl mercury neurotoxicity. *Int J Dev Neurosci*; 9 (2):147-153.

Sarafian, T. A. (1993). Methyl mercury increases intracellular Ca^{2+} and inositol phosphate levels in cultured cerebellar granule neurons, *J. Neurochem.* 61 648–657.

Sarov, M., Barz, C., Jambor, H., Hein, M. Y., Schmied, C. (2015). A genome-wide resource for the analysis of protein localisation in *Drosophila*. *bioRxiv*.

Schamberg, J., Kolmer, J., Raiziss, G. (1918). Experimental studies of the mode of absorption of mercury when applied by injection. *Journal of the American Medical Association*, 70:142.

Schrag, S. D., Dixon, R. L. (1985). Occupational exposures associated with male reproductive dysfunction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 25:567-592.

Schoeman, K, Bend, J. R., Koren, G. (2010). Hair methylmercury: a new indication for therapeutic monitoring. *Ther Drug Monit*; 32(3):289-293.

Schurz, F., Sabater-Vila, M., Fink-Gremmels, J. (2000). Mutagenicity of mercury chloride and mechanisms of cellular defence: the role of metal-binding proteins. *Mutagenesis* 15,525-530.

Serrano, C. (2004). *Historia de la minería andina boliviana*. UNESCO, Potosí. 46256.

Shenker, B. J., Guo, T. L., Shapiro, I. M. (1999). Induction of apoptosis in human T-cells by methyl mercury: temporal relationship between mitochondrial dysfunction and loss of reductive reserve, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 157 23–35.

Shenker, B. J., Guo, T. L., Shapiro, I. M. (2000). Mercury-induced apoptosis in human lymphoid cells: Evidence that the apoptotic pathway is mercurial species dependent. *Environ Res Sec A*; 84:89–99.

Shanker, G. T. (2001). Identification and characterization of uptake systems for cystine and cysteine in cultured astrocytes and neurons: evidence for methylmercury-targeted disruption of astrocyte transport, *J. Neurosci. Res.* 66 998–1002.

Shanker, G. T., Syversen, J. L., Aschner, M. (2005). Modulatory effect of glutathione status and antioxidants on methylmercury-induced free radical formation in primary cultures of cerebral astrocytes, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 137 11–22.

Sierra, A., Hardisson, A. (1991). La contaminación química de los alimentos. Aditivos alimentarios. En: Piédrola G, Domínguez M, Cortina P et al, eds. *Medicina Preventiva y Salud pública* 9ª ed. alvat, Barcelona, pp 293-303.

Sikorski, R. T., Juskiewicz, T., Paszkowski, T., Szprengier-Juskiewicz, T. (1987). Women in dental surgeries: reproductive hazards in occupational exposure to metallic mercury. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 59 551-557.

Silberberg, I., Prutkin, L., Leider, M. (1969). Electron microscopic studies of transepidermal absorption of mercury. *Archives of Environmental Health*, 19:7–14.

Silver, D. L., Geisbrecht, E. R., Montell, D. J. (2005). Requirement for JAK/STAT signaling throughout border cell migration in *Drosophila*. *Development*, 132 (15), 3483-3492.

Sin, Y. M., Teh, W.F., Wong, M. K., Reddy, P. H. (1990). Effect of mercury on glutathione and thyroid hormones. *Environ. Contam. Toxicol* 44, 616-622.

Simmons-Willis, T. A., Koh, A. S., Clarkson, T. W., Ballatori, N. (2002). Transport of a neurotoxicant by molecular mimicry: the methylmercury-Lcysteine complex is a substrate for human L-type large neutral amino acid transporter (LAT)1 and LAT 2. *Biochem J.* 367:239–46.

Solt, I., Bornstein, J. (2010). Childhood vaccines and autism: much ado about nothing. *Harefuah*; 149(4):251-255.

Song, X., Xie, T. (2002). DE-cadherin-mediated cell adhesion is essential for maintaining somatic stem cells in the *Drosophila* ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*; 99:14813-14818.

Song, X., Xie T. (2003). Wingless signaling regulates the maintenance of ovarian somatic stem cells in *Drosophila*. *Development*; 130:3259-3268.

Soria, M. L., Repetto, G., Repetto, M. (1995). Revisión general de la toxicología de los metales. En: M. Repetto, ed. *Toxicología Avanzada*. Díaz de Santos, Madrid, pp 293-358.

Staal, F., Tiemessen, M. (2008). Wnt signaling in the immune system; Wnt is spreading its wings. *Nature Rev Immunol.* 8, 581-593.

Steffen, A. (2008). A synthesis of atmospheric mercury depletion event chemistry in the atmosphere and snow. *Atmospheric chemistry and physics*. 8-1445.

Stellman, J. M. (2001). *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, Subdirección General de Publicaciones. Tercera edición. http://pendientedemigracion.ucm.es/info/seas/estres_lab/enciclo/indice_gral.htm.

Stoiber, T., Bonacker, D. (2004). Disturbed microtubule function and induction on micronuclei by chelate complexes of mercury. *Mutan Res.* 563: 97-106.

Storelli, M. M., Marcotrigiano, G. O. (1998). Distribution of heavy metal residues in some tissues of *Caretta caretta* (Linnaeus) specimen beached along the Adriatic Sea (Italy). *Bull Environ Contam Toxicol* 60: 546-552.

Styhler, S., Nakamura, A., Swan, A., Suter, B., Lasko, P. (1998). Vasa is required for Gurken accumulation in the oocyte and is involved in oocyte differentiation and germline cyst development. *Development*; 125:1569-1578.

Sun, J., Smith, L., Armento, A., Deng, W. M. (2008). Regulation of the endocycle/gene amplification switch by Notch and ecdysone signaling. *J Cell Biol.* 2182:885–96.

Sunja, K. S., Dayani, L., Rosenberg, P. A., Li, J. (2010). RIP1 kinase mediates arachidonic acid-induce oxidative death of oligodendrocyte precursors. *Intl Physiol Pathophysiol Pharmacol*; 2 (2): 137–147.

Summers, A. O., Wireman, J., Vimy, M. J., Lorscheider, F. L., Marshall, B., Levy, S. B. (1993). Mercury released from dental “silver” fillings provokes an increase in mercury- and antibiotic-resistant bacteria in oral and intestinal floras of primates. *Antimicrob Agents Chemother*; 37(4):825-834.

Suzuki, H., Watkins, D. N., Jair, K. W., Schuebel, K. E., Markowitz, S. D., Chen, W. D. (2004). Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet*; 36:417-422.

Swevers, L., Raikhel, A. S., Sappington, T. W., Shirk, P., and Iatrou, K. (2005). Vitellogenesis and post-vitellogenic maturation of the insect ovarian follicle. *Comprehensive molecular insect science*, 1, 87-155.

Takahata, N., Hayashi, H., Watanabe, S., Anso, T. (1970). Accumulation of mercury in the brains of two autopsy cases with chronic inorganic mercury poisoning. *Folia Psychiatrica et Neurologica Japonica*, 24:59–69.

Takahashi-Yanaga, F., Sasaguri, T. (2007). The Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway as a Target in Drug Discovery. *J Pharmacol Sci*; 104 (4): 293- 302.

Tamashiro, H., Arakaki, M., Futatsuka, M., Lee, E. S. (1986). Methylmercury exposure and mortality in southern Japan: a close look at causes of death. *Journal of epidemiology and community health*, 40 (2), 181-185.

Tamm, C., Duckworth, J., Hermanson, O., Ceccatelli, S. (2006). High susceptibility of neural stem cells to methylmercury toxicity: effects on cell survival and neuronal differentiation, *J. Neurochem.* 97 69–78.

Tan, S. W., Meiller, J. C., Mahaffey, K. R. (2009). The endocrine effects of mercury in humans and wildlife. *Crit Rev Toxicol*; 39(3):228-269.

Tchounwou, P. B., Ayensu, W. K., Ninashvili, N., Sutton, D. (2003). Environmental exposure to mercury and its toxicopathology implications for public health. *Environ Toxicol*; 18(3):149-175.

Their, R., Bonacker, D., Stoiber, T. (2003). Interaction of metal salts with cytoskeletal motor protein system. *Toxicol.* 140-141:75-81.

Theodosiou, N. A., Xu, T. (1998). Use of FLP/FRT system to study *Drosophila* development. *Methods* 14: 355-365.

Trasande, L., Landrigan, P. J., Schechter, C. (2005). Public health and economic consequences of methyl mercury toxicity to the developing brain. *Environ Health Persp.* 113:590–596.

Tofighi, R., Johansson, C., Goldoni, M., Ibrahim, W. N., Gogvadze, V., Mutti, A., Ceccatelli, S. (2010). Hippocampal neurons exposed to the environmental contaminants methylmercury and polychlorinated biphenyls undergo cell death parallel activation of calpains and lysosomal proteases, *Neurotox. Res.*

Toimela, T., Tahti, H. (2004). Mitochondrial viability and apoptosis induced by aluminum, mercuric mercury and methylmercury in cell lines of neural origin, *Arch. Toxicol.* 78 565574.

Tootle, T. L., Spradling, A. C. (2008). *Drosophila Pxt*: a cyclooxygenase-like facilitator of follicle maturation. *Development*, 135(5), 839-847.

Tyler, M. S. (2000). *Developmental biology: a guide for experimental study*. Chapter 8: Development of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. Sunderland, Massachusetts.

Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Facultad de Química (2008). Hoja de seguridad XXI mercurio y sales de mercurio. [en línea] <http://www.quimica.unam.mx/IMG/pdf/21HG.pdf>.

Uryu, O., Ameku, T., Niwa, R. (2015). Recent progress in understanding the role of ecdysteroids in adult insects: Germline development and circadian clock in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Zoological Letters* 1:3 DOI 10.1186/s 40851-015-0031-2.

USDHHS, (US Department of Health and Human Services, Public Health Service). (1999). Toxicological profile for mercury. Atlanta: US Department of Health and Human Services p. 1-600.

Valko, M. M., Morris, H., Cronin, T. D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), 1161-1208.

Vermeulen, L., De Sousa, E., Melo, F., Van der Heijden, M., Cameron, K., de Jong, J. H., Borovski, T. (2010). Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol*; 12:468-476.

Verschaeve, L., Kirsch-Volders, M., Susanne, C., Groetenbriel, C., Haustermans, R., Lecomte, A., Roossels, D. (1976). Genetic damage induced by occupationally low mercury exposure. *Environmental Research*, 12:306-3.

Villanueva, T. (2010). Cancer stem cells: Wnt-looking outside in. *Nat Rev Cancer*; 10:386-387.

Vojdani, A., Pangborn, J. B., Vojdani, E., Cooper, E. L. (2003). Infections, toxic chemicals and dietary peptides binding to lymphocyte receptors and tissue enzymes are major instigators of autoimmunity in autism. *Int J Immunopathol Pharmacol*; 16(3):189-199.

Von Burg, R. (1995). Toxicology update: inorganic mercury. *J. Appl. Toxicol.* 15,483.

Von Stetina, J. R., Orr-Weaver, T. L. (2011). Developmental control of oocyte maturation and egg activation in metazoan models. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(10), 005553.

Wada, H., Cristol, D. A., McNabb, F. M., Hopkins, W. A. (2009). Suppressed adrenocortical responses and thyroid hormone levels in birds near a mercury-contaminated river. *Environ Sci Technol* 2009; 43(15):6031-6038.

Wang, L., Jia, G., Wei, Sheng Yan, J. (2005). Progress in developmental toxicity of methylmercury.; 34(5):633-635.

Wang, Z., Lin, H. (2005). The division of *Drosophila* germline stem cells and their precursors requires a specific cyclin. *Curr Biol*; 15:328-333.

Weast, R. C. (1982). *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 62nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL.

Weiner, J. A., Nylander, M. (1993). The relationship between mercury concentration in human organs and different predictor variables. *Sci Total Environ* 138: 101-115.

Wilke, R. A., Kolbert, C. P., Rahimi, R.A., Windebank, A. J. (2003). Methylmercury induces apoptosis in cultured rat dorsal root ganglion neurons, *Neurotoxicology* 24:369-378.

Winn, R. A., Scoyk, M. V., Hammond, M., Rodriguez, K., Crossno, J. T., Heasley, L. (2006). Antitumorigenic Effect of Wnt 7a and Fzd 9 in Nonsmall Cell Lung Cancer Cells Is Mediated through ERK-5-dependent Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ . *J Biol Chem*; 281:26943-26950.

Wodarz, A., Nusse, R. (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998; 14:59-88.

Wong, M. D., Jin, Z., Xie, T. (2005). Molecular mechanisms of germline stem cell regulation. *Annu Rev Genet*; 39:173-195.

Wu, J. S., Luo, L. (2006). A protocol for mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) in *Drosophila*. *Nat Protoc* 1: 2583-2589

Wu, M. F., Ison, J. R., Wecker, J. R., Lapham, L. W. (1985). Cutaneous and auditory function in rats following methyl mercury poisoning. *Toxicol Appl Pharmacol*; 79(3):377-388.

Wyllie, A. H., Kerr, J. F., Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis, *Int. Rev. Cytol.* 68 251–306.

Xie, T., Spradling, A. C. (2000). A niche maintaining germ line stem cells in the *Drosophila* ovary. *Science*; 290:328-330.

Yamamoto, S., Jaiswal, M., Charng, W. L., Gambin, T., Karaca, E. (2014). A *Drosophila* genetic resource of mutants to study mechanisms underlying human genetic diseases. *Cell* 159: 200-214.

Yee, S. B. (1994). Methylmercury poisoning induces oxidative stress in the mouse brain, *Exp. Mol. Pathol.* 60 188–196.

Yoshida, M. (2002). Placental to fetal transfer of mercury and fetotoxicity. *Tohoku J Exp Med* 196:79-88.

Yonaha, M. M., Saito, M. (1983). Stimulation of lipid peroxidation by methylmercury in rats, *Life Sci.* 32 1507–1514.

Zhang, H. (2006). Photochemical redox reactions of mercury. *Struct. Bond.* 120:3779.

Zhang, Y., Kalderon, D. (2001). Hedgehog acts as a somatic stem cell factor in the *Drosophila* ovary. *Nature*; 410:599-604.

