



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Análisis genotóxico y morfológico en ovarios de
Drosophila melanogaster expuestos a mercurio**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

DIANA MADRIGAL ZARRAGA



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. LUIS HUMBERTO MOJICA VÁZQUEZ**

Ciudad Universitaria, CD. MX. 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.

1. Datos del alumno. Autor:

Madrigal
Zarraga
Diana
57763804
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
309107923

2. Datos del tutor.

Dr.
Luis Humberto
Mojica
Vázquez

3. Datos del Sinodal 1.

Dra.
Josefina
Cortés
Eslava

4. Datos del Sinodal 2.

Dr.
Javier Andrés
Juárez
Díaz

5. Datos del Sinodal 3.

M. en C.
Adriana Verónica
Balderas
Loeza

6. Datos del Sinodal 4.

M. en C.
Tanya Marcela
González
Martínez

7. Datos de la tesis.

Análisis genotóxico y morfológico en ovarios de *Drosophila melanogaster* expuestos a mercurio.
63 p.
2018

Dedicatoria

A mi Viejita, mi madre, quien siempre ha sido mi guía y ha estado ahí para brindarme su apoyo y amor de manera incondicional. Mamá, quiero llegar a ser la gran mujer que eres, siempre alegre, jovial y amorosa.

A mi Papaíto por el cariño y la enseñanza que me ha dado; ser siempre tenaz, responsable y dedicada en lo que haga, pero lo más importante, jamás rendirme. Gracias por todo tu apoyo y amor.

A mi Lizzy por estar ahí cuando más lo necesitaba y levantarme de las cenizas cuando las llamas anidaban en mi corazón. Gracias hermana, no tengo palabras para expresarte lo mucho que te quiero y admiro.

A mi Goofito por su apoyo y cariño. Gracias hermano por estar a mi lado hasta ahora y hacerme la vida más amena al sacarme una sonrisa con tus ocurrencias y tu forma peculiar de contar la vida.

Agradecimientos

A todos aquellos que hicieron posible esta meta. A la gente que me enseñó, corrigió y guió a lo largo de este camino.

Al Dr. Luis por guiarme y apoyarme. Gracias por compartirme su conocimiento y su tiempo. Además, agradezco su gran paciencia y comprensión.

A la Dra. Justine por explicarme pacientemente todas mis dudas.

A Cynthia por ser mi compañera y amiga. Gracias por apoyarme y animarme para continuar. Atesoro las horas que pasamos juntas en el laboratorio.

A Laura Garces por hacer divertidos los días de trabajo.

A todos los miembros del jurado por sus comentarios, tiempo y apoyo.

"La ciencia no es más que un refinamiento del pensamiento cotidiano" - Albert Einstein

"Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como la oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber" - Albert Einstein



"La vida sería trágica si no fuera graciosa" - Stephen Hawking

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
II.1 Mercurio	2
II.1.1 El mercurio en el ambiente.....	3
II.1.2 Transformación del mercurio en el ambiente	4
II.1.3 Exposición al mercurio	6
II.1.4 Biotransformación del mercurio.....	8
II.1.5 Efectos tóxicos del mercurio	9
II.1.6 Efectos tóxicos del mercurio en el sistema reproductor femenino	9
II.1.7 Mecanismos de acción del mercurio.....	10
II.2 <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo biológico.....	13
II.2.1 Ciclo de vida.....	15
II.2.2 Sistema reproductor de <i>D. melanogaster</i> : ovarios	17
II.2.3 Ovogénesis	18
II.3 Biomarcadores.....	22
II.3.1 Ensayo cometa.....	23
III. JUSTIFICACIÓN.....	25
IV. OBJETIVOS	26
IV.1 Objetivo general	26
IV.2 Objetivos particulares.....	26
V. HIPÓTESIS	26
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
VI.1 Cultivo de moscas	27
VI.2 Producto químico de prueba	27
VI.3 Exposición a mercurio	28
VI.4 Obtención de muestra	28
VI.5 Medición de los ovarios	29
VI.6 Ensayo cometa alcalino	29
VII. RESULTADOS	32
VII.1 Morfología de ovarios de <i>D. melanogaster</i> expuestos a HgCl ₂	32
VII.2 Genotóxicidad en los ovarios de <i>D. melanogaster</i> expuestos a HgCl ₂	34
VIII. DISCUSION	42
IX. CONCLUSIONES	46
X. PERSPECTIVAS	46
XI. BIBLIOGRAFÍA	47
XII. ANEXO	60

I. RESUMEN

En este estudio se analizó el efecto genotóxico y morfológico de los ovarios de *Drosophila melanogaster* expuestos a las concentraciones 0.1, 0.3, 3 y 30 mM de Cloruro de mercurio (HgCl_2) por 24, 48 y 72 horas, mediante el ensayo cometa alcalino y calculando el área de los ovarios. El daño en el DNA se evaluó determinando los siguientes parámetros genotóxicos: longitud, momento e intensidad de la cauda en 150 núcleos por tratamiento y por día. Para las observaciones morfológicas se midió la altura y el ancho obteniendo así el área de los ovarios de *D. melanogaster* por tratamiento y por día. Los resultados evidencian que a la exposición de 0.3, 3 y 30 mM de HgCl_2 por 72 h se indujo un incremento significativo de daño en el DNA de las células del ovario de *D. melanogaster* con relación al testigo. De igual manera, se detectó una reducción significativa del área de los ovarios contrastados con los ovarios del grupo testigo. Este estudio nos ayuda a visualizar los efectos genéticos y morfológicos ocasionados por el HgCl_2 en un organismo vivo y nos abre las puertas a la comprensión de los mecanismos moleculares que son afectados por exposiciones al mercurio. De igual forma muestra el potencial de este sistema biológico para poder evaluar las afectaciones de diferentes contaminantes en los organismos vivos.

II. INTRODUCCIÓN

En México, de acuerdo con el Inventario Nacional de Emisiones (INEM), se emiten más de 40.5 millones de toneladas de contaminantes a la atmósfera, de los cuales el 21% provienen de fuentes naturales y 79% de fuentes antropogénicas (Riojas-Rodríguez *et al.*, 2013).

Las actividades antropogénicas, en México, han aumentado el problema de la contaminación por metales pesados, principalmente por la minería debido al manejo inadecuado de sus residuos, los jales mineros. En México, los metales contaminantes más importantes dada su toxicidad y abundancia son: mercurio, arsénico, plomo y cromo (Covarrubias y Cabriales, 2017).

El mercurio es un elemento que existe en la atmósfera de forma natural a consecuencia de incendios forestales, erupciones volcánicas y erosión de las rocas, entre otros fenómenos. Actualmente, sin embargo, el aumento de este elemento en la atmósfera se debe principalmente a actividades antropogénicas como las emisiones atmosféricas que producen la industria, el comercio, los servicios, los vehículos y el sistema de transporte (Escobedo-Flores *et al.*, 2000).

II.1 Mercurio

El mercurio es un metal no esencial, muy tóxico, persistente y bioacumulable. A temperatura ambiente es líquido y de color blanco plateado. La toxicidad del mercurio depende de su forma química, sin embargo, todas a concentraciones altas causan toxicidad aguda. El mercurio se presenta en tres formas: metálico o elemental (Hg^0); sales inorgánicas (Hg^{+2} , Hg^{+2}) y compuestos orgánicos (MeHg-, etilHg y fenilHg) (PNUMA, 2002; Ortega *et al.*, 2003; Ramírez, 2008; Al-Saleh *et al.*, 2009). En la Tabla 1 se muestran las propiedades físicas y químicas de este elemento.

Tabla 1. Cualidades químicas y físicas del mercurio (Español, 2001).

Mercurio elemental	
Símbolo	Hg
Peso atómico	200.61 g/mol
Densidad	13.546g/cm ³
Punto de fusión	-38.9 °C
Punto de ebullición	356.9 °C*
Tensión superficial	480.3 din/cm

*El mercurio elemental puede evaporarse a la temperatura ambiente y generar vapores de mercurio.

II.1.1 El mercurio en el ambiente

El mercurio elemental es una sustancia tóxica que no se puede descomponer o degradar en otras sustancias más inofensivas, pero durante su ciclo geológico cambia de estado y especie. El mercurio liberado al ambiente puede tener una gran movilidad y circular entre la superficie terrestre, los cuerpos de agua y la atmósfera (PNUMA, 2002). El mercurio tiene dos fuentes de contaminantes: las naturales y antropogénicas.

Las principales fuentes naturales son la actividad volcánica, la erosión de las rocas y incendios forestales (Wang *et al.*, 2004; Gaioli *et al.*, 2012). En consecuencia, el ciclo natural del mercurio es principalmente un ciclo atmosférico, donde el mercurio se incorpora a las cadenas tróficas por medio de la inhalación directa o mediante la participación del ciclo del agua (Villarejo, 2004).

En el ciclo antropogénico las fuentes principales son la minería, la metalurgia, la agricultura, el empleo de combustibles fósiles, las industrias cloroalcalinas de fabricación del papel, instrumental médico (termómetros, esfingomanómetros, bujías, amalgamas dentales), termostatos, lámparas fluorescentes, cementeras, tratamiento de desechos, vertederos, cremación y pinturas (Gaioli *et al.*, 2012; Covarrubias y Cabriales, 2017).

El mercurio se incorpora al ciclo atmosférico por medio de emisiones atmosféricas o la combustión de carbones. En el ciclo del agua entra directamente a los ríos y mares por el vertido de residuos industriales o domésticos. También hay presencia en suelos debido a la aplicación de fungicidas a base de mercurio orgánico. El mercurio se incorpora en las cadenas tróficas debido a la ingesta de agua contaminada, por la inhalación directa de vapores o partículas de mercurio y por medio de los suelos contaminados (Villarejo, 2004). En la Figura 1 se muestra las rutas del ciclo del mercurio natural y antropogénico.

II.1.2 Transformación del mercurio en el ambiente

El mercurio tiene la capacidad de formar compuestos tanto inorgánicos como orgánicos. En las cadenas tróficas las especies inorgánicas presentes son el Hg metal, el óxido de mercurio (HgO) y dos especies iónicas, el catión mercúrico (Hg^{2+}) y el ion dimercurio (Hg_2^{2+}). En el caso de las especies orgánicas se encuentran el dimetilmercurio ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$), el metilmercurio (CH_3Hg^+) y el fenilmercurio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$) (Villarejo, 2004).

Debido a la volatilidad y sublimación a temperatura ambiente del Hg metal, este se puede incorporar a las cadenas tróficas al unirse a la atmósfera en forma de vapor de mercurio (Hg^0), el cual se oxida por el ozono, por oxígeno o cloro, transformándose en la especie soluble Hg^{2+} . Posteriormente el Hg^{2+} entra en los cuerpos de agua y se deposita en los sedimentos donde puede reaccionar con el sulfato para formar un precipitado insoluble de sulfuro mercúrico o ser biometilado por bacterias, incorporándose entonces en las cadenas tróficas (Albert, 1997; Gochfeld 2003; Villarejo, 2004); por asimilación del plancton, pasa a las algas y de ahí a organismos superiores como peces, aves, mamíferos e incluso al humano. Otro medio por el cual el Hg puede entrar en las cadenas tróficas por el uso de agua contaminada con mercurio para el riego. En este caso, el mercurio se acumula en el suelo y puede ser absorbido por las raíces de las plantas para después ser consumido por los herbívoros (Albert, 1997).

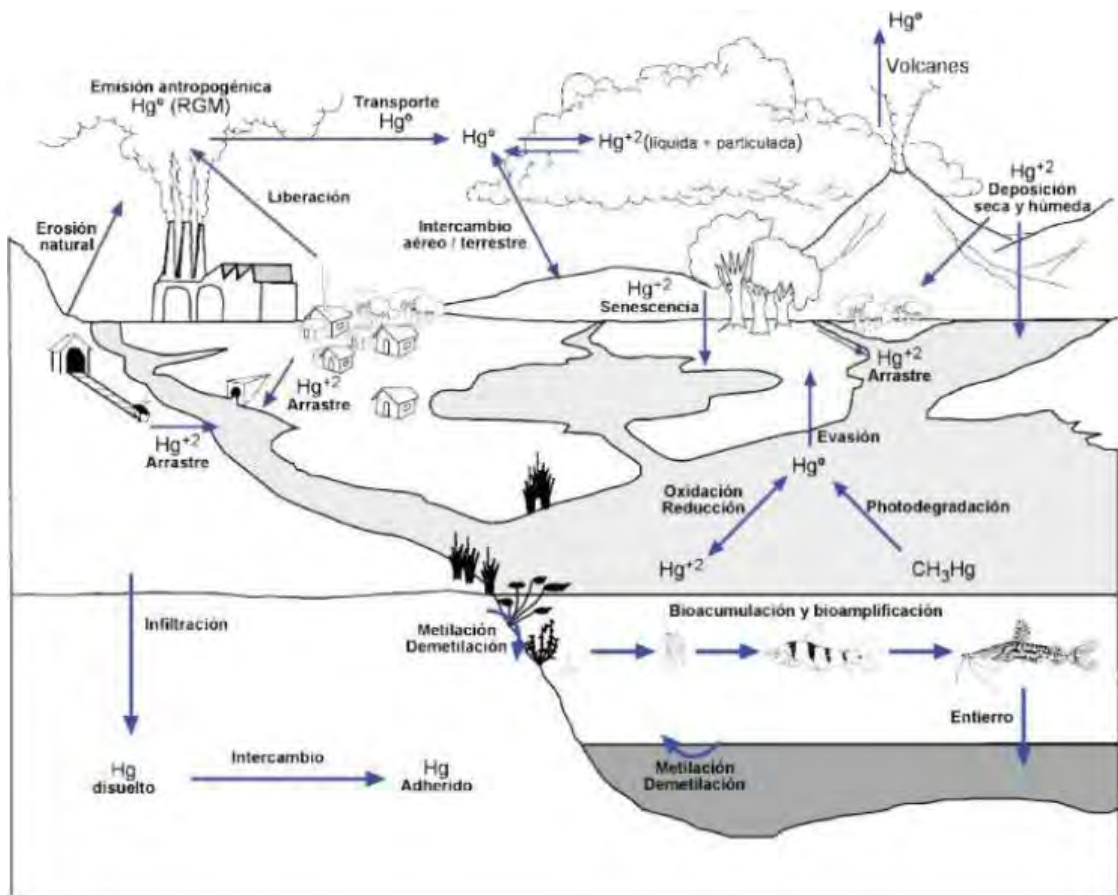


Figura 1. Ciclo del mercurio natural y antropogénico (modificado por Molina *et al.* 2010).

II.1.3 Exposición al mercurio

La población humana está expuestas principalmente al mercurio por medio de la ingestión de productos marinos contaminados con metilmercurio, la inhalación de vapores de Hg⁰, el uso de jabones, cremas aclaradoras de la piel, amalgamas, vacunas entre otros productos farmacéuticos que contienen conservantes de mercurio (como el timerosal). Incluso existe mercurio en algunas medicinas tradicionales utilizadas con fines religiosos, culturales y rituales (PNUMA, 2002; Gochfeld, 2003).

La absorción del mercurio por el organismo puede llevarse a cabo por tres vías: cutánea, respiratoria y gastrointestinal (Tabla 2):

-Vía cutánea: el mercurio elemental es poco absorbido por la piel, mientras que algunos compuestos mercuriales orgánicos son absorbidos fácilmente, por ejemplo el dimetilmercurio (Gochfeld, 2003).

-Vía respiratoria: el 80% de los vapores de mercurio se absorben por inhalación y rápidamente entran al torrente sanguíneo a través de las membranas alveolares. El mercurio elemental, al igual que el metilmercurio se distribuye a todos los tejidos gracias a la alta solubilidad lipídica que tiene la sangre (Albert, 1997; Casarett y Klaassen, 2008; Gochfeld, 2003).

-Vía gastrointestinal: el tracto digestivo absorbe del 95% al 100% del mercurio orgánico (Gochfeld, 2003; Casarett y Klaassen, 2008). El mercurio inorgánico presenta una absorción entre 7% y el 15%, mientras que el mercurio elemental solo presenta una absorción del 0.01%. Este último compuesto no es reactivo biológicamente, por lo que puede provocar una pequeña o casi nula consecuencia tóxica (Casarett y Klaassen, 2008).

Tabla 2. Medios de absorción de las especies de mercurio (Modificado de Gochfeld, 2003).

	Mercurio Elemental (Hg⁰)	Mercurio iónico/sales de mercurio (Hgi)	Mercurio orgánico
Cutánea (piel)	Insignificante	insignificante	Moderada a alta
Respiratoria (pulmones)	Casi completa (80%)	Variable	Casi completa
Gastrointestinal (tracto digestivo)	Insignificante (0.01%)	Variable (7-15%)	Casi completa (95-100%)

El mercurio entra al cuerpo por la sangre, con una relación glóbulo rojo/plasma entre 1.5 a 3, y de 0.4 para las sales inorgánicas del mercurio. El 50% del mercurio inorgánico se transporta al unirse con la albúmina, en tanto que el 90% de los compuestos orgánicos son transportados por las células rojas (Casarett y Klaassen, 2008; Ramírez, 2008). Las distintas especies de mercurio se unen o depositan en diferentes partes del organismo. La mayoría de los vapores de mercurio, antes de oxidarse, atraviesan las barreras hemato-encefálica y de la placenta (Casarett y Klaassen, 2008). Al oxidarse se transforma en mercurio divalente, el cual se bioacumula en los tejidos por su gran afinidad a los grupos -SH de las proteínas (Ramírez, 2008). La mayor concentración de mercurio inorgánico se deposita en el riñón a través de dos rutas: 1) por la membrana basolateral a través de transportadores aniónicos orgánicos; y 2) por las membranas lumbales en los túbulos proximales renales en forma de conjugados cisteína-SHg-S-cisteína (Casarett y Klaassen, 2008). El 10% de metilmercurio es distribuido al cerebro, mientras que el 5% permanece en la sangre (Ramírez, 2008). También tiende a acumularse en el cabello, uñas y hueso (Casarett y Klaassen, 2008). La cantidad de mercurio natural en el cuerpo humano está entre 1 a 13 mg, se distribuye en el cuerpo de la siguiente manera: 44 a 54% en músculo, 22% en hígado, de 9 a 15% en sangre, 9% en riñón, 8% en piel, 4 a 7% en el cerebro y 3% en intestino (Ramírez, 2008; Casarett y Klaassen, 2008).

II.1.4 Biotransformación del mercurio

El mercurio se biotransforma por cuatro vías:

-Oxidación: Al oxidarse, el vapor de mercurio se convierte en mercurio divalente, es oxidado por la enzima hidrógeno-peróxido-catalasa en los peroxisomas de la mayoría de los tejidos y en los eritrocitos (Ramírez, 2008; Casarett y Klaassen, 2008). Esta reacción disminuye la liposolubilidad del mercurio y por tanto su toxicidad. También el mercurio elemental es oxidado a mercurio inorgánico por los eritrocitos y los tejidos (Casarett y Klaassen, 2008).

-Reducción: El mercurio divalente es reducido a mercurio metálico, por medio del sistema enzimático xantina-oxidasa.

-Metilación: Se ha observado en ratas, que entre 0.05 y 0.26% del mercurio inorgánico se metila, posiblemente en el hígado.

-Conversión: el proceso de biodesmetilación (conversión del metilmercurio en mercurio inorgánico) se realiza en varios tejidos, pero es en el hígado donde se lleva a cabo en mayor proporción (Ramírez, 2008).

-Eliminación. El 10% del mercurio inhalado, por una semana, es convertido en mercurio inorgánico, el cual es excretado por la orina y las heces, con una vida media de 1 a 2 meses. Las sales inorgánicas de mercurio también son excretadas por la orina y las heces, con una vida media de aproximadamente 2 meses. El mercurio elemental y las sales de mercurio también pueden ser excretados por la saliva y el sudor. En el caso del metilmercurio, la microflora del intestino lentamente lo metaboliza a mercurio inorgánico y se elimina del cuerpo un 90% en las heces y un 10% en la orina, con una vida media de 45-70 días (Casarett y Klaassen, 2008).

II.1.5 Efectos tóxicos del mercurio

Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* muestran evidencias en que los metales pesados, tales como el mercurio, el aluminio, el cadmio y el níquel, entre otros, son de gran riesgo para la salud (Jaishankar *et al.*, 2014). Los efectos tóxicos de los metales son muy perjudiciales para el funcionamiento de los tejidos del organismo, pueden actuar como un pseudoelemento del cuerpo e interferir con los procesos metabólicos (Jaishankar *et al.*, 2014). El nivel de toxicidad del mercurio y de otros metales pesados depende de la forma química, la dosis absorbida, la vía de exposición, la duración de la exposición y la vulnerabilidad del organismo expuesto (PNUMA, 2002; Jaishankar *et al.*, 2014). Esto puede conducir a diversos trastornos y dar lugar a un daño excesivo debido al estrés oxidante provocado por la formación de radicales libres o especies de reactivas oxígeno (ROS) (Jaishankar *et al.*, 2014).

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado al mercurio y a sus componentes inorgánicos en el grupo 3 “No clasificable como cancerígeno para los seres humanos” y a los compuestos orgánicos del mercurio, en particular el metilmercurio, en el grupo 2 B “posibles carcinógenos humanos” (IARC, 2016). La Organización Mundial de la Salud (OMS) refiere que las sales de mercurio inorgánicas provocan efectos adversos sobre la piel, ojos y el tracto digestivo. El mercurio elemental y el metilmercurio afectan los sistemas respiratorio, inmune, digestivo y nervioso. Las consecuencias del mercurio sobre el sistema nervioso se caracteriza por temblores, pérdida de la memoria, cambios en el sistema neuromuscular y dolores de cabeza (OMS, 2017).

II.1.6 Efectos tóxicos del mercurio en el sistema reproductor femenino

Mujeres expuestas a niveles altos de mercurio presentan cambios en el ciclo menstrual y una disminución en la fertilidad (De Rosis *et al.*, 1985; Sikorski *et al.*, 1987; Rowland *et al.*, 1994). Para el caso de animales, se ha reportado que ratones expuestos a altas concentraciones de mercurio presentan cambios morfológico en el cuerpo lúteo (Davis *et al.*, 2001) así como en su ciclo estral (Stadnicka, 1980; Davis *et al.*, 2001). Se ha observado también que la exposición a mercurio presenta daños en la función del ovario afectando la calidad y la viabilidad del ovocito en ratones (Shen *et al.*, 2000), tal como

cambios histopatológicos en el ovario de *Channa punctatus* (Dey y Bhattacharya, 1989). Además se ha evidenciado que, exposiciones de metilmercurio, causa una disminución de la hormona luteinizante en ratas (Oliveira *et al.* 2006). De igual forma, hámsteres expuestos a compuestos inorgánicos de mercurio presentan alteraciones en la ovulación (Lamperti y Printz, 1973; Watanabe *et al.*, 1982). Finalmente en macacos hembra se presentó un descenso en las tasas de embarazo y un aumento en las tasas de aborto (Mottet *et al.*, 1985).

II.1.7 Mecanismos de acción del mercurio

El mercurio entra a la célula a través de la membrana plasmática por medio de la formación de un complejo metilmercurio-cisteína o con la ayuda de proteínas de transporte de aminoácidos neutros (Hassett-Sipple *et al.*, 1997; Crespo-López *et al.*, 2009). Dentro de la célula, tiene la capacidad de destruir los microtúbulos, causar daño mitocondrial, peroxidación de lípidos, degeneración y necrosis celular, así como incrementar los niveles de moléculas neurotóxicas como la serotonina, aspartato y glutamato; pudiendo llegar a causar alteraciones en el potencial de la membrana y perturbaciones en la homeostasis del calcio intracelular (Jaishankar, 2014).

El mercurio tiene la capacidad de inhibir las actividad de las proteínas por su afinidad a los grupos -SH y en menor grado a grupos carboxilo, hidroxilo, selenohidrido y fosforilo (Español, 2001). El mercurio puede deteriorar la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas, alterando así su función celular (Jaishankar *et al.*, 2014). También inhibe la actividad de las enzimas como las catalasas plasmáticas, colinesterasa globular, glutation-reductasa globular, glutation-reductasa cerebral, galactoxidasa, dopa-decarboxilasa, monoamino-oxidasa, glicero fosfatasa, succino-deshidrogenasa, di y trifosfo-piridín-nucleótido (Ramírez, 2008).

El mercurio desencadena muchas otras consecuencias como disminución de la producción energética celular y la actividad mitocondrial por inhibición de la síntesis de proteínas estructurales. También disminuye la actividad de las fosfatasa alcalinas en las células tubulares proximales del riñón, en el cerebro y en los neutrofilos. Puede perturbar los sistemas de transporte del túbulo proximal (transporte de potasio y ATPasa

de membrana). Además, disminuye el transporte activo de azúcares, aminoácidos y precursores de ácidos nucleicos, lo que provoca la muerte celular (Español, 2001).

El mercurio, de forma indirecta, afecta el huso mitótico al unirse a los grupos -SH de las proteínas que constituyen a los microtúbulos, la tubulina, así como la cinesina en la segregación cromosómica. Al unirse a estos grupos impide la unión de trifosfato de guanosina y, por lo tanto, bloquea la cascada bioquímica responsable del funcionamiento celular. El mercurio, es un agente genotóxico porque es capaz de inhibir la polimerización de la tubulina y disminuir la motilidad impulsada por la cinesina a los microtubulos, lo que provoca un aumento significativo de micronúcleos (Crespo-López *et al.*, 2009) (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución, excreción y toxicidad de los compuestos de mercurio. (Modificado de Jaishankar, 2014).

	Mercurio elemental	Mercurio iónico/sales de mercurio (Hgi)	Mercurio orgánico (metilmercurio)
Distribución	Distribuido en todo el cuerpo, lipófilo, atraviesa las barreras hematoencefálica y placentaria, se acumula en el cerebro y el riñón.	No atraviesa la barrera hematoencefálica o placentaria, presente en neonatos cerebrales, se acumula en el riñón.	Distribuido por todo el cuerpo, lipófilo, atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica y la placentaria, se acumula en el riñón y el cerebro
Excreción	Sudor, orina, heces y saliva.	Sudor, saliva, orina y heces.	90% excretado en bilis, heces, 10% en orina.
Toxicidad	Oxidación a mercurio inorgánico.	Unión a tioles en enzimas y proteínas estructurales.	Desmetilación a mercurio inorgánico, generación de radicales libres, unión a tioles en enzimas y proteínas estructurales.

Se sugiere que el mercurio afecta los mecanismos de reparación del DNA por escisión de bases, interfiriendo en la estructura de los dedos de zinc (un átomo de zinc y cuatro cisteínas), así como en su actividad (Crespo-López *et al.*, 2009; Nersesyan *et al.*, 2016). De forma indirecta, el mercurio puede inhibir a la DNA polimerasa por aumento de la producción de radicales libres. El estrés oxidativo (generación de radicales libres) es uno de los mecanismos de acción más comúnmente propuestos para la acción genotóxica del mercurio y de los metales pesados. Los principales tipos de radicales libres son las ROS, como el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo, el radical alquilo, el radical peroxilo y el óxido nítrico. El mercurio y sus compuestos aumentan los niveles de ROS, provocando daño genotóxico (Crespo-López *et al.*, 2009) (Figura 2). Las ROS, en su estructura atómica, presentan un electrón desapareado en el orbital externo, lo que les brinda una configuración espacial altamente inestable y reactiva. Esto ocasiona que presenten una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente a una gran diversidad de moléculas integrantes de la estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos, lo cual conlleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos que ocasionan el deterioro y la muerte celular (Rodríguez-Perón *et al.*, 2001; Venereo-Gutiérrez, 2002).

El mercurio puede tener una interacción directa con las moléculas de DNA. Se ha demostrado que las especies de mercurio se coordinan covalentemente con el átomo de nitrógeno de las bases nitrogenadas del DNA. Las especies orgánicas del mercurio son las que presentan más afinidad hacia el DNA. Se detectó que las especies de mercurio interactúan con las bases nitrogenadas formando los aductos de guanina-metilmercurio, citosina-metilmercurio y citosina-etil-mercurio (Crespo-López *et al.*, 2009).

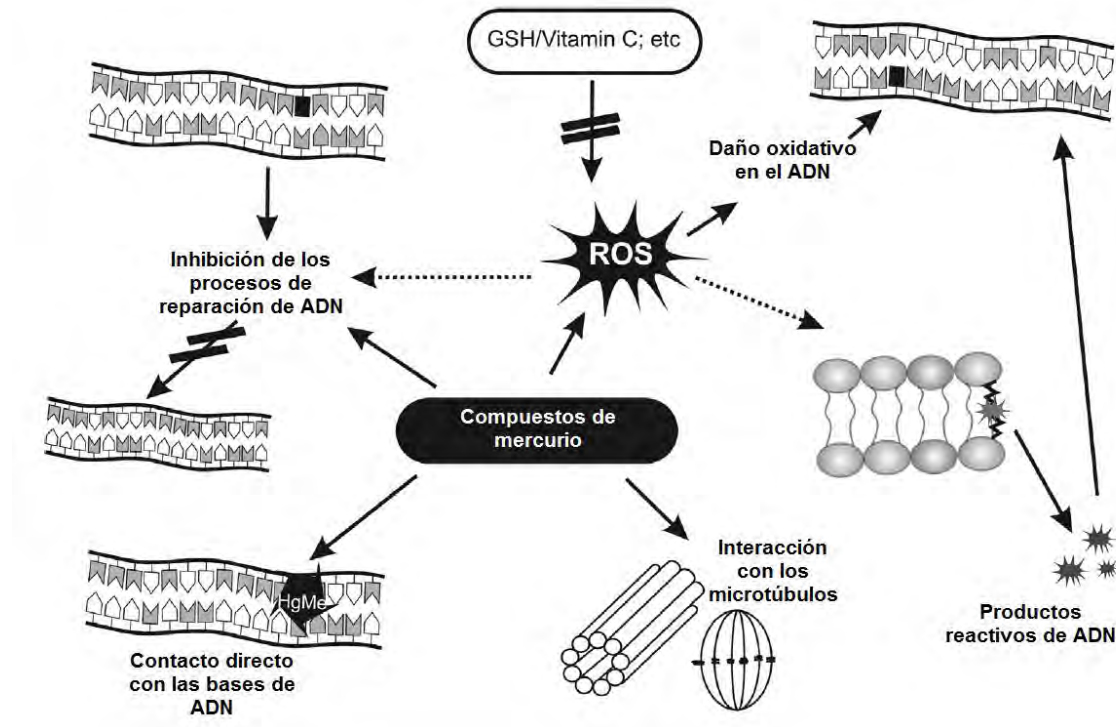


Figura 2. Mecanismos genotóxicos del mercurio (modificado de Nersesyan *et al.*, 2016).

II.2 *Drosophila melanogaster* como modelo biológico

El objetivo de la toxicología es identificar y caracterizar los mecanismos de acción de los xenobióticos, los cuales inducen efectos adversos en los organismos. El uso de modelos biológicos, tales como el ratón (*Mus musculus*), el nemátodo (*Caenorhabditis elegans*), el pez cebra (*Danio rerio*) y la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) son útiles para caracterizar e identificar los mecanismos de acción de estas sustancias tóxicas (Rand, 2010).

D. melanogaster es una especie que pertenece a la familia Drosophilidae (O'Grady y Markow, 2009). Es un insecto cosmopolita, que posee cuatro etapas de desarrollo: embrionario, larvario, pupa y adulto. Es denominado como un insecto holometábolo por poseer una metamorfosis completa (Tyler, 2000). Las ventajas que posee *D. melanogaster* como modelo de estudio biológico incluyen un ciclo de vida corto (10 días a 25°C), una reproducción rápida (se obtiene un gran número de organismos en un

espacio reducido), es de fácil manejo y pueden llevarse a cabo experimentos *in vivo*. Además, es un modelo muy conocido y trabajado en el campo de la genética desde los principios del siglo XX principalmente por Dr. Thomas Hunt Morgan en la Universidad de Columbia, Nueva York (Pierce, 2009; Santalla *et al.*, 2016; Rodríguez, 2003). Además, las diferentes etapas del ciclo de vida de *D. melanogaster*, su genoma, el transcriptoma y el proteoma están bien caracterizados. Debido a la gran similitud que presentan sus genes con los de los mamíferos, se ha utilizado a esta especie de mosca como modelo para el estudio de enfermedades cardiovascuales, neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson) y neuromotoras (Hirth, 2010), trastornos inflamatorios, diabetes y cáncer (Rudrapatna *et al.*, 2012; Pandey y Nichols, 2011). Con el uso de *D. melanogaster* como modelo se han definido muchos de los conceptos básicos de la genética clásica, la molecular y la evolutiva (Rodríguez, 2003).

Por su fácil manipulación genética e identificación de fenotipos, *D. melanogaster*, es el modelo ideal para los ensayos toxicológicos. *D. melanogaster* se ha utilizado para evaluar los efectos adversos de contaminantes ambientales como metales pesados (mercurio, arsénico y plomo) y productos químicos (como herbicidas, plaguicidas y fármacos), mediante análisis de letalidad, cambios en la morfología (por ejemplo en el ojo o el ala) y alteraciones en el comportamiento locomotor, geotaxis, fototaxis o quimiotaxis (Rand, 2010). *D. melanogaster* es un modelo muy utilizado para estudiar los diversos efectos tóxicos de los metales pesados. Los ensayos que se han llevado a cabo están relacionados con alteraciones en el comportamiento y el desarrollo, disminución de la supervivencia, bioacumulación, neurogeneración, mutagenicidad, cambios en la fertilidad e inducción de especies reactivas de oxígeno. La tabla en el anexo 1 enlista evaluaciones de la toxicidad de los metales pesados que se han reportado utilizando como modelo biológico a *D. melanogaster*.

II.2.1 Ciclo de vida

D. melanogaster, como se mencionó anteriormente, posee un desarrollo que está constituido por varios estadios, la duración de estos depende de la temperatura; a 20°C se completa el ciclo de vida en 15 días, mientras a 25°C se requieren 10 días (Demerec y Kaufmann, 2005; Solomon *et al.*, 2008) (Figura 3). Las hembras de *D. melanogaster* alcanzan mayor producción de huevos (50 a 70 huevos por día), entre el cuarto y séptimo día después de su etapa pupal (Tyler, 2000). El huevo maduro mide aproximadamente 0.5 mm de largo, su lado dorsal es aplanado, mientras la parte ventral es un tanto redondeada. El huevo está cubierto por una membrana opaca, el corion, que tiene un patrón de marcas hexagonales. Del lado anterodorsal se proyectan dos filamentos, los apéndices dorsales, los cuales son estructuras de sostén (Demerec y Kaufmann, 2005) y permiten el intercambio gaseoso (Tyler, 2000). En la parte anterior se localiza el micrópilo, una pequeña abertura que permite la entrada de los espermatozoides al huevo (Demerec y Kaufmann, 2005). Por tanto, la fecundación de los huevos maduros es interna. Después de la fusión de los núcleos de los gametos (el espermatozoide y el ovocito) da comienzo a la embriogénesis y el cigoto se desarrolla hasta el estadio larvario (Solomon *et al.*, 2008; Wolpert, 2009). La larva es un organismo con forma de gusano que puede alcanzar una longitud de 4.5 milímetros, es activa y sexualmente inmadura. El periodo larval consta de tres estadios y dos mudas o recambios de la cutícula; como resultado de cada muda hay un aumento de tamaño (Solomon *et al.*, 2008; Demerec y Kaufmann, 2005; Tyler, 2000).

En la etapa pupal, la larva de tercer estadio se desplaza a una superficie seca para pupar (Demerec y Kaufmann, 2005). Esta etapa es estacionaria y en las primeras fases es de color blanco amarillento (Tyler, 2000), pero posteriormente se endurece y oscurece (Demerec y Kaufmann, 2005). En este periodo el insecto presenta metamorfosis, casi todos los tejidos larvarios se degeneran (Solomon *et al.*, 2008) excepto los túbulos de Malpigi, las gónadas y el sistema nervioso; este último se reestructura. Los discos imaginales, que son paquetes de células epiteliales que crecen por mitosis durante las etapas larvianas y se distribuyen a lo largo de la larva, 9 pares de discos bilaterales se diferencian en la epidermis de la cabeza, el tórax y las extremidades de la mosca, de un disco medial provienen los genitales. Por su parte, los histoblastos abdominales,

pequeños grupos de células, forman la epidermis abdominal y los órganos internos (Tyler, 2000; Aldaz y Escudero, 2010).

La mosca adulta sale del extremo anterior de la envoltura pupal, cuando todos los cambios se han completado. En un inicio la mosca es alargada y las alas no se encuentran expandidas, pero posteriormente estas se extenderán (Demerec y Kaufmann, 2005).

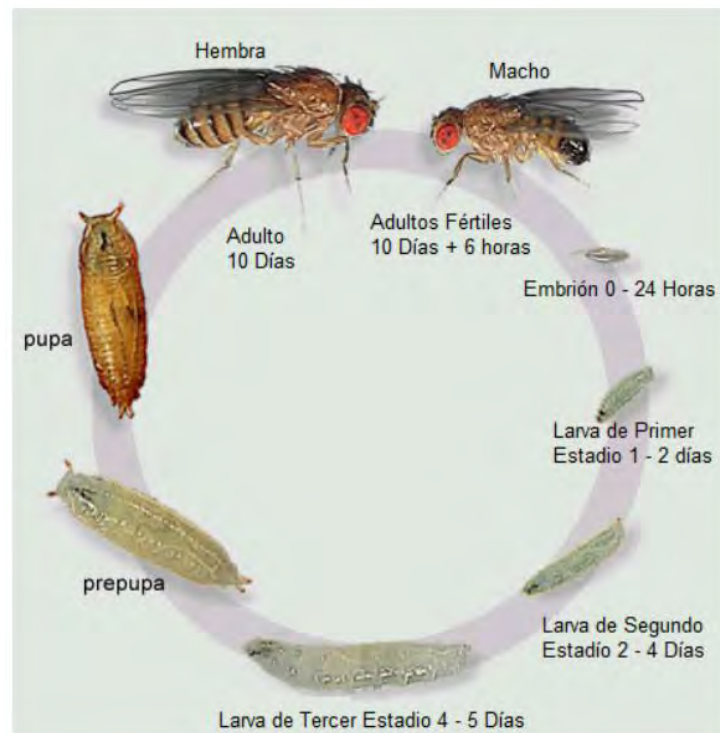


Figura 3. Ciclo de vida de *D. melanogaster* está formado por cuatro etapas; embrionario, larvario (con tres estadios), pupación y adulto (Tyler, 2000) a 25°C el ciclo se completa en 10 días (tomada de Laván-Quiroz, 2012).

II.2.2 Sistema reproductor de *D. melanogaster*: ovarios

D. melanogaster posee un sistema reproductor femenino muy similar al ser humano (Figura 4), presenta dos ovarios y dos oviductos laterales, conectados a un conducto común, el útero (Miller, 1950 citado en Swevers *et al.*, 2005). El ovario está compuesto por 16-20 unidades llamadas ovariolas, las cuales están compuestas de cámaras progresivas en desarrollo (Máthé, 2004) (Figura 5). En la parte más distal de la ovariola, con relación al útero, se encuentra el germario que se divide en tres regiones. En la región 1 contiene células germinales, algunas de estas células están en mitosis y en diferenciación; en la región 2 A-B se encuentra un conjunto de 16 células germinales conectadas entre sí, el quiste, que será rodeado por células foliculares para formar una cámara de huevo en la región 3 (Robinson *et al.*, 1994 citado en Swevers, *et al.*, 2005). Después del germanio se encuentra el vitelario en donde seguirá desarrollándose la cámara de huevo hasta ser un huevo maduro. El sistema reproductor femenino de la mosca *D. melanogaster* también posee estructuras accesorias: un receptáculo seminal, dos glándulas accesorias y dos espermatecas (Máthé, 2004).

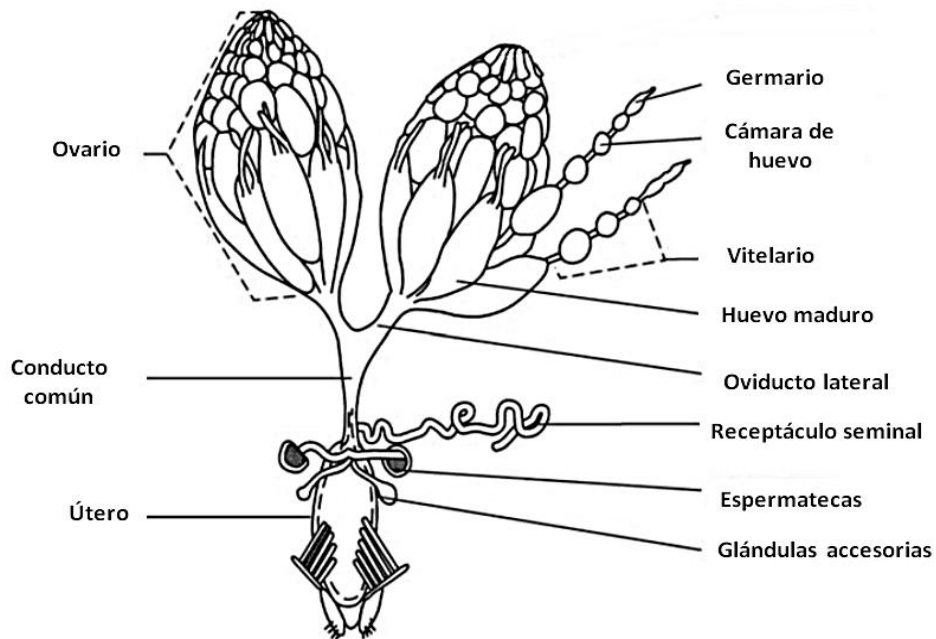


Figura 4. Sistema reproductor de *D. melanogaster* (modificado de Swevers *et al.*, 2005).

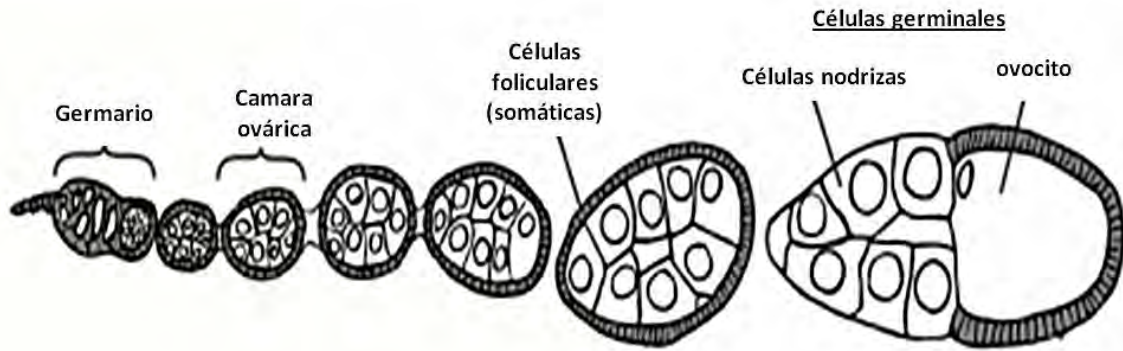


Figura 5. Ovariola y sus componentes (modificada de Olovnikov y Kalmykova, 2013).

II.2.3 Ovogénesis

La ovogénesis en *D. melanogaster* está dividida con base a criterios morfológicos en 14 etapas (Bastock y Johnston, 2008).

Etapa 1

Formación de la cámara

En el extremo anterior de la ovariola se encuentra el germario, una estructura que contiene las células madre somáticas y de línea germinal. En la parte anterior del germario, cerca del filamento terminal, se hallan entre dos a tres células germinales unidas por medio de uniones adherentes a las células cap, células somáticas que se encargan en el mantenimiento y división de las células germinales. Las células cap producen el ligando BMP (*Bone Morphogenetic Protein*), el cual activa los receptores de las células de línea germinal, esto causa la supresión de la transcripción del gen *Bag of marbles (bam)*. Las células germinal hijas que no tienen contacto con las células cap y no reciben esta señal, producen la proteína Bam, lo que provoca su diferenciación en cistoblastos. El cistoblasto se divide mitóticamente cuatro veces para dar lugar a un grupo de 16 células, cistoquistes, conectadas por medio de canales con anillo de actina, resultado de una citocinesis incompleta (Bastock y Johnston, 2008). A este grupo germinal se le denomina quiste (Wolpert, 2009).

Cuando los cistoblastos se dividen, dentro de estos, se forma una estructura ramificada rica en espectrina, llamada fusoma, la cual se desarrolla asimétricamente. Esta

estructura crece desde el huso de una de las primeras células de la primera división y atraviesa los canales anulares de las células (Gilbert, 2005). El fusoma controla la orientación de las divisiones, provocando que el quiste contenga 8 células con un solo anillo, 4 células con dos anillos, 2 células con tres anillos y 2 células con 4 anillos (Bastock y Johnston, 2008). La célula del quiste que contenga la mayor cantidad del fusoma se diferenciará en ovocito e iniciará la primera división meiótica (Gilbert, 2005). El primer arresto del ovocito se presenta en diploteno de la profase I en la región 2A en el germario hasta la etapa 5 del desarrollo de las cámaras ováricas, ante esto sus cromosomas se condensan en un pequeño cariosoma. (Gilbert, 2005; Von-Stetina y Orr-Weaver, 2011). En la etapa 13 se vuelve a reanudar la meiosis y progresa a metafase I. En la etapa 14 se presenta un segundo arresto, los cromosomas se agrupan en una estructura de DNA “forma de limón” (Von-Stetina y Orr-Weaver, 2011). El embrión se mantiene así hasta ser activado de nuevo. A diferencia de los mamíferos, donde la activación depende de la fertilización de huevo, en la mosca la activación del ovocito es una consecuencia de las presiones mecánicas que sufre el gameto durante su paso por el oviducto (Mahowald *et al.*, 1983). El resto de las células se convertirán en células nodrizas con capacidad endoreplicadora (es decir, con mitosis incompletas). Este tipo de células presentan un metabolismo muy activo con el objetivo de sintetizar tanto RNAs (ácidos ribonucleicos) ribosómicos y mensajeros, como proteínas que se transportarán hacia el futuro ovocito. Como consecuencia de la endoreplicación se forman células con núcleos gigantes, con 512 cromosomas (Gilbert, 2005; Spradling, 1993 citado en Cuevas, 2006). Por otro lado, las células de línea somática o células foliculares, forman una capa alrededor del quiste que permite el desarrollo de la cámara ovárica (Wolpert, 2009) y la salida del germario, para terminar la etapa 1.

Etapas 2-7

Después de que sale la cámara ovárica del germario, comienza a aumentar de volumen antes de que inicie la vitelogénesis (acumulación de vitelo en el ovocito) en la etapa 8, el citoplasma aumenta considerablemente tanto en el ovocito como en las células nodrizas (Spradling, 1993 citado en Cuevas, 2006). Por otro lado, la cámara ovárica antes de salir del germanio se cubre de 80 células foliculares, las cuales seguirán dividiéndose para conservar una monocapa debido a que el quiste aumenta de tamaño. En la etapa 7 las células foliculares dejan de dividirse, siendo un total de 1000 células

que rodean el quiste para llevar a cabo tres endociclos (Spradling, 1993 citado en Cuevas, 2006; Drummond-Barbosa y Spradling, 2001) que son inducidos por la vía de señalización Notch-Delta (Deng *et al.*, 2001).

Polarización del ovocito

Las células foliculares tienen un papel importante en el establecimiento del patrón de los ejes del ovocito. Al inicio de la ovogénesis, el ovocito se encuentra en una posición central, rodeado de las células nodrizas. Poco tiempo después, el ovocito se mueve a la parte posterior de la cámara y gracias a la expresión de la E-cadherina tiene contacto directo con las células foliculares. La polarización de la cámara ovárica, inicia desde que esta sale del germario (Wolpert, 2009).

Una vez el ovocito en contacto con las células foliculares, la proteína Gurken se encargará de continuar con la polarización anteroposterior. El mRNA de Gurken es traducido en la parte posterior del ovocito en etapas tempranas del desarrollo. La proteína Gurken es secretada a través de la membrana del ovocito para estimular a los receptores torpedo de tipo tirosina-cinasa de las células foliculares. La señalización de Gurken da como resultado que las células foliculares emitan una señal que inducirá la re-polarización de los microtúbulos del citoesqueleto del ovocito. Lo anterior permitirá que los mRNA de *bicoid* y *oscar* secretados por las células nodrizas se acumulen en el ovocito (Wolpert, 2009).

Etapa 8-14

En estas etapas se lleva a cabo la vitelogénesis y la formación del corion, concluyendo así la ovogénesis.

Vitelogénesis

La ovogénesis es altamente regulada y ejemplo de este proceso se puede ver durante la etapa 8, donde se encuentra un punto de control metabólico que da paso a las siguientes etapas del desarrollo de la cámara ovárica o provoca su destrucción por medio de apoptosis. Esto dependerá si la cámara ovárica presenta alteraciones morfológicas o si existen malas condiciones ambientales para las hembras como la falta de alimento

(Drummond-Barbosa y Spradling, 2001; Jenkins *et al.*, 2013; Mazzalupo y Cooley, 2006). Si las cámaras ováricas se encuentran sanas y en condiciones ambientales favorables darán inicio a la vitelogénesis. La entrada del vitelo al ovocito comienza a finales de la etapa 8 y en la etapa 10A este ocupa la mitad del volumen de la cámara ovárica (Hudson y Cooley, 2014). Posteriormente, en la etapa 10B, las células nodrizas se preparan para llevar a cabo la transferencia de su citoplasma al ovocito en presencia de prostaglandinas, y en la etapa 11 producen filamentos de actina unipolares que servirán como red para evitar que los núcleos de las células nodrizas bloqueen los canales de actina o pasen al ovocito (Tootle y Spradling, 2008; Huelsmann *et al.*, 2013). Después de transferir su citoplasma al ovocito las células nodrizas mueren por apoptosis (Jenkins *et al.*, 2013).

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 (González-Reyes y Johnston, 1998) mediante la activación de la vía JAK/STAT (Beccari *et al.*, 2002; Silver *et al.*, 2005), y son guiadas por el factor de crecimiento PVR producido por el ovocito (Duchek *et al.*, 2001). En la etapa 10, las células del borde se encontraran en la parte anterior del ovocito (Silver *et al.*, 2005), mientras las células que se localizan en las partes dorsal y ventral de la cámara inician a migrar de forma centrípeta para cubrir al ovocito y separarlo de las células nodrizas en la etapa 11 (Hudson y Cooley, 2014). Las células del borde, posteriormente, forman el micrópilo, el cual permite la entrada de los espermatozoides para la fecundación del ovocito (Silver *et al.*, 2005) y un grupo de 65 a 80 células foliculares de la parte anterior de la cámara ovárica forman los apéndices dorsales (Peters *et al.*, 2013).

Coriongénesis

La coriongénesis es la formación de la capa que cubre y da protección al ovocito maduro, a la cual se le conoce como corion. Las células foliculares, en la etapa 9, producen proteínas de la membrana vitelina hasta la etapa 11 donde comienzan a sintetizar y segregar proteínas de corion, por amplificación sincrónica de dos grupos de genes de corion, la cual es mediada por la señal *Notch* y la activación del receptor de ecdisona (Sun *et al.*, 2008) e inicia en la etapa 9 y alcanza su máximo nivel de expresión en la etapa 13 (Orr-Weaver y Spradling, 1986; Orr-Weaver, 1991; Calvi *et al.*, 1998).

La proteína de corion deja de sintetizarse hacia la etapa 14 (Orr-Weaver, 1991), cuando el huevo está completo y listo para ser ovipositado por la hembra (Drummond-Barbosa y Spradling, 2001).

II.3 Biomarcadores

Se define como biomarcador a la variación medible, ya sea bioquímica, molecular, celular o estructural, que pueda presentar un organismo al estar expuesto a un agente tóxico de naturaleza química, física o biológica. Estas variaciones pueden evidenciar la posibilidad de efectos adversos (Toro-Restrepo, 2011; Arango y Sandra, 2012). Para su evaluación se debe tener en consideración: la dosis, la vía de contacto, la duración y la frecuencia de exposición al agente (Arango y Sandra, 2012). Los biomarcadores se emplean en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* (Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo, 2007) y se clasifican en tres clases:

De exposición. Evalúan en el organismo sustancias exógenas, metabolitos o productos generados de una interacción entre una célula o molécula blanco y un agente xenobiótico. Permite cuantificar un xenobiótico en el organismo. Ejemplos de estos marcadores son: aberraciones cromosómicas, micronúcleos, intercambio de cromátidas hermanas y el ensayo cometa, entre otros.

De efecto. Detectan alguna alteración fisiológica, bioquímica o de otro tipo que sea posible medir como un trastorno en el organismo asociado a una enfermedad. Marcadores biológicos de este tipo son: alteraciones en algunas actividades enzimáticas, aparición de aductos del DNA o incrementos localizados de RNA, aumento de determinadas proteínas y aparición de anticuerpos específicos contra un xenobiótico.

De susceptibilidad. Un indicador de una limitación adquirida o heredada de la capacidad de un organismo para responder a la exposición de una sustancia tóxica. Estos biomarcadores son factores genéticos: el polimorfismo genético, reparación del DNA y actividades enzimáticas o excreción de metabolitos (FAO/OMS, 2004; Jiménez y Kuhn, 2009; Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo, 2007).

Las técnicas para la evaluación de diferentes biomarcadores son variadas pudiendo encontrar técnicas microbiológicas, citogenéticas y electroforéticas, entre otras. Dentro de las electroforéticas se encuentra el ensayo cometa, el cual se describirá a continuación.

II.3.1 Ensayo cometa

Piter Cook y colaboradores en 1970 desarrollaron un método para investigar la estructura nuclear basada en la lisis de las células con detergentes no iónicos y cloruro de sodio a alta molaridad. Posteriormente Rydberg y Johanson introdujeron el uso de la electroforesis (Rodríguez-Rey, 2016). En 1984, Ostling y Johanson establecieron el concepto de electroforesis de microgel como un método para medir el daño del DNA en células individuales. Ellos suspendieron células de mamífero en un delgado gel de agarosa en un portaobjetos para ser lisadas a altas concentraciones de detergentes y sales. Posteriormente las sometieron a una electroforesis en condiciones neutras y las tiñeron con un colorante fluorescente de unión a DNA. En la electroforesis los fragmentos de DNA migran hacia el ánodo, lo que hace que se formen los cometas. Singh y colegas en 1988 adaptaron el procedimiento en condiciones alcalinas, en este las células eran sometidas a una lisis y electroforesis con pH alto (Cotelle y Ferard, 1999; Collins, 2004; Olive y Banáth, 2006). La versión alcalina ($\text{pH} > 13$) es capaz de detectar sitios lábiles álcalis, rupturas de cadena simple de DNA asociadas o no con sitios de reparación por escisión incompletos (Tice *et al.*, 2000). En 1900 Olive realizó otra versión, la cual detecta los sitios lábiles álcalis convertidos en roturas de cadena simple. La diferencia de ambas técnicas son sus valores de pH en la electroforesis, en la técnica de Singh se emplea un $\text{pH} > 13$, mientras la técnica de Olive se usa un pH de 8,3. Ambas técnicas se detectan rupturas simples y dobles de cadena de DNA, sin embargo, la de Singh detecta sitios alcalinos lábiles, por ello es el ensayo más usado (Rodríguez-Rey, 2016).

El ensayo cometa alcalina de células individuales es una técnica rápida, simple, visual y sensible que se utiliza para evaluar la genotoxicidad de xenobióticos cuantificando y analizando el daño al DNA, particularmente las rupturas de cadena sencilla, doble o en sitios álcali lábiles de células individuales (Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo, 2007; Di Giorgio *et al.*, 2001). En esta técnica, las células se sumergen en gel de

agarosa sobre un portaobjetos, se les realiza una lisis alcalina, lo que elimina la membrana celular, el citoplasma y el nucleoplasma, incluyendo nucleosomas. Posteriormente, se someten a una electroforesis, donde el DNA dañado migra hacia el ánodo produciendo una estructura similar a un cometa. La longitud, la intensidad y el momento de la cauda reflejan el daño del DNA (Di Giorgio *et al.*, 2001; Gunasekarana *et al.*, 2015). Las ventajas que tiene esta técnica son: 1) la recolección de datos a nivel celular individual que permite llevar a cabo diferentes tipos de análisis estadísticos; 2) para realizar el ensayo es necesario un pequeño número de células o tejido (<10,000); 3) el ensayo no requiere células en división celular; y 4) se aplica para cualquier célula eucarionte (Dhawan *et al.*, 2003).

Las limitaciones de este ensayo son: 1) la distribución de la muestra de las células puede que no sea heterogénea y al registrarse el resultado puede estar sesgado; 2) la muestra debe ser de células viables, si esta contiene mayormente células necróticas o apoptóticas no se puede obtener la información clara del daño del DNA ocasionado por el agente tóxico; 3) los métodos mecánicos para desagregar el tejido pueden ocasionar falsos positivos en el daño de DNA; 4) no proporciona información sobre el tamaño del fragmento de DNA debido que los fragmentos no se separan durante el corto periodo de electroforesis; y 5) durante la electroforesis, las horquillas de replicación de las células que se replican constantemente se comportan como roturas de una sola cadena de modo que el DNA migra (Olive y Banáth, 2006). El ensayo cometa ha sido utilizado para la biomonitorización, evaluación del daño inducidos al DNA por diferentes agentes genotóxicos y la reparación del DNA (Gunasekarana y Chand, 2015).

III. JUSTIFICACIÓN

Desde el inicio de la era industrial, los niveles de mercurio han aumentado considerablemente en el medio ambiente. Este agente tóxico se encuentra prácticamente en todos los ambientes del mundo, y por consiguiente también en nuestros alimentos (principalmente en el pescado) a niveles que afectan adversamente a los diferentes organismos (PNUMA, 2002). Por ejemplo, en poblaciones humanas expuestas a mercurio se ha reportado daño en el genoma de las células del sistema sanguíneo (Calao y Marrugo, 2015). Desde hace tres décadas el mercurio ha causado preocupación en la mayoría de los países desarrollados, debido a que es una sustancia con alta capacidad de transportarse en la atmósfera, por su volatilidad y larga vida de seis meses a dos años; por su bioacumulación en cadenas alimentarias acuáticas y transformarse en compuestos más tóxicos, como metilmercurio. Esta preocupación ha tenido como respuesta estrategias que comprenden investigaciones científicas, desarrollo de marcos legales, programas de reducción de las emisiones de Hg, iniciativas de recolección y reciclaje de productos con contenido de mercurio. Aún con estas medidas el mercurio continúa teniendo una importante oferta en el mercado mundial y el metal tiende a venderse en países en desarrollo donde se utiliza en la extracción artesanal de oro o en usos no esenciales (Castro, 2011). México ha sido productor de mercurio desde 1891 y lo utiliza para la producción de cloro, fabricación de lámparas, amalgamas e instrumentos, pero no ha definido el marco normativo específico para su manejo (Ramírez *et al.*, 2004) lo cual representa un riesgo potencial para la salud humana y animal. Diversos estudios han relacionado la exposición a los metales con el daño en el DNA y el desarrollo de enfermedades. Se conoce que el mercurio y sus compuestos son sustancias sumamente tóxicas y sus efectos deben ser estudiados detenidamente (PNUMA, 2002). Se ha observado en estudios que los efectos del mercurio a altas concentraciones en el sistema reproductor de los animales ocasiona efectos negativos; abortos espontáneos, infertilidad, desorden en el ciclo menstrual, inhibición de la ovulación y malformaciones congénitas (Schuurs, 1999). Para el HgCl_2 se han reportado cambios en el ciclo estral, alteraciones hormonales y cambios histológicos (Lamperti y Printz, 1973; Stadnicka 1980). Por lo tanto, es necesario llevar a cabo estudios *in vivo* de genotoxicidad y morfológicos del HgCl_2 en sistemas reproductores mediante el uso de modelos biológicos para poder elucidar algunos mecanismos moleculares implicados en las alteraciones de la fertilidad.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo general

Analizar el efecto genotóxico y morfológico en ovarios de *D. melanogaster* expuestos a HgCl₂.

IV.2 Objetivos particulares

-Evaluar y comparar el daño del DNA mediante el ensayo cometa de las células del ovario de *D. melanogaster* expuestas a HgCl₂ a las concentraciones 0.1, 0.3, 3 y 30 mM de HgCl₂ por 24, 48 y 72 h con relación al grupo testigo.

-Medir y contrastar el área de los ovarios expuesto a las concentraciones HgCl₂ 0.3, 3 y 30 mM por 24, 48 y 72 h con relación al grupo testigo.

V. HIPÓTESIS

Se ha evidenciado que el mercurio es un agente genotóxico con la capacidad de afectar el sistema reproductor de varios organismos. Por lo tanto, se espera que el mercurio será capaz de tener un efecto genotóxico y morfológico en los ovarios de *D. melanogaster* así como en las células ováricas.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Cultivo de moscas

Las moscas de fruta (*D. melanogaster*) silvestres CANTON, fueron donadas por el Dr. Kevin Legent, del Instituto Jacques Monod en Paris, Francia. Estas se mantuvieron a 25 °C en botellas con alimento preparado (medio de cultivo), con los ingredientes que se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Cantidades de los componentes para preparar 370 ml de medio de cultivo para el mantenimiento en cautiverio de *D. melanogaster*.

Componentes del medio del cultivo	Gramos para 370 ml
Agar	3 gr.
Sacarosa	25 gr.
Harina de trigo	16 gr.
Levadura	11.5 gr.
Tegosept	2 ml
Ácido propanoico	2 ml

VI.2 Producto químico de prueba

El mercurio usado para los experimentos fue en su forma de HgCl₂ en una solución saturada, comprado en REACTIVOS QUIMICA MEYER (Ciudad de México). El HgCl₂ es un líquido claro y libre de materia suspendida $\geq 6.5\%$ p/v.

VI.3 Exposición a mercurio

Grupos de hembras vírgenes de *D. melanogaster* fueron alimentadas con una mezcla de levadura y HgCl₂ a diferentes concentraciones y tiempos como se muestra en la Tabla 5. Como testigo las moscas se expusieron a agua desionizada.

Tabla 5 Tratamientos y tiempos de los grupos de *D. melanogaster*.

Análisis	Tratamientos (HgCl ₂)	Nº de individuos por tratamiento	Tiempo de exposición
Genotóxico*	0.1mM, 0.3mM, 3 mM y 30 mM	8 Hembras	24, 48 y 72 h
Morfológico	0.3 mM, 3 mM, 30 mM	5 hembras	24, 48 y 72 h

*Se llevaron a cabo tres repeticiones independientes.

VI.4 Obtención de muestra

Para la obtención de los ovarios de cada tratamiento y tiempo de exposición, las moscas fueron sumergidas en buffer fosfato salino (PBS) para ser diseccionadas como se muestra en la Figura 6. La mosca es sujeta con una pinza por el tórax o por la parte anterior del abdomen y con otras pinzas se pellizca suavemente la parte media del abdomen para hacer una pequeña abertura, posteriormente se toma la parte posterior del abdomen y se jala lentamente para liberar los intestinos y los ovarios. Con ambas pinzas se limpian cuidadosamente los ovarios para quitar los demás tejidos (Manning y Starz-Gaiano, 2015). Para el análisis genotóxico, por cada tratamiento se obtuvo un total de 16 ovarios, los cuales se colocaron en tubos con 40 µl de PBS, posteriormente, con 15 pipeteos se liberaron las células. Para el análisis morfológico se obtuvo un total de 10 ovarios por tratamiento, se mantuvieron en PBS para evitar la degradación del tejido.

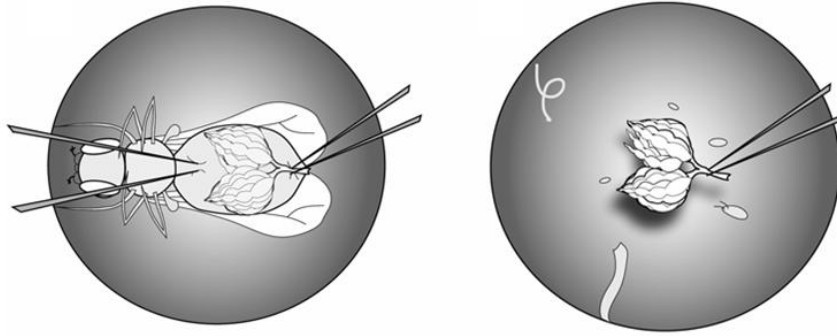


Figura 6. Disección para la obtención de ovario (modificada de Manning y Starz-Gaiano, 2015).

VI.5 Medición de los ovarios

Se midió el largo y ancho de 10 ovarios de cada tratamiento: 0, 0.3, 3 y 30 mM de HgCl₂. Se obtuvieron las áreas de cada ovario para calcular la media \pm el error estándar de la media (SEM) de cada tratamiento. Así mismo, los datos se analizaron con las pruebas de ANOVA y de comparación múltiple de Newman-Keuls con el software GraphPad Prism 5, para identificar las diferencias significativas ($P < 0.05$) al comparar los valores promedio (medias) de las áreas de los grupos de moscas expuestos y no expuestos al cloruro de mercurio.

VI.6 Ensayo cometa alcalino

Preparación de geles con tejido ovárico de *D. melanogaster*

Para la preparación de los geles se realizó una mezcla de 16 ovarios suspendidos en 40 μ l de PBS (con o sin tratamiento) en 200 μ l de agarosa de punto de fusión bajo (LMPA) al 0.5%, se mezcló hasta homogeneizar y se colocaron 100 μ L en un portaobjetos esmerilado con una monocapa de agarosa regular al 1%, se realizaron dos laminillas por tratamiento. Se dejaron solidificar a 4 °C por 3 min, posteriormente fueron sumergidos en una solución de lisis alcalina (NaCl 2.5M, EDTA 100mM y trizma base 10mM, pH 10) por 1 h para lisar las membranas celulares.

Electroforesis unicelular alcalina

Las laminillas fueron retiradas de la solución de lisis alcalina para ser colocadas en una cámara de electroforesis con amortiguador de electroforesis (NaOH 300mM y EDTA 1 mM, pH 13) por 20 min para permitir que el DNA se desenrolle. Después se realizó la electroforesis aplicando una corriente de 300 mA y un voltaje de 25v durante 20 min. Este procedimiento se llevó a cabo en completa oscuridad.

Neutralización y fijación

Fueron retirados los geles de la cámara de electroforesis para realizar 3 lavados de 5 min cada uno con amortiguador neutralizante (trizma 0.4 M, pH 7.5). Posteriormente, se sumergieron en metanol al 100% durante 3 min y se dejaron secar.

Tinción de laminillas

Las laminillas se tiñeron con 70 μ l de GelRed (4 μ g/ μ l) para ser observadas en un microscopio de fluorescencia (Nokia® Eclipse Ni-U) con el objetivo 40X. Se contaron 75 cometas por laminillas (150 cometas por concentración) y se registró la longitud, momento e intensidad de la cauda de cada cometa con el Software Comet Assay IV. La longitud de la cauda es un parámetro utilizado para analizar el daño del DNA mediante la distancia de migración (Fairbairn y O'Neill, 1995), la intensidad de la cauda (porcentaje de DNA en la cauda) es el parámetro que se relaciona con el número de rupturas del DNA (Collins, 2004) y el momento constituye el producto del porcentaje de DNA total en la cauda y la distancia entre los centros de la masa de la cabeza y la cauda [El momento de la cauda=(media de la cabeza y media de la cauda) x % de DNA en la cola] (Mozaffarieh *et al.*, 2008). En la Figura 7 y 8 se muestra un núcleo sin y con cometa respectivamente.

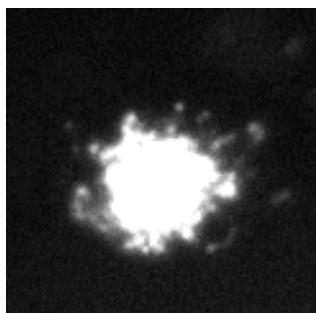


Figura 7. Núcleo sin fragmentación en el DNA (sin cometa) de células ováricas.



Figura 8. Núcleo con fragmentación en el DNA (con cometa) de células ováricas.

Análisis estadístico

Se unieron todos los datos de las tres repeticiones independientes por tratamiento para llevar a cabo un solo análisis. Para cada grupo experimental, con el software GraphPad Prism 5, se reportaron los datos de los tres parámetros genotóxicos de los ovarios como la media \pm el error estándar de la media (SEM) obtenido. Así mismo, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba post-hoc de comparación múltiple de Newman-Keuls para identificar diferencias significativas ($P < 0.05$) al comparar los valores promedio (medias) de los diferentes parámetros de los grupos de moscas expuestas y no expuestas al cloruro de mercurio. Se realizó una regresión lineal para establecer la relación de concentración-efecto para los tres parámetros genotóxicos.

VII. RESULTADOS

VII.1 Morfología de ovarios de *D. melanogaster* expuestos a HgCl₂

En la Tabla 6 se muestran los resultados de las medidas del área de los ovarios de *D. melanogaster* después de ser expuestos a las concentraciones de 0.3, 3 y 30 mM de HgCl₂ por 24, 48 y 72 h. Después de 24 y 72 h de exposición a la concentración de 3 mM de HgCl₂, los ovarios de *D. melanogaster* mostraron reducción del área, pero no hubo cambios a las 48 h de exposición al mercurio comparados con el área de los ovarios del grupo testigo. Los ovarios de *D. melanogaster* después de 24 y 48 h de exposición a 30 mM de HgCl₂ no se obtuvo reducción significativa en el área en comparación con los del grupo testigo. Sin embargo, después de 72 h de exposición a esta concentración de HgCl₂, se disminuyó de forma significativa el área de los ovarios comparados con el grupo testigo. Los ovarios de *D. melanogaster* expuestos a la concentración de 0.3 mM en los tres tiempos no mostraron alteraciones del área comparados con el área de los ovarios del grupo testigo (Tabla 6; Figura 9 y 10).

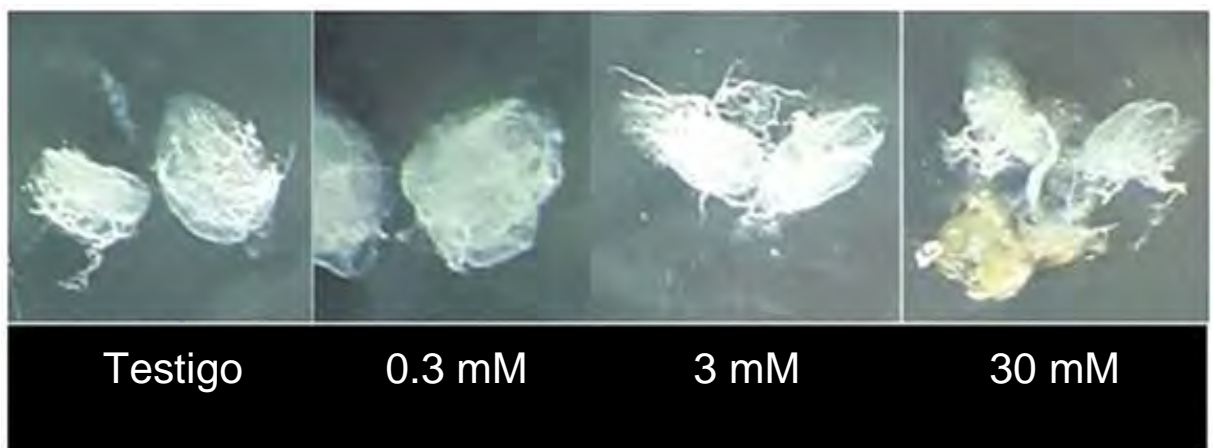


Figura 9. Morfología de los ovarios de *D. melanogaster* después de 72 horas de exposición a diferentes concentraciones HgCl₂.

Tabla 6. Medias del área de los ovarios de *D. melanogaster*, después de 24, 48 y 72 horas de exposición a HgCl₂.

Cloruro de mercurio	24 horas Media± SEM	48 horas Media± SEM	72 horas Media± SEM
Testigo	62.025±3.91	63.48±3.29	66.1±4.22
0.3 mM	62.85±3.28	71.23±4.4	69.53±4.99
3 mM	42.5±3.06**	57.23±3.06	53.75±2.36*
30 mM	48.55± 6.09	58.28±3.31	41±3.33***

* Diferencia significativa obtenida entre los grupos experimentales y el testigo basado en el análisis de la varianza, por lo que se aplicó la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls.

El valor de P fue de $P < 0.05$.

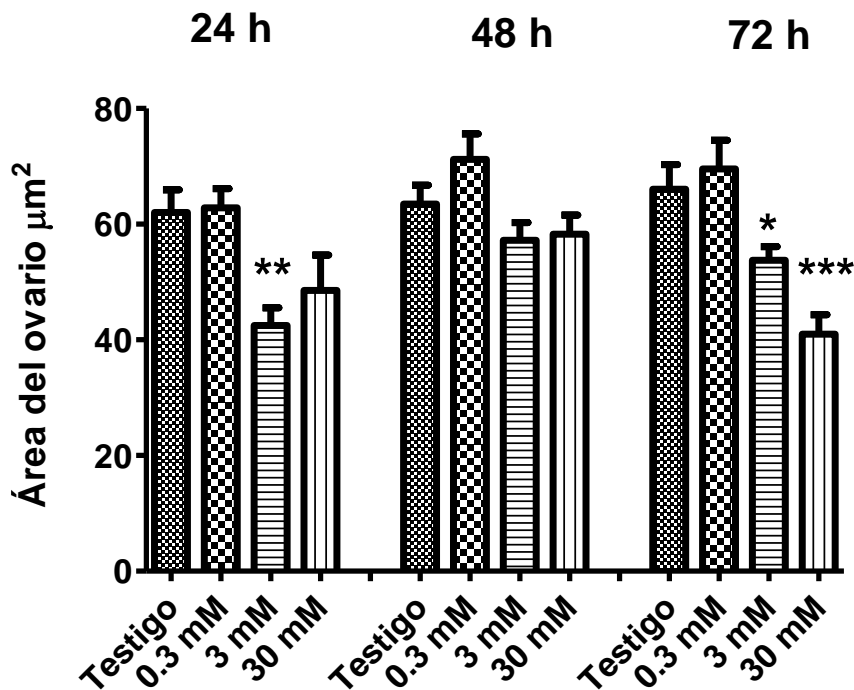


Figura 10. Medias de las áreas de los ovarios de *D. melanogaster* expuestos a 0.3, 3 y 30 mM HgCl₂ por 24, 48 y 72 horas.

Las barras representan las medias ± SEM de cada tratamiento. Los ** indican el nivel de significancia.

VII.2 Genotóxicidad en los ovarios de *D. melanogaster* expuestos a HgCl₂

En la Tabla 7 se muestran las medias de los parámetros genotóxicos analizados mediante el ensayo cometa alcalino en las células del ovario de *D. melanogaster* a las 24, 48 y 72 h de exposición con concentraciones de 0.1mM, 0.3mM, 3 mM y 30 mM de HgCl₂ (Figura 11- 20). Los resultados obtenidos evidencian que a 24 h a las concentraciones de 0.1 y 0.3 mM de HgCl₂ no incrementaron los valores de los tres parámetros genotóxicos: intensidad de la cauda (IC), momento de la cauda (MC) y longitud de la cauda (LC) comparados con el grupo testigo, excepto que la IC aumenta significativamente a 0.1 mM. Los ovarios expuestos a 0.1 mM por 48 h, presentaron un aumento significativo en la LC e IC comparados con los valores del grupo testigo. Para 0.3 mM a 48 h solo hubo aumento en el parámetro IC. Después de 72 h de exposición a 0.1 mM se vio únicamente el aumento en el parámetro de LC a comparación de 0.3 mM donde se observa un incremento en todos los parámetros con relación el grupo testigo. La concentración de 3 mM de HgCl₂ después de 24, 48 y 72 h de exposición indujo un aumento significativo en IC, MC, LC en las células ováricas comparadas con el testigo, con excepción de 48 h en LC. En los ovarios que fueron expuestos a concentraciones de 30 mM durante 24 h solamente se incrementó significativamente la LC, sin embargo, a 48 y 72 h aumentaron significativamente los tres parámetros genotóxicos comparados con los valores del testigo.

El análisis de regresión lineal, referente a los promedios de los tres parámetros genotóxicos en los núcleos de ovario de *D. melanogaster* después de la exposición a las diferentes concentraciones de HgCl₂ durante 24, 48 y 72 h evidencia que solo a 24 h de exposición existe una correlación positiva en el parámetro LC, a diferencia de las 48 h de exposición donde se obtuvo una respuesta de concentración-daño en todos los parámetros genotóxicos (LC, IC, MC). Por otro lado, después de 72 h de exposición no se observaron correlaciones en ningún parámetro genotóxico, es decir, no hubo una respuesta de concentración-daño (Figura 11- 19).

Tabla 7. Media (\bar{X}) y error estándar (SEM) de los tres parámetros genotóxicos de los ovarios de *D. melanogaster*, después de 24, 48 y 72 horas de exposición a HgCl₂.

Cloruro de mercurio	Longitud de la cauda (LC) (μm)	Intensidad de la cauda (IC) (%)	Momento de la cauda (MC)
	<i>Medias \pm SEM</i>	<i>Medias \pm SEM</i>	<i>Medias \pm SEM</i>
24 horas			
Testigo	110.75 \pm 2.25	21.86 \pm 0.87	6.31 \pm 0.5
0.1 mM	110.81 \pm 1.89	29.23 \pm 1***	7.40 \pm 0.43
0.3 mM	109.23 \pm 1.77	24.80 \pm 0.86	7.29 \pm 0.44
3 mM	117.65 \pm 1.7*	28.80 \pm 0.95***	8.36 \pm 0.48*
30 mM	121.43 \pm 2.1***	23.81 \pm 0.92	7.09 \pm 0.57
48 horas			
Testigo	118.1 \pm 2.23	18.25 \pm 0.75	5.9 \pm 0.4
0.1 mM	110.14 \pm 1.97*	21.11 \pm 0.86*	7.13 \pm 0.47
0.3 mM	116.66 \pm 2.22	22.9 \pm 0.9**	7.70 \pm 0.5
3 mM	115.21 \pm 1.88	29.31 \pm 1.12***	10.20 \pm 0.58***
30 mM	129.52 \pm 2.26***	36.05 \pm 1.18***	16.19 \pm 0.78***
72 horas			
Testigo	78.75 \pm 1.7	25.20 \pm 0.87	4.84 \pm 0.32
0.1 mM	84.35 \pm 1.93*	23.81 \pm 0.96	5.51 \pm 0.44
0.3 mM	88.07 \pm 1.9***	29.05 \pm 1.04**	7.91 \pm 0.54***
3 mM	111.92 \pm 1.61***	33.99 \pm 1.05***	10.76 \pm 0.66***
30 mM	96.79 \pm 1.91***	30.65 \pm 0.99***	8.1 \pm 0.57***

* Diferencia significativa obtenida entre los grupos experimentales y el testigo basado en el análisis de la varianza, por lo que se aplicó la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls.

El valor de P fue de $P < 0.05$.

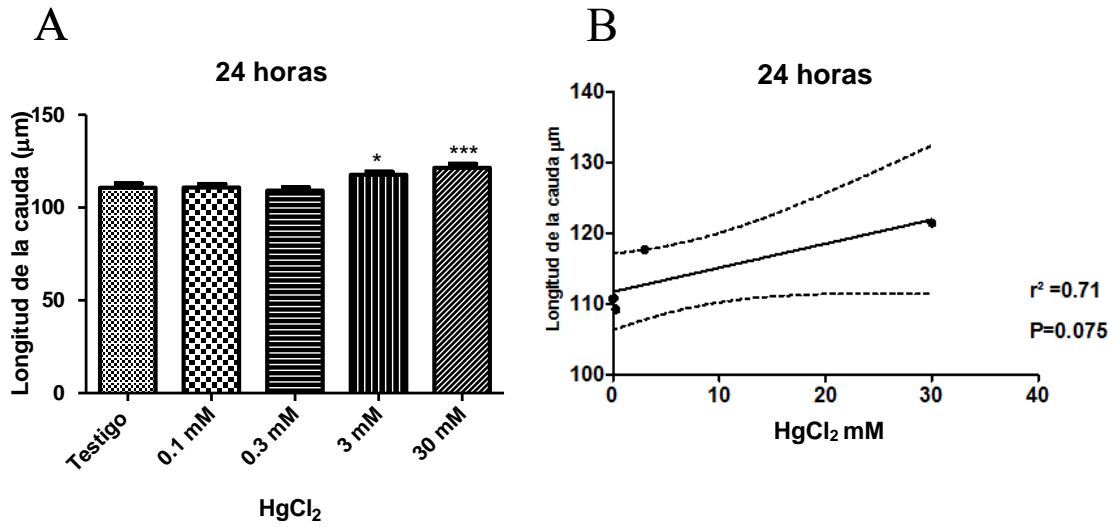


Figura 11. Medias de longitud de cauda en células de ovario de *D. melanogaster* después 24 h de exposición a HgCl₂ (A) y su regresión lineal (B).

Las barras representan las medias \pm SEM de cada tratamiento. Los ** indican el nivel de significancia.

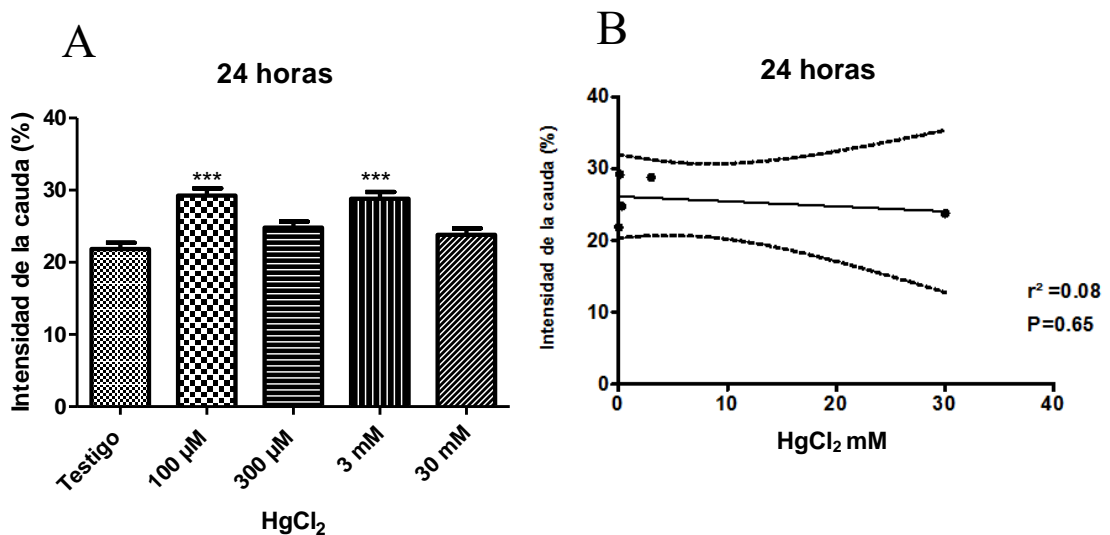


Figura 12. Medias de intensidad de cauda en células de ovario de *D. melanogaster* después de 24 h de exposición a HgCl₂ (A) y su regresión lineal (B).

Las barras representan las medias \pm SEM de cada tratamiento. Los ** indican el nivel de significancia.

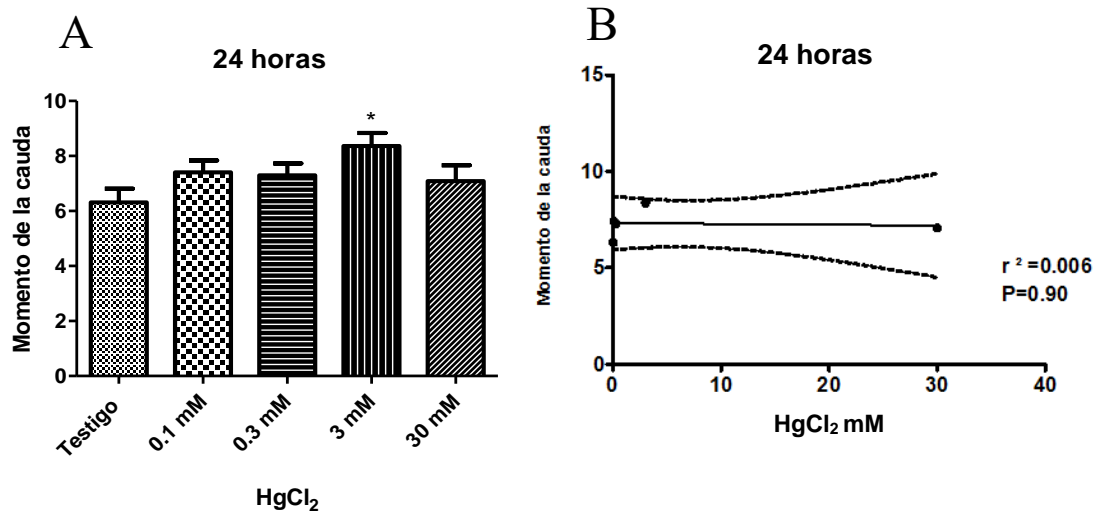


Figura 13. Medias de momento de cauda en células de ovario de *D. melanogaster* después de 24 h de exposición a HgCl₂ (A) y su regresión lineal (B).

Las barras representan las medias \pm SEM de cada tratamiento. Los ** indican el nivel de significancia.

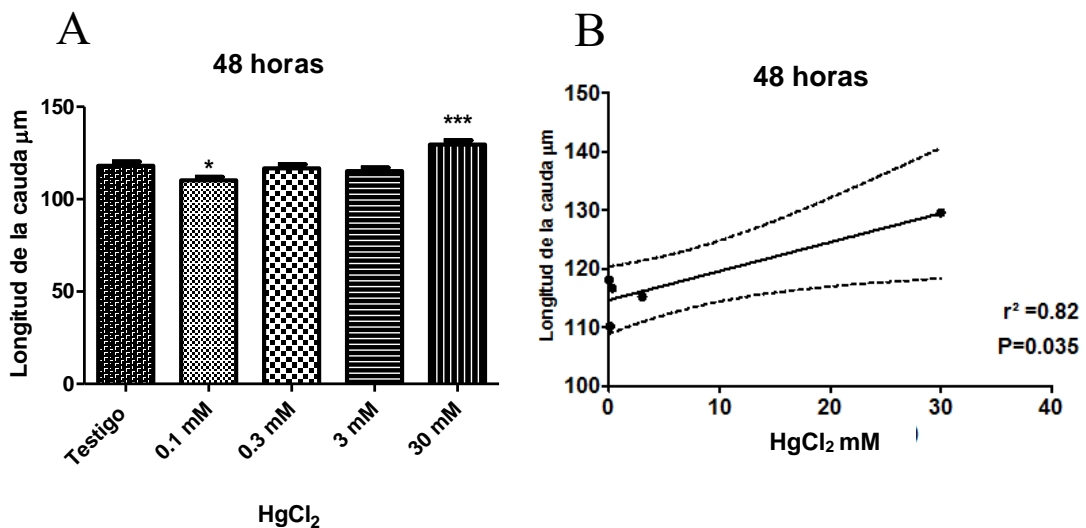


Figura 14. Medias de la longitud de cauda en células de ovario de *D. melanogaster* después de 48 h de exposición a HgCl₂ (A) y su regresión lineal (B).

Las barras representan las medias \pm SEM de cada tratamiento. Los ** indican el nivel de significancia.

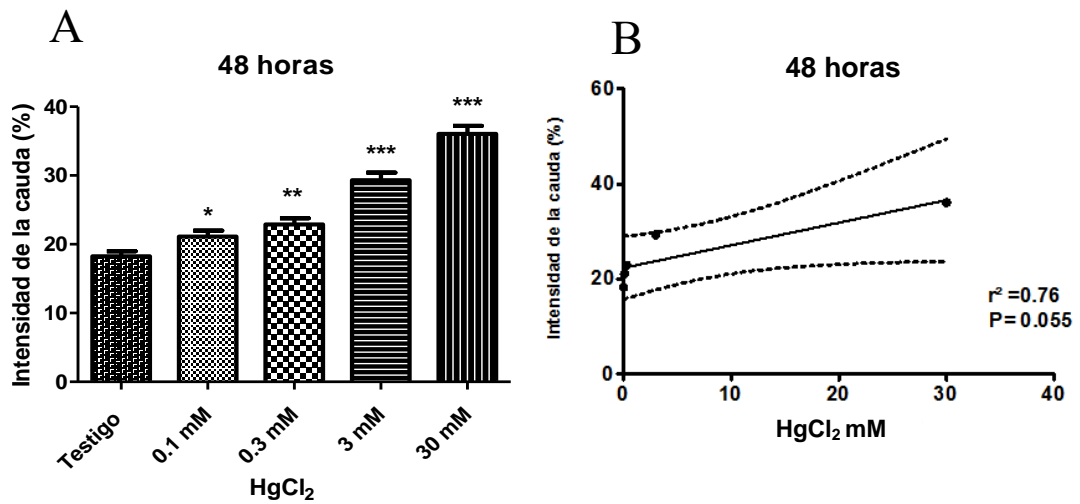


Figura 15. Medias de la intensidad de cauda en células de ovario de *D. melanogaster* después de 48 h de exposición a HgCl₂ (A) y su regresión lineal (B).

Las barras representan las medias \pm SEM de cada tratamiento. Los ** indican el nivel de significancia.

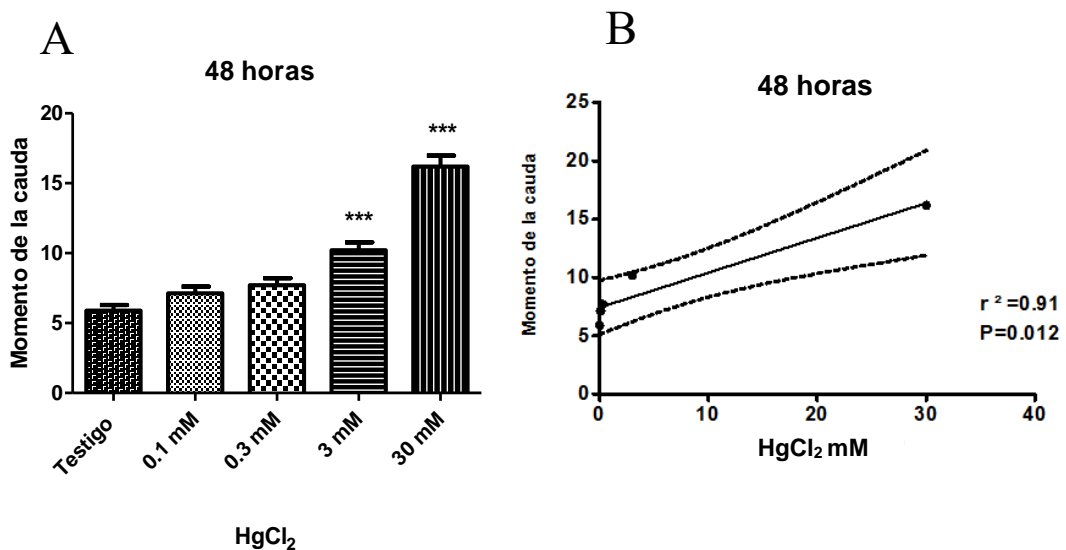


Figura16. Medias de momento de cauda en células de ovario de *D. melanogaster* después de 48 h de exposición a HgCl₂ (A) y su regresión lineal (B).

Las barras representan las medias \pm SEM de cada tratamiento. Los ** indican el nivel de significancia.

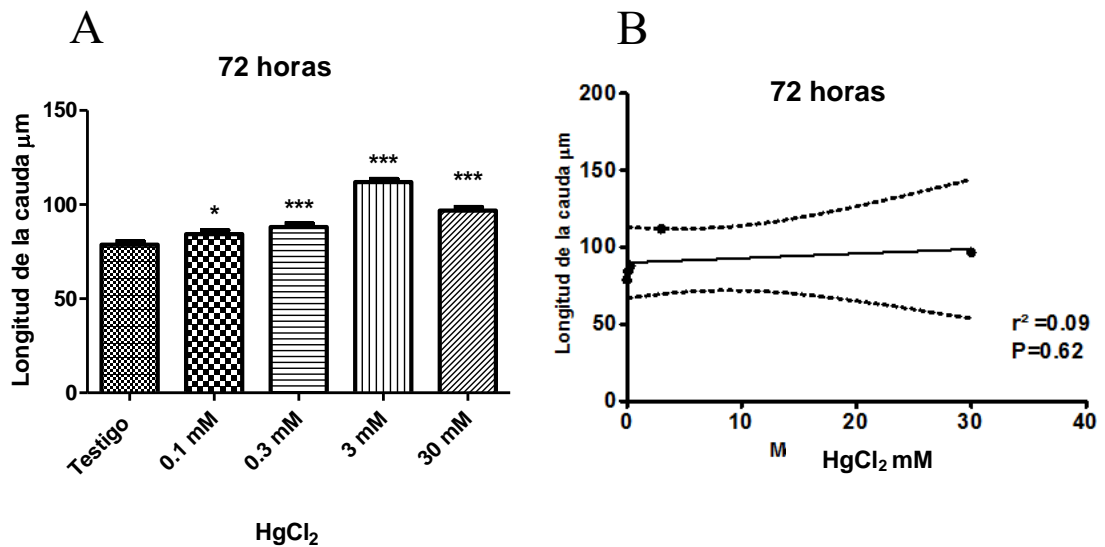


Figura 17. Medias de longitud de cauda en células de ovario de *D. melanogaster* después de 72 h de exposición a HgCl₂ (A) y su regresión lineal (B).

Las barras representan las medias \pm SEM de cada tratamiento. Los ** indican el nivel de significancia.

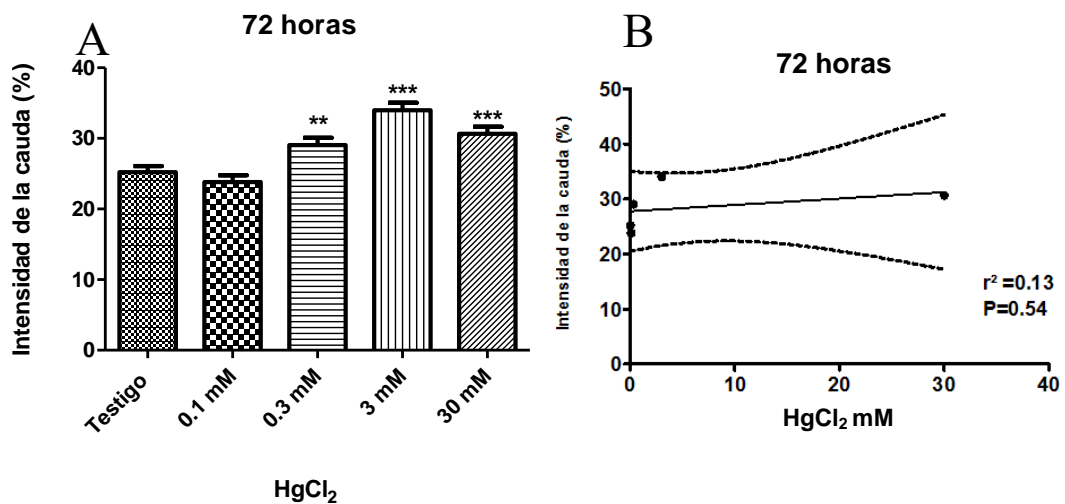


Figura 18. Medias de intensidad de cauda en células de ovario de *D. melanogaster* después de 72 h de exposición a HgCl₂ (A) y su regresión lineal (B).

Las barras representan las medias \pm SEM de cada tratamiento. Los ** indican el nivel de significancia.

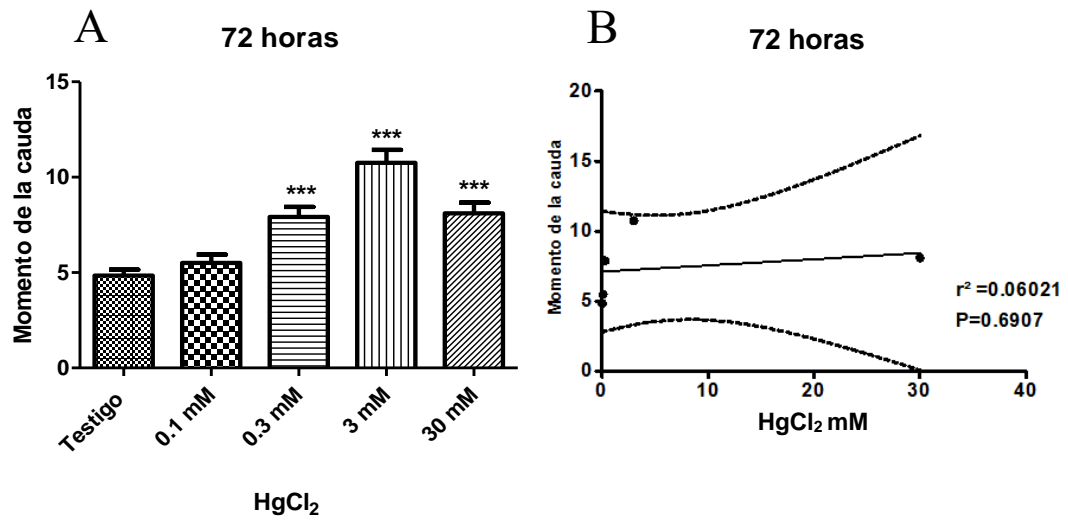


Figura 19. Medias de momento de cauda en células de ovario de *D. melanogaster* después de 78 h de exposición a HgCl₂ (A) y su regresión lineal (B).

Las barras representan las medias \pm SEM de cada tratamiento. Los ** indican el nivel de significancia.

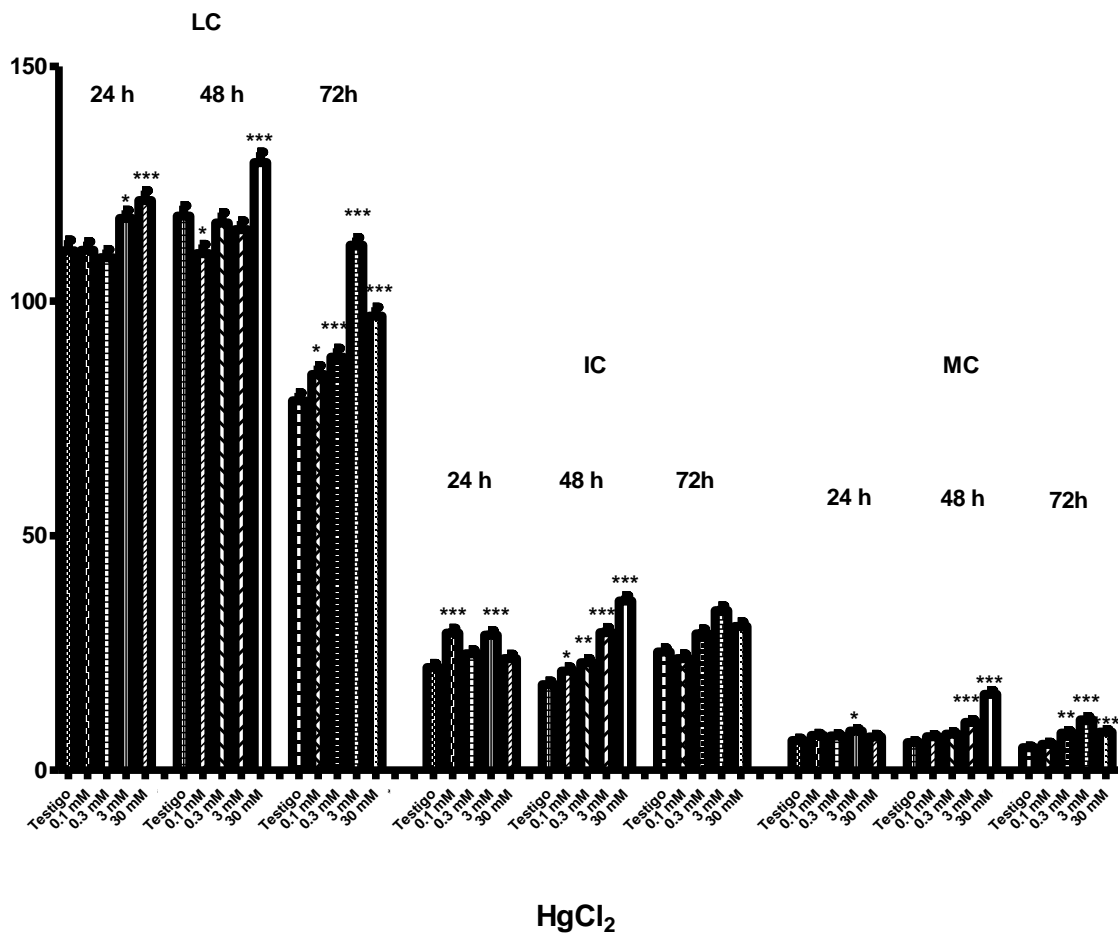


Figura 20. Medias de LC, IC y MC en células de ovario de *D. melanogaster* después de 24, 48 y 72 h de exposición a HgCl_2 .

Las barras representan las medias \pm SEM de cada tratamiento. Los ** indican el nivel de significancia.

VIII. DISCUSION

Desde el siglo pasado ha aumentado la presencia de los metales pesados en el ambiente debido a las actividades humanas, tales como la metalurgia y la quema de combustibles fósiles. Esto ha ocasionado efectos nocivos para el ambiente y la salud a causa de los altos niveles de bioacumulación y toxicidad de los metales (Carmona, 2009). El mercurio es uno de los metales pesados con amplia variedad de estados físicos y químicos, cada uno con diferente nivel de toxicidad. La biotransformación del mercurio es un factor de riesgo ambiental que permite la entrada y acumulación en las cadenas tróficas, causando problemas de salud en los organismos (Silva-Pereira *et al.*, 2005). El mercurio es tóxico principalmente para el sistema nervioso y el inmunitario, pero también afecta al aparato digestivo, a la piel, a los pulmones, a los riñones, a la tiroides y a los ojos (OMS, 2017; PNUMA, 2002). Se ha evidenciado en estudios con animales de laboratorio expuestos a elevadas concentraciones de mercurio efectos negativos en el sistema reproductor; abortos espontáneos e infertilidad y, en los humanos, está implicado con desórdenes en el ciclo menstrual, inhibición de la ovulación y malformaciones congénitas (; De Rosis *et al.*, 1985; Sikorski *et al.*, 1987; Rowland *et al.*, 1994; Schuurs, 1999). Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales ejerce su toxicidad no se conocen completamente. En este contexto, estudios genotóxicos y morfológicos usando *D. melanogaster* permitirán obtener más información sobre los eventos genéticos y moleculares que provoca el mercurio en organismos modelo.

El daño al DNA inducido por agentes genotóxicos en poblaciones ocupacionalmente expuestas a contaminantes, en líneas celulares y en modelos animales es medible mediante el ensayo cometa alcalino; técnica rápida, sensible y muy sencilla. Este ensayo genético se ha convertido en una herramienta básica para estudiar el potencial genotóxico de agentes químicos o ambientales y permite identificar agentes mutágenos y carcinógenos (Tice *et al.*, 2000; Vindas *et al.*, 2004; Olive y Banáth, 2006; Nandhakumar *et al.*, 2011).

Los resultados genotóxicos obtenidos a partir del análisis de las células ováricas después de ser expuestas a 0.1, 0.3 y 30 mM de HgCl₂ por 24 h en la mayoría de los casos no produjeron daño significativo en el DNA, excepto 3 mM que presentó aumento significativo en los tres parámetros genotóxicos; LC, IC y MC, a 0.1 mM y 30 mM se presentó un incremento en IC y LC respectivamente, comparados con el grupo testigo. A 48 h las concentraciones de 0.1, 3 y 30 mM, así como 0.3, 3 y 30 mM de HgCl₂ por 72 h causaron un aumento significativo en el daño al genoma de las células ováricas con relación al grupo testigo. Quizás, el HgCl₂ causó un incremento de estrés oxidativo con la generación de ROS, las cuales fragmentaron el genoma o interfirieron con los mecanismos de reparación del DNA. También el mercurio afecta directamente los mecanismos de recombinación y de reparación por escisión de base, al unirse en los grupos sulfhidrilo de las cisteínas de los dedos de zinc, altera el funcionamiento de estos al afectar su estructura y, por lo tanto, su actividad (Crespo-López *et al.*, 2009; Nersesyan *et al.*, 2016). Otro mecanismo relacionado con la genotoxicidad del mercurio es su afinidad a los grupos sulfhidrilo de la tubulina y la cinesina, proteínas que forman los microtúbulos, perjudicando así la función del huso mitótico y la segregación cromosómica, lo cual conduce a aberraciones cromosómicas y poliploidía (Silva-Pereira *et al.*, 2005; Crespo-López *et al.*, 2009).

El mercurio en células eucariontes ocasiona rupturas en el DNA, aberraciones cromosómicas, formación de micronúcleos, aneuploidía, poliploidía y se ha demostrado que ocasiona efectos clastogénicos (IARC, 1993; Silva-Pereira *et al.* 2005; Wolfe *et al.*, 1998; Carmona *et al.*, 2008), además es considerado un agente citotóxico (Wolfe *et al.*, 1998). Diversos estudios muestran evidencias de estos efectos genotóxicos (Ramel, 1969; Panda *et al.*, 1992; Amorim *et al.*, 2000; Mishra y Tewari, 2011; Abdella y Gad, 2012; Mohmood *et al.*, 2012; Forment *et al.*, 2014; Ryu *et al.*, 2014; Calao y Marrugo, 2015; Crespo-López *et al.*, 2016; Di Donato *et al.*, 2016; Sarker *et al.*, 2016; Gómez-Oliván *et al.*, 2017). En *D. melanogaster* se ha observado que los compuestos del mercurio son capaces de inducir mutaciones letales recesivas ligadas al cromosoma X (Mathew y Al-Doori, 1976; Gayathri y Krishnamurthy, 1985; Ortiz, 2009), aumento en la descendencia de organismos XXY por la no disyunción en la meiosis I (Ramel y Magnusson, 1969; 1979). Además, ocasiona mutaciones en los genes *outstretched* (*od*) en el cromosoma X y *Curved* (*c*) en el cromosoma 2 (Ramel y Magnusson, 1969); y finalmente, inducción de aneuploidías (Magnusson y Ramel, 1986).

El daño genotóxico que se ha registrado en células de ovario son a partir de estudios de hámster (IARC, 1993). Varios de estos indican que el mercurio puede inducir rupturas en el DNA y la reducción de la reparación del mismo en las células del ovario de hámster (Christie *et al.*, 1984; Hamilton-Koch *et al.*, 1986; Cantoni y Costa 1983).

Por otra parte, después de realizar las exposiciones a diferentes tiempos y concentraciones de HgCl₂ a *D. melanogaster*, se observó que posterior a las 24 h de exposición a la concentración de 3 mM, así como 3 mM y 30 mM a 72 h se redujo el tamaño de los ovarios comparados con los ovarios del grupo testigo. Estos datos concuerdan con lo publicado en ratas expuestas a 1 mg/m³ por día a vapor de mercurio durante 45 días, los cuales muestran una reducción significativa en el volumen de estos órganos, así como atrofia y degeneración folicular (Altunkaynak *et al.*, 2016). Resultados similares se reportan en las gónadas femeninas del pez *Stizostedion vitreum* expuestas por 6 meses a concentraciones de 0.1 y 1.0 µg Hg/g de metilmercurio (Friedmann *et al.*, 1996) y en *Channa punctatus* tratados con la concentración 16.7 ppb de HgCl₂ por 3 meses (Dey y Bhattacharya, 1989). Además, en *C. punctatus*, el mercurio reduce el número de ovocitos de la segunda y tercera etapa de la ovogénesis (Dey y Bhattacharya, 1989). En los cangrejos rojos (*Procambarus clarkii*) inyectados con una mezcla de 15 mg de 5-hidroxitriptamina con 0.5 mg de HgCl₂ por 21 días, se observa que el mercurio inhibe el desarrollo de los ovarios causando reducción significativa en el tamaño (Reddy *et al.*, 1997). También se ha reportado que el mercurio causa cambios histopatológicos en el tejido ovárico y ovocitos atrésicos en los ovarios de los peces *Acanthopagrus latus* y *Danio rerio* (Hedayati y Khsoravi-Katuli, 2016; Zhang *et al.*, 2016).

Es posible que la reducción del tamaño de los ovarios de *D. melanogaster* expuestos a las concentraciones de 3 y 30 mM de HgCl₂, se deba a distintos procesos, tales como: (1) la generación de ROS pudo alterar las vías de señalización de la proliferación celular de las células somáticas de las cámaras ováricas y de células germinales durante la ovogénesis que consecuentemente provocaron apoptosis y necrosis celular (Kim y Sharma, 2004); (2) interferencia con la función de las proteínas reguladoras de la mitosis y meiosis para el correcto desarrollo del ovario; (3) afectaciones en los receptores hormonales del eje reproductivo para inducir la proliferación de las células somáticas y

diferenciación de las células germinales en el ovario; o (4) por su afinidad a los grupos sulfhidrilo, amino, amida, fosfato y carboxilo, afecte la actividad de algunas proteínas o enzimas esenciales para activar las vías de señalización para el proceso de ovogénesis en el ovario de *D. melanogaster*, tal como las proteínas BEAF, las cuales poseen un grupo terminal carboxilo con afinidad al mercurio, lo cual podría evitar su función. Se ha reportado que mutaciones en el gen *BEAF* en las hembras de *D. melanogaster* tiene baja fertilidad debido a la ausencia de ovocitos maduros (Roy *et al.*, 2007). También, la proteína Ink (de la familia SH2B de las proteínas adaptadoras) poseen un grupo carboxilo terminal (Devallière y Charreau, 2011). Esta proteína es un regulador positivo de la vía de señalización del factor de crecimiento de insulina/insulina (IIS) y cuando presenta mutaciones, se induce atrofia en los ovarios, con pocas cámaras maduras (Ferguson *et al.*, 2012). Otras de las proteínas que podría afectar son Cup y eIF4E, las cuales se encuentran en el citoplasma de las células germinales durante la ovogénesis. La pEIF4E bloquea el desplazamiento de Cup del citoplasma al núcleo, la función de Cup es modular la localización de eIF4E y los mRNA en el ovocito. Cup se une a la parte carboxilo terminal de eIF4, la ainihibición de eIF4E funcional conduce a la disminución del tamaño de los ovarios (Zappavigna *et al.*, 2004). También se ha reportado que el mercurio puede reducir el tamaño de los ovarios humanos vía disminución de los niveles de las metaloproteínasas (TIMP-1 y 2) que conforman la matriz extracelular (Pearson *et al.*, 2016; Jacob-Ferreira *et al.*, 2009). La interacción del mercurio con el amino terminal del TIMP puede interferir con su actividad biológica. TIMP es necesario para la organización de los tejidos y la producción de nuevos gametos. Se ha observado que se requiere de la actividad de TIMP para la ovogénesis y en su ausencia, los ovarios son más pequeños (Pearson *et al.*, 2016). El mercurio, como otros metales, es un disruptor endócrino que posiblemente altera los niveles de las hormonas reproductoras femeninas en los seres humanos (Pollack *et al.*, 2011). En *D. melanogaster*, podría afectar los niveles de la hormona ecdosina. Esta hormona participa en la etapa 8 de la ovogenésis, activando o inhibiendo el desarrollo de las cámaras ováricas y la desregulación en este proceso destruye las cámaras reduciendo el tamaño de los ovarios (Buszczak *et al.*, 1999; Belles y Piulachs, 2015).

IX. CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

- El aumento significativo de la fragmentación del DNA muestra evidencia de que el cloruro de mercurio (HgCl_2) es un agente genotóxico en las células de ovario de *D. melanogaster*.
- La exposición de HgCl_2 a una concentración de 30 mM por 48 h produce daño significativo en el DNA en las células del ovario, evidenciado por el aumento en la longitud, la intensidad y el momento de la cauda del cometa.
- El HgCl_2 a 0.3, 3 y 30 mM aumenta el daño del genoma en los ovarios de *D. melanogaster* después de 72 h de exposición
- Después de 72 h de exposición, las hembras tratadas con 30 mM HgCl_2 presentan reducción considerable en el tamaño de ovarios.

X. PERSPECTIVAS

Ahora que se conoce que el HgCl_2 es capaz de causar de daño en el DNA y desencadenar cambios morfológicos en los ovarios de *Drosophila* es necesario comprender los mecanismos por los cuales se inducen estos daños. Es conveniente llevar a cabo estudios de evaluaciones moleculares y de vías de señalización para conocer si existen alteraciones y el tipo de las mismas. Una forma sería a través de la utilización de moscas transgénicas y la utilización de técnicas moleculares como marcadores para evaluar daños en los organismos.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Abdella, E., y Gad, M. (2012). Protective role of diallyl disulphide compound (from garlic extract) against mercuric chloride-induced genotoxicity and cytotoxicity in albino rats. *Iranian Journal of Cancer Prevention* 1(3), 95-109.

Abnoos, H., Fereidoni, M., Mahdavi-Shahri, N., Haddad, F., y Jalal, R. (2013). Developmental study of mercury effects on the fruit fly (*Drosophila melanogaster*). *Interdiscip. Toxicol* 6(1), 34-40.

Albert, L.A. (1997). *Introducción a la toxicología ambiental*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, División de Salud y Ambiente, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud y Secretaría de Ecología. Metepec, Estado de México, México.

Aldaz, S., y Escudero, L. M. (2010). Imaginal discs. *Current Biology* 20(10), R429-R431.

Al-Momani, F. A., y Massadeh, A. M. (2005). Effect of different heavy-metal concentrations on *Drosophila melanogaster* larval growth and development. *Biological trace element research* 108(1-3), 271-277.

Al-Saleh, I., Shinwari, N., y Al-Amodi, M. (2009). Accumulation of mercury in ovaries of mice after the application of skin-lightening creams. *Biological trace element research* 131(1), 43-54.

Altunkaynak, B. Z., Akgül, N., Yahyazadeh, A., Altunkaynak, M. E., Turkmen, A. P., Akgül, H. M., y Ünal, B. (2016). Effect of mercury vapor inhalation on rat ovary: stereology and histopathology. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 42(4), 410-416.

Amorim, M. I., Mergler, D., Bahia, M. O., Dubeau, H., Miranda, D., Lebel, J., Burbano, R. y Lucotte, M. (2000). Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 72(4), 497-507.

Arango, V. y Sandra, S. (2012). Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública* 30(1), 75-82.

Arcaya, J. L., Tejada, C. M., Salazar, U., Silva, E. J., Urdaneta, K., y Varela, K. (2013). La intoxicación con cobre disminuye la sobrevivencia e induce alteraciones neurológicas en *Drosophila melanogaster*. *Investigación Clínica* 54(1), 47-57.

Bastock, R., y Johnston, D. (2008). *Drosophila* oogenesis. *Current Biology* 18(23), R1082-R1087.

Beccari, S., Teixeira, L., y Rorth, P. (2002). The JAK/STAT pathway is required for border cell migration during *Drosophila* oogenesis. *Mechanisms of development* 111(1), 115-123.

Belles, X., y Piulachs, M. D. (2015). Ecdysone signalling and ovarian development in insects: from stem cells to ovarian follicle formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1849(2), 181-186.

Bonilla-Ramirez, L., Jimenez-Del-Rio, M., y Velez-Pardo, C. (2011). Acute and chronic metal exposure impairs locomotion activity in *Drosophila melanogaster*: a model to study Parkinsonism. *Biomaterials* 24(6), 1045-1057.

Buszczak, M., Freeman, M. R., Carlson, J. R., Bender, M., Cooley, L., y Seagraves, W. A. (1999). Ecdysone response genes govern egg chamber development during mid-oogenesis in *Drosophila*. *Development* 126(20), 4581-4589.

Calao, C. R., y Marrugo, J. L. (2015). Genotoxic effects in a human population exposed to heavy metals in the region of La Mojana, Colombia, 2013. *Biomédica* 35, 139-151.

Calvi, B. R., Lilly, M. A., y Spradling, A. C. (1998). Cell cycle control of chorion gene amplification. *Genes & development* 12(5), 734-744.

Cantoni, O., y Costa, M. (1983). Correlations of DNA strand breaks and their repair with cell survival following acute exposure to mercury (II) and X-rays. *Molecular pharmacology* 24(1), 84-89.

Carmona, E. R. (2009). Evaluación genotóxica de algunos metales pesados en *Drosophila melanogaster* mediante los ensayos SMART de alas y Cometa (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, España.

Carmona, E. R., Kossatz, E., Creus, A., y Marcos, R. (2008). Genotoxic evaluation of two mercury compounds in the *Drosophila* wing spot test. *Chemosphere* 70(10), 1910-1914.

Casarett, L. J. y Klaassen, C. D. (2008). Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. McGraw-Hill Medical. Nueva York, Estados Unidos.

Castro, D. J. (2011). Informe sobre el mercado del mercurio en México. México, Comisión para la Cooperación Ambiental.

Christie, N. T., Cantoni, O., Evans, R. M., Meyn, R. E., y Costa, M. (1984). Use of mammalian DNA repair-deficient mutants to assess the effects of toxic metal compounds on DNA. *Biochemical pharmacology* 33(10), 1661-1670.

Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular biotechnology* 26(3), 249-261.

Cotelle, S., y Ferard, J. F. (1999). Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environmental and molecular Mutagenesis* 34(4), 246-255.

Covarrubias, S. A., y Cabriales, J. J. P. (2017). Contaminación ambiental por metales pesados en México: problemática y estrategias de fitorremediación. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 33, 7-21.

Crespo-Lopez, M. E., Costa-Malaquias, A., Oliveira, E. H., Miranda, M. S., Arrifano, G. P., Souza-Monteiro, J. R., Maia C. S., Macchi B. M., y do Nascimento, J. L. M. (2016). Is low non-lethal concentration of methylmercury really safe? A report on genotoxicity with delayed cell proliferation. *PloS one* 11(9), e0162822.

Crespo-López, M. E., Macêdo, G. L., Pereira, S. I., Arrifano, G. P., Picanço-Diniz, D. L., do Nascimento, J. L. M., y Herculano, A. M. (2009). Mercury and human genotoxicity: critical considerations and possible molecular mechanisms. *Pharmacological research* 60(4), 212-220.

Cuevas, M. (2006). *Drosophila* Oogenesis. Encyclopedia of life sciences. Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, Estados Unidos.

Davis, B. J., Price, H. C., O'connor, R. W., Fernando, R. R. A. S., Rowland, A. S., y Morgan, D. L. (2001). Mercury vapor and female reproductive toxicity. *Toxicological Sciences* 59(2), 291-296.

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

Demerec, M., y Kaufmann, B. P. (2005). The life cycle of *Drosophila melanogaster*. En *Drosophila* Guide: Introduction to the genetics and cytology of *Drosophila melanogaster*. Washington, Carnegie Institution of Washington.

Deng, W. M., Althausen, C., y Ruohola-Baker, H. (2001). Notch-Delta signaling induces a transition from mitotic cell cycle to endocycle in *Drosophila* follicle cells. *Development* 128(23), 4737-4746.

Devallière, J., y Charreau, B. (2011). The adaptor Lnk (SH2B3): an emerging regulator in vascular cells and a link between immune and inflammatory signaling. *Biochemical pharmacology* 82(10), 1391-1402.

Dey, S., y Bhattacharya, S. (1989). Ovarian damage to *Channa punctatus* after chronic exposure to low concentrations of elsan, mercury, and ammonia. *Ecotoxicology and environmental safety* 17(2), 247-257.

Dhawan, A., Bajpayee, M. M., Pandey, A. K., y Parmar, D. (2003). Protocol for the single cell gel electrophoresis/comet assay for rapid genotoxicity assessment. *Sigma* 1077(1).

Di Donato, G., De Matthaeis, E., Ronci, L., y Setini, A. (2016). Genotoxicity biomarkers in the amphipod *Gammarus elvirae* exposed *in vivo* to mercury and lead, and basal levels of DNA damage in two cell types. *Chemistry and Ecology* 32(9), 843-857.

Di Giorgio, M., Taja, M., Nasazzi, N., Bustos, N., Cavalieri, H., y Bolgiani, A. (2001). El ensayo de cometa como herramienta de la dosimetría biológica en la evaluación de sobreexposiciones fuertemente localizadas. En V *Regional Congress on Radiation Protection and Safety, Recife, Brasil* 29.

Drummond-Barbosa, D., y 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., y Rørth, P. (2001). Guidance of cell migration by the *Drosophila* PDGF/VEGF receptor. *Cell* 107(1), 17-26.

Escobedo-Flores, J. F., Ayala, V., Rubén, A., y Ramírez González, A. (2000). Problemática ambiental en la ciudad de México generada por las fuentes fijas. En *Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales, FEMISCA 12*, 1-14.

Español, S. (2001). Toxicología del mercurio. Actuaciones preventivas en Sanidad Laboral y Ambiental. *Jornada internacional sobre el impacto ambiental del mercurio utilizado en la minería artesanal del oro en Iberoamérica*. Lima, Perú.

Fairbairn, D. W., y O'Neill, K. L. (1995). Necrotic DNA degradation mimics apoptotic nucleosomal fragmentation comet tail length. En *Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 31(3), 171-173.

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

Filipiak, M., Tylko, G., y Pyza, E. (2012). Zinc induces caspase-dependent mitochondrial pathway of the programmed cell death in haemocytes of *Drosophila melanogaster*. *Biometals* 25(3), 507-516.

Forment, G. R., Faife, J. A., Díaz, I. D. L. M. F., del Castillo Martín, N. P., Gutiérrez, R. G., Blanco, A. P., y Novas, A. J. (2014). Marcadores de estrés oxidativo y genotoxicidad en trabajadores cubanos con exposición ocupacional prolongada al mercurio. *Revista Cubana de Salud y Trabajo* 15(1), 35-41.

Friedmann, A. S., Watzin, M. C., Brinck-Johnsen, T., y Leiter, J. C. (1996). Low levels of dietary methylmercury inhibit growth and gonadal development in juvenile walleye (*Stizostedion vitreum*). *Aquatic Toxicology* 35(3-4), 265-278.

Gaioli, M., Amoedo, D., y González, D. (2012). Impacto del mercurio sobre la salud humana y el ambiente. *Archivos argentinos de pediatría* 110(3), 259-264.

Gayathri, M. V., y Krishnamurthy, N. B. (1985). Investigations on the mutagenicity of two organomercurial pesticides, ceresan and agallol 3, in *Drosophila melanogaster*. *Environmental research* 36(1), 218-229.

Gilbert, S. F. (2005). *Biología del Desarrollo*. 7ª Ed. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana. Pp.680 y 681.

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

Gómez-Oliván, L. M., Mendoza-Zenil, Y. P., SanJuan-Reyes, N., Galar-Martínez, M., Ramírez-Durán, N., Martín-Doimeadios, R. D. C. R., Rodríguez-Fariñas, N., Islas-Flores, H., Elizalde-Velázquez, A., García-Medina, S., y Borja, R. P. P. (2017). Geno- and cytotoxicity induced on *Cyprinus carpio* by aluminum, iron, mercury and mixture thereof. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 135, 98-105.

González-Reyes, A., y Johnston, D. (1998). Patterning of the follicle cell epithelium along the anterior-posterior axis during *Drosophila* oogenesis. *Development* 125(15), 2837-2846.

Gunasekarana, V., Raj, G. V., y Chand, P. (2015). A comprehensive review on clinical applications of comet assay. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR* 9(3), GE01.

Hamilton-Koch, W., Snyder, R. D., y Lavelle, J. M. (1986). Mental-induced DNA damage and repair in human diploid fibroblasts and Chinese hamster ovary cells. *Chemico-biological interactions*, 59, 17-28.

Hassett-Sipple, B., Schoeny, R., y Swartout, J. (1997). Mercury study report to congress volume 5: health effects of mercury and mercury compounds. Environmental Protection Agency, Office of Air Quality Planning and Standards and Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency. EPA-452/R-97-007.

Hedayati, A., y Khsoravi-Katuli, K. (2016). Impact of Mercury on Liver and Ovary of Yellowfin Sea bream (*Acanthopagrus latus*) in the Persian Gulf. *ECOPERSIA* 4(1), 1295-1312.

Hirsch, H. V., Possidente, D., Averill, S., Despain, T. P., Buytkins, J., Thomas, V., Goebel, P., Shipp-Hilts, A., Wilson, Hollocher, K., Lnenicka, G., Possidente, B. y Ruben, D. (2009). Variations at a quantitative trait locus (QTL) affect development of behavior in lead-exposed *Drosophila melanogaster*. *Neurotoxicology* 30(2), 305-311.

Hirth, F. (2010). *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)* 9(4), 504-523.

Hudson, A. M., y Cooley, L. (2014). Methods for studying oogenesis. *Methods* 68(1), 207-217.

Huelsmann, S., Ylänne, J., y Brown, N. H. (2013). Filopodia-like actin cables position nuclei in association with perinuclear actin in *Drosophila* nurse cells. *Developmental cell* 26(6), 604-615.

International Agency for Research on Cancer (IARC). (2016). Agents classified by the IARC monographs. *World Health Organization*, Volumes 1–116.

International Agency for Research on Cancer y World Health Organization. (1993). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. *IARC, Lyon*, 41-117.

Jacob-Ferreira, A. L., Passos, C. J., Jordao, A. A., Fillion, M., Mergler, D., Lemire, M., Gerlach, R., Barbosa, F., y Tanus-Santos, J. E. (2009). Mercury exposure increases

circulating net matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 Activities. *Basic & clinical pharmacology and toxicology* 105(4), 281-288.

Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B., y Beeregowda, K. N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary toxicology* 7(2), 60-72.

Jenkins, V. K., Timmons, A. K., y McCall, K. (2013). Diversity of cell death pathways: insight from the fly ovary. *Trends in cell biology* 23(11), 567-574.

Jiménez, M. R., y Kuhn, G. R. (2009). *Toxicología fundamental*. 4ª Ed. Sevilla, España: Ediciones Díaz de Santos. pp.483 y 484.

Kim, S. H., y 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.

Lamperti, A. y Printz, R. H. (1973). Effects of mercuric chloride on the reproductive cycle of the female hamster. *Biology of reproduction* 8(3), 378-387.

Laván-Quiroz, D. A. (2012). Análisis de la expresión génica en pupas de *Drosophila Melanogaster* expuestas a microgravedad (Tesis doctoral). Universidad autónoma de Madrid, España.

Magdum, S., y Shinde, R. (2015). Cytotoxic response to heavy metal pollution in study of polytene chromosomes in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Basic Sciences* 1, 39-44.

Magnusson, J., y Ramel, C. (1986). Genetic variation in the susceptibility to mercury and other metal compounds in *Drosophila melanogaster*. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis* 6(4), 289-305.

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

Manning, L., y Starz-Gaiano, M. (2015). Culturing *Drosophila* egg chambers and investigating developmental processes through live imaging. *Drosophila Oogenesis: Methods and Protocols*, 73-88.

Martínez-Valenzuela, C., y Gómez-Arroyo, S. (2007). Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 23(4), 185-200.

Máthé, E. (2004). Immunocytological analysis of oogenesis. En D. S. Henderson (Ed). *Drosophila cytogenetics protocols* (pp.89-92). New Jersey, Estados Unidos: Humana Press.

Mathew, C., y Al-Doori, Z. (1976). The mutagenic effect of the mercury fungicide Ceresan M in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 40(1), 31-35.

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

Mishra, N., y Tewari, R. R. (2011). Cytotoxic and genotoxic effects of mercury in house fly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Cell Mol Biol* 57(1), 122-128.

Mohmood, I., Mieiro, C. L., Coelho, J. P., Anjum, N. A., Ahmad, I., Pereira, E., Costa, D.A., y Pacheco, M. (2012). Mercury-induced chromosomal damage in wild fish (*Dicentrarchus labrax* L.) reflecting aquatic contamination in contrasting seasons. *Archives of environmental contamination and toxicology* 63(4), 554-562.

Molina, C. I., Gibon, F. M., Sánchez, Y., Achá, D., Benefice, E., y Guimaraes, J. R. D. (2010). Implicancia ambiental del mercurio en ecosistemas acuáticos de la Amazonía: Situación en Bolivia. *Revista Virtual REDESMA* 4, 25.

Mottet, N. K., Shaw, C. M. y Burbacher, T. M. (1985). Health risks from increases in methylmercury exposure. *Environmental Health Perspectives* 63, 133.

Mozaffarieh, M., Schoetzau, A., Sauter, M., Grieshaber, M., Orgül, S., Golubnitschbaja, O., y Flammer, J. (2008). Comet assay analysis of single-stranded DNA breaks in circulating leukocytes of glaucoma patients. *Molecular vision* 14, 1584.

Nandhakumar, S., Parasuraman, S., Shanmugam, M. M., Rao, K. R., Chand, P., y Bhat, B. V. (2011). Evaluation of DNA damage using single-cell gel electrophoresis (Comet Assay). *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics* 2(2), 107.

Nersesyan, A., Kundi, M., Waldherr, M., Setayesh, T., Mišík, M., Wultsch, G., Filipic, M., Mazzaron, M., y Knasmueller, S. (2016). Results of micronucleus assays with individuals who are occupationally and environmentally exposed to mercury, lead and cadmium. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 770, 119-139.

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

Olive, P. L., y Banáth, J. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature protocols* 1(1), 23.

Oliveira, F. R. T., Ferreira, J. R., dos Santos, C. M. C., Macêdo, L. E. M., de Oliveira, R. B., Rodrigues, J. A., Rodrigues, J.L. do Nascimento, L.R. Faro y Diniz, D. L. W. P. (2006). Estradiol reduces cumulative mercury and associated disturbances in the hypothalamus–pituitary axis of ovariectomized rats. *Ecotoxicology and environmental safety* 63(3), 488-493.

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

Ong, C., Lee, Q. Y., Cai, Y., Liu, X., Ding, J., Yung, L. Y. L., Bay, B. H. y Baeg, G. H. (2016). Silver nanoparticles disrupt germline stem cell maintenance in the *Drosophila* testis. *Scientific reports* 6, 20632.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS). (2004). Caracterización de peligros de patógenos en los alimentos y el agua: Serie de evaluación de riesgos microbiológicos N° 3. Roma.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). *El mercurio y la salud*. [en línea] disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs361/es/> [Acceso 16 May 2017].

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

Orr-Weaver, T. L., y Spradling, A. C. (1986). *Drosophila* chorion gene amplification requires an upstream region regulating s18 transcription. *Molecular and cellular biology* 6(12), 4624-4633.

Ortega, J.A., Ferrís, J., López, J.A., Macián, A.M., García, J., Cánovas, A., Ortí, A., Ibiza, E., Molina, F., y Lorente D. (2003). Hospitales sostenibles (II). Mercurio: exposición pediátrica. Efectos adversos en la salud humana y medidas preventivas. *Revista Especializada en Pediatría* 59, 274-291.

Panda, K. K., Lenka, M., y Panda, B. B. (1992). Monitoring and assessment of mercury pollution in the vicinity of a chloralkali plant. II Plant-availability, tissue-concentration and genotoxicity of mercury from agricultural soil contaminated with solid waste assessed in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Environmental Pollution* 76(1), 33-42.

Pandey, U. B., y 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., y 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), e1005763.

Peters, N. C., Thayer, N. H., Kerr, S. A., Tompa, M., y Berg, C. A. (2013). Following the 'tracks': Tramtrack69 regulates epithelial tube expansion in the *Drosophila* ovary through Paxillin, Dynamin, and the homeobox protein Mirror. *Developmental biology* 378(2), 154-169.

Pierce, B. A. (2009). *Genética: Un enfoque conceptual*. 3ª Ed. Madrid, España: Médica Panamericana. Pp. 84 y 85

Pollack, A. Z., Schisterman, E. F., Goldman, L. R., Mumford, S. L., Albert, P. S., Jones, R. L., y Wactawski-Wende, J. (2011). Cadmium, lead, and mercury in relation to reproductive hormones and anovulation in premenopausal women. *Environmental health perspectives* 119 (8), 1156.

Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). (2002). Productos químicos. Evaluación mundial sobre el Hg. Ginebra, Suiza.

Ramel, C. (1969). Genetic effects of organic mercury compounds. *Hereditas* 61(1-2), 208-230.

Ramel, C. y Magnusson, J., 1969. Genetic effects of organic mercury compounds II. Chromosome segregation in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas* 61, 231–254.

Ramel, C., y Magnusson, J. (1979). Chemical induction of nondisjunction in *Drosophila*. *Environmental Health Perspect* 31, 59.

Ramírez, A. V. (2008). Intoxicación ocupacional por mercurio. En *Anales de la Facultad de Medicina* 69 (1), 46-51.

Ramírez, M. A. Y., García, A. G., y Díaz, J. C. (2004). La contaminación por mercurio en México. *Gaceta ecológica* (72), 21-34.

Rand, M. D. (2010). Drosophotoxicology: the growing potential for *Drosophila* in neurotoxicology. *Neurotoxicology and teratology* 32(1), 74-83.

Reddy, P. S., Tuberty, S. R., y Fingerman, M. (1997). Effects of cadmium and mercury on ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 37(1), 62-65.

Riojas-Rodríguez, H., Schilman, A., López-Carrillo, L., y Finkelman, J. (2013). La salud ambiental en México: situación actual y perspectivas futuras. *Salud Pública De México* 55(6), 638-649.

Rodríguez, R. (2003). *Drosophila* como organismo modelo en la Biología Experimental. En L. Jiménez y H. Merchant (Ed.), *Biología celular y molecular* (pp.761). Pearson Educación: México.

Rodríguez-Perón, J. M., Menéndez-López, J. R., y Trujillo-López, Y. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar* 30(1), 15-20.

Rodríguez-Rey, A., Noris-García, E., y Fundora Torres, M. T. (2016). Principios y relevancia del ensayo cometa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 35(2), 184-194.

Rowland, A. S., Baird, D. D., Weinberg, C. R., Shore, D. L., Shy, C. M., y 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.

Roy, S., Gilbert, M. K., y Hart, C. M. (2007). Characterization of BEAF mutations isolated by homologous recombination in *Drosophila*. *Genetics* 176(2), 801-813.

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

Ryu, T. H., An, K. G., y Kim, J. K. (2014). Genotoxicity in earthworm after combined treatment of ionising radiation and mercury. *Radiation protection dosimetry* 159(1-4), 111-117.

Santalla M., Portiansky, E. L., y Ferrero, P. V. (2016). *Drosophila melanogaster*, un modelo animal emergente en el estudio de enfermedades cardíacas humanas. *Revista Argentina de Cardiol* 84, 424-30.

Sarker, S., Desai, S. R., Verlecar, X. N., Sarker, M. S., y Sarkar, A. (2016). Mercury-induced genotoxicity in marine diatom (*Chaetoceros tenuissimus*). *Environmental Science and Pollution Research* 23(3), 2770-2777.

Schuurs, A. H. B. (1999). Reproductive toxicity of occupational mercury. A review of the literature. *Journal of dentistry* 27(4), 249-256.

Shen, W., Chen, y, Li, C., y Ji, Q. (2000). Effect of mercury chloride on the reproductive function and visceral organ of female mouse. *Journal of hygiene research* 29(2), 75-77.

Sikorski, R., Juskiewicz, T., Paszkowski, T. y Szprengier-Juskiewicz, T. (1987). Women in dental surgeries: reproductive hazards in occupational exposure to metallic mercury. *International archives of occupational and environmental health* 59(6), 551-557.

Silva-Pereira, L. C., Cardoso, P. C. D. S., Leite, D. S., Bahia, M. D. O., Bastos, W. R., Smith, M. D. A. C., y Burbano, R. R. (2005). Cytotoxicity and genotoxicity of low doses of mercury chloride and methylmercury chloride on human lymphocytes *in vitro*. *Brazilian journal of medical and biological research* 38(6), 901-907.

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

Solomon, E. P., Berg, L. R., y Martin, D. W (2008). *Biología*. 8ª Ed. México DF, México: McGraw-Hill Interamericana. Pp. 375 y 377.

Stadnicka, A. (1980). Localization of mercury in the rat ovary after oral administration of mercuric chloride. *Acta histochemica* 67(2), 227-233.

Sun, J., Smith, L., Armento, A., y Deng, W. M. (2008). Regulation of the endocycle/gene amplification switch by Notch and ecdysone signaling. *The Journal of Cell Biology* 182(5), 885-896.

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

Ternes, A.P., Zemolin, A.P., da Cruz, L.C., da Silva, G.F., Saidelles, A.P., de Paula, M.T., Wagner, C., Golombieski R.M., Flores, E.M., Picoloto, R.S., Pereira, A.B., Franco, J.L. y Posser, T. (2014). *Drosophila melanogaster*-an embryonic model for studying behavioral and biochemical effects of manganese exposure. *EXCLI journal* 13, 1239.

Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C. y Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis* 35(3), 206-221.

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

Toro-Restrepo, B. (2011). Uso de los biomarcadores en la evaluación de la contaminación. *Revista Luna Azul* 32, 121-127.

Tyler, M. S. M. S. (2000). *Developmental biology: a guide for experimental study*. 3ª Ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. Pp. (8) 1 y2.

Venereo-Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar* 31(2), 126-133.

Villarejo, A. L. D. (2004). Ecotoxicología y acción toxicológica del mercurio. En *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 70(4).

Vindas, R., Ortiz, F., Ramírez, V., y Cuenca, P. (2004). Genotoxicidad de tres plaguicidas utilizados en la actividad bananera de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 52(3), 601-609.

Von-Stetina, J. R., y Orr-Weaver, T. L. (2011). Developmental control of oocyte maturation and egg activation in metazoan models. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3(10), 1-19.

Wang, Q., Kim, D., Dionysiou, D. D., Sorial, G. A., y Timberlake, D. (2004). Sources and remediation for mercury contamination in aquatic systems—a literature review. *Environmental pollution* 131(2), 323-336.

Watanabe, T., Shimada, T. y Endo, A. (1982). Effects of mercury compounds on ovulation and meiotic and mitotic chromosomes in female golden hamsters. *Teratology* 25(3), 381-384.

Wolfe, M. F., Schwarzbach, S., y Sulaiman, R. A. (1998). Effects of mercury on wildlife: a comprehensive review. *Environ. Toxicol. Chem.* 17(2), 146-160.

Wolpert, L. (2009). *Principios del desarrollo*. 3^a Ed. Madrid, España: Médica Panamericana. Pp. 33-34, 48-52.

Yeşilada, E. (2001). Genotoxicity testing of some metals in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. *Bulletin of environmental Contamination and Toxicology* 66(4), 464-469.

Zappavigna, V., Piccioni, F., Villaescusa, J. C., y Verrotti, A. C. (2004). Cup is a nucleocytoplasmic shuttling protein that interacts with the eukaryotic translation initiation factor 4E to modulate *Drosophila* ovary development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(41), 14800-14805.

Zhang, Q. F., Li, Y. W., Liu, Z. H., y Chen, Q. L. (2016). Reproductive toxicity of inorganic mercury exposure in adult zebrafish: Histological damage, oxidative stress, and alterations of sex hormone and gene expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Aquatic Toxicology* 177, 417-424.

XII. ANEXO

Ensayos con *D. melanogaster* como modelo biológico para la evaluación de la toxicidad de los metales pesados.

Metal pesado	Resultados	Referencia
Zinc catión (Zn^{+2})	Hemocitos de larvas de tercer estadio expuestos a concentraciones 0.35 y 1.7 mM de Zn^{+2} por 3 h, presentan muerte celular.	Filipiak <i>et al.</i> 2012
Hierro(Fe), manganeso (Mn) y cobre (Cu)	A concentraciones de 15 mM (5 días) y 0.5 mM (15 días), estos metales se bioacumulan en las neuronas PL2ab DAergic y PPL3DAergic, ocasionando neurodegeneración y alteración en el movimiento motriz.	Bonilla-Ramirez <i>et al.</i> 2011
AgNO ₃ , Ba(NO ₃) ₂ , Co(NO ₃) ₂ , Cr(NO ₃) ₂ , Fe(NO ₃) ₃ , Hg(NO ₃) ₂ , Mn(NO ₃) ₂ , Ni(NO ₃) ₂ , Pb(NO ₃) ₂ y Zn(NO ₃) ₂ .	<i>D. melanogaster</i> expuesta a las concentraciones 1 y 10mM de diferentes compuestos de nitrógeno metálico y con AgNO ₃ a 0.5 mM durante 10-12 días, causaron disminución en la supervivencia de larvas e individuos adultos y mutagenicidad con la prueba de SMART, siendo Co (NO ₃) ₂ y AgNO ₃ los compuestos más genotóxicos.	Yeşilada, 2001

Cd, Cu, Pb y Zn	Larvas de tercer estadio expuestas a Cd, Cu, Pb y Zn a las concentraciones 0.1, 1.0, 10, 100, 500 y 1000 ppm. En las concentraciones de 500 ppm y 1000 ppm de todos los metales redujeron la supervivencia. También se observó en las concentraciones 500 ppm y 1000 de Cd, Cu y Zn reducción significativa en el desarrollo de las larvas del tercer estadio a adulto.	Al-Momani y Massadeh, 2005
Sulfato de cobre	Con las concentraciones 31 μ M y 47 μ M de sulfato de cobre por 60 días disminuye la sobrevivencia de las moscas. Con la concentración 47 μ M se evaluó actividad motora por 20 días. Al principio las moscas tratadas aumentaron su actividad motora, después de diez días disminuyo.	Arcaya <i>et al.</i> 2013
Plata (AgNP)	Moscas machos fueron expuestas a nanoparticulas a las concentraciones 2 mg/L, 3.5 mg/L o 5 mg/L de AgNP por diez días, lo que ocasionó disminución significativa en el número de células germinales tronco (GSC), en la viabilidad espermática se presentó reducción en la fecundidad, además, los testículos mostraron aumento en los niveles EROs y precoz diferenciación de GSC.	Ong <i>et al.</i> 2016
Hidróxido de metilmercurio, acetato de fenilmercurio y	Las moscas expuestas a hidróxido de metilmercurio (0.13, 0.25, 0.50, 1 mg Hg/l), acetato de fenilmercurio (0.16,	Ramel y Magnusson 1969.

Cloruro de metil etil mercurio	0.32, 0.64 mg Hg/l) y cloruro de metil etil mercurio (1.3, 5,10 y 20 mg Hg/l) por 7-10 días. Se encontró que ocasionan mutaciones en los genes outstretched (od) en el cromosoma X y Curved (c) en el cromosoma 2. El mercurio causó un aumento de descendencia XXY y otras alteraciones en la segregación de los cromosomas por la meiosis.	
Cloruro de manganeso (II) (MnCl ₂)	Huevos hasta la etapa adulta fueron expuestos a las concentraciones 0,1 mM, 0,5 mM o 1 mM. En las concentraciones 0,5 mM y 1 mM MnCl ₂ . Las moscas mostraron mayor actividad locomotora y hubo una inducción de especies reactivas de oxígeno. También se observó un aumento significativo en los niveles de Mn, mientras que los niveles de Ca, Fe, Cu, Zn y S disminuyeron. En la concentración 1 mM se encontró una caída significativa en la viabilidad celular y aumento la expresión de ARNm catalasa, Superóxido Dismutasa y Hsp83.	Ternes <i>et al.</i> 2014.
Nitrato de mercurio (Hg(NO ₃) ₂)	Huevos hasta la etapa adulta fueron expuestos a las concentraciones de 10, 20, 50, 80, 100, 200, 400 mg/l de nitrato de mercurio. Se observó un lento desarrollo larvario y de la pupa. También hubo una disminución significativa en el tamaño de las larvas,	Abnoos <i>et al.</i> 2013.

	en la longitud del tórax del adulto y en la tasa de eclosión, en concentraciones.	
Plomo y cloruro mercúrico	Fueron expuestos huevos de <i>D. melanogaster</i> a las concentraciones 0.001 y 0.005 ppm de plomo y 0.001, 0.002 y 0.003 ppm de cloruro de mercurio hasta el tercer estadio larvario. Se observó que ambos compuestos inducen puffs cromosómicos en el brazo derecho del cromosoma II en los lugares: 21C2, 45B3, 22A1, 22C y 42A. El cloruro de mercurio también produce un puff cromosómico, el 95B3, en el brazo izquierdo del cromosoma III.	Magdum y Shinde 2015
Acetato de plomo	Los huevos de <i>Drosophila</i> (de una línea recombinante derivada de Oregon R y Russian 2b) hasta ser adultos de 4 días fueron expuestos a la concentración 250 μ M de Acetato de plomo. El locus 30AB en el cromosoma 2 sirvió como marcador para la actividad motora. Cuando 30AB era de Russian 2b, el plomo aumentó significativamente la actividad locomotora, mientras que, cuando 30AB era de Oregon R, el plomo disminuyó la actividad.	Hirsch <i>et al.</i> 2009.