



Universidad Nacional Autónoma de
México

Facultad de Ciencias

Efecto transgeneracional del Etil
carbamato en *Drosophila melanogaster*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

PRESENTA:

Magnolia Natali Rodríguez Monjarás



DIRECTORA DE TESIS:
Dra. Patricia Ramos Morales

Ciudad Universitaria, Cd. México
2019



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

Rodríguez

Monjarás

Magnolia Natali

58 65 90 11

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

308146994

2. Datos del asesor

Dra.

Patricia

Ramos

Morales

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Bertha

Molina

Álvarez

4. Datos del sinodal 2

Dra.

María Eugenia

Gonsebatt

Bonaparte

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Rodrigo

González

De la Parra

6. Datos del sinodal 4

Biól.

Estefania

Arroyo

Jilote

7. Datos del trabajo escrito.

Efecto transgeneracional del Etil-carbamato en *Drosophila melanogaster*.

89p.

2019

Este trabajo fue elaborado en el Laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Este proyecto fue patrocinado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (IN-229719).

El material biológico utilizado para la realización de este trabajo fue otorgado por el Banco de Moscas de la Facultad de Ciencias, UNAM.



Agradecimientos

A mis padres Natividad Monjarás Rodríguez y Hugo Rodríguez León les agradezco por ser mis maestros en esta vida, gracias por todo el amor y sabiduría que he recibido incondicionalmente, por inculcarme la educación y el estudio como la base fundamental del desarrollo personal, intelectual y profesional, muchas gracias por que todos sus esfuerzos y sacrificios han dado resultados ya que la culminación de esta etapa no sería posible sin su apoyo y perseverancia.

A mi hermano Christian Rodríguez por todos los momentos que hemos compartido, gracias por hacerme ver la vida desde otra perspectiva, porque siempre aprendo algo nuevo junto a ti.

A los demás integrantes de mi familia, quienes siempre han creído en mí, dándome ejemplo de superación, humildad y sacrificio, muchas gracias por todas sus palabras de aliento, el amor y la confianza que me han brindado..

A Víctor Pérez Tenorio por tu cariño, apoyo y comprensión constante, por impulsarme a siempre dar lo mejor de mí, muchas gracias por estar conmigo siempre y en todo momento.

A la Dra. Patricia Ramos Morales por haberme dado la oportunidad de trabajar con usted, gracias por ampliar mi visión de la genética, por todo el apoyo, el conocimiento recibido y por las maravillosas experiencias compartidas. Gracias por ser una inspiración excepcional con esa manera tan única de transmitir su conocimiento, con tanta dedicación y gusto por lo que hace.

A la Dra. Bertha Molina y el Dr. Rodrigo González por haberme abierto las puertas de sus respectivos laboratorios, por compartirme su conocimiento y porque gracias a ustedes conocí a personas igualmente extraordinarias, gracias por su valioso tiempo para la revisión y mejoramiento de este trabajo.

A todos los profesores del Laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental: a la Biól. Blanca Hernández, M. en C. Estefanía Arroyo, M. en C. Yaneli Trujillo, Biól. Hugo Rivas y Dra. Adriana Muñoz por su apoyo técnico, sus enseñanzas y valiosos comentarios en la realización de este trabajo.

Y por supuesto agradezco infinitamente a la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Ciencias y a los profesores que participaron en mi formación profesional.

INDICE

Resumen	6
1. Introducción	8
1.1. Toxicología	8
1.1.1. Toxicología genética	10
1.2. Cáncer e Inestabilidad genómica	11
1.3. Efecto mutigeneracional	12
1.4. Características del Etil Carbamato	14
1.4.1. Tipos de exposición y usos	15
1.4.2. Metabolismo	18
1.4.3. Efecto mutagénico y carcinogénico	20
1.5. <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo biológico	22
1.5.1. Ciclo de vida	23
1.5.2. Discos imagales	24
1.6. Prueba de Mutación Somática y Recombinación Mitótica (SMART)	25
2. Justificación	27
3. Hipótesis	28
4. Objetivos	28
4.1. General	28
4.2. Particulares	28
5. Materiales y Métodos	29
5.1. Preparación del EC	29
5.2. Cruza SMART	29
5.3. Procedimiento experimental	30
5.3.1. Tratamiento a las moscas transheterocigotas de la cruza SMART	31
5.3.2. Tratamiento a las líneas de las cruza SMART modificada	32
5.3.3. Preparación de laminillas	33
5.3.4. Criterios de registro	33
5.4. Análisis estadístico	36
5.4.1. Supervivencia y proporción sexual	36
5.4.2. Efecto reprotóxico: fertilidad y progenie por familia	37
5.4.3. Frecuencia de mutación somática y recombinación mitótica	38

6. Resultados	39
6.1. Efecto del EC en moscas de la craza SMART	39
6.1.1. Supervivencia y Proporción Sexual	39
6.1.2. Frecuencia de mutación somática y recombinación mitótica	42
6.2. Efecto del EC en las líneas de la craza SMART modificada	44
6.2.1. Supervivencia y Proporción Sexual	44
6.2.2. Daño reprotóxico: fertilidad, progeñie por familia y proporción sexual	47
6.2.3. Daño multigeneracional	54
6.2.3.1. Frecuencia de manchas chicas, grandes y totales	54
6.2.3.2. Distribución de la frecuencia de células por mancha	57
6.2.3.3. Distribución de la frecuencia de manchas por mosca	61
7. Discusión	66
7.1. Efecto del EC en las moscas de la craza SMART	66
7.2. Efecto del EC en las líneas de la craza SMART modificada	67
7.2.1. Daño reprotóxico en los sistemas de craza SMART modificada	68
7.2.2. Daño multigeneracional del EC en los sistemas de craza SMART modificada	70
7.2.2.1. Cruza NT x T – macho progenitor tratado	70
7.2.2.2. Cruza T x NT – hembra progenitora tratada	71
7.2.2.3. Cruza T x T – ambos progenitores tratados	72
7.3. Consideraciones finales	74
8. Conclusiones	75
9. Referencias	76

RESUMEN

Los cambios en el ambiente a lo largo de la vida de un organismo pueden alterar la calidad, cantidad y expresión de su material genético. No obstante, se ha estudiado poco acerca del impacto que comprende la exposición parental ante diversos agentes químicos, físicos y biológicos antes de la concepción, como un posible factor desencadenante de consecuencias perjudiciales en la descendencia, tanto a nivel germinal como somático. El uso de un modelo como *Drosophila melanogaster* es ideal debido a su fácil manipulación genética, alta plasticidad fenotípica que con frecuencia depende de factores ambientales y es posible establecer el efecto del compuesto que se esté investigando en una descendencia numerosa, así como hacer su seguimiento a través de múltiples generaciones en un corto periodo de tiempo.

En este trabajo se tuvo como objetivo determinar el efecto de un compuesto genotóxico como el etil carbamato en la frecuencia de mutación somática y recombinación mitótica en las células somáticas de las alas de moscas expuestas y en su progenie no expuesta. La pérdida de heterocigosidad de los marcadores genéticos: *mwh* y *flr³* a lo largo del desarrollo larval, lleva a la formación de manchas mutantes en el contexto silvestre de las alas de las moscas adultas. Las cepas *mwh,e/mwh,e* y *flr³/In(3LR)TM3, eBd^S* se expusieron durante el estadio larval al etil carbamato, para después recobrar a los adultos y realizar tres sistemas de cruce: 1) Hembra Tratada X Macho Tratado, 2) Hembra Tratada X Macho No Tratado, 3) Hembra No Tratada X Macho Tratado; con la finalidad de determinar si se producía daño multigeneracional a nivel de las células somáticas de la descendencia transheterocigota (*mwh, +/+*, *flr³*) y evaluar si se presenta una contribución diferencial en la progenie según el origen parental de la exposición. Se evaluaron diferentes biomarcadores (Fecundidad, Fertilidad, Proporción Sexual) y la frecuencia de manchas inducidas en las alas, su tamaño (células/mancha) y la susceptibilidad del daño en la progenie (manchas/mosca), los dos últimos biomarcadores se compararon con los obtenidos en la cruce estándar.

La fertilidad y fecundidad tuvieron diferentes respuestas en los tres tipos de cruce; cuando ambos padres fueron tratados hubo mayor fertilidad y fecundidad al igual que mayor frecuencia de mutación somática en comparación con su testigo y con las demás cruces. Por otro lado, se encontró un efecto diferencial entre el origen parental de los gametos expuestos,

puesto que cuando el gameto materno fue expuesto, la fecundidad se mantuvo igual o menor que su testigo. Mientras que, cuando el gameto masculino fue expuesto, la fertilidad se mostró más perjudicada y hubo un significativo descenso en la frecuencia de mutación somática y recombinación mitótica. Esto se explicó por las diferentes aportaciones que realiza cada gameto al nuevo organismo y los particulares mecanismos de reparación implicados.

Por lo anterior, la exposición de los humanos a agentes genotóxicos es un factor importante a tomar en cuenta para el daño multigeneracional, ya que, si sus células germinales están dañadas y después ocurre la fertilización, las lesiones en el DNA de los gametos pueden no estar del todo reparadas o no correctamente y por consiguiente, las células somáticas del cigoto manifestarán una mayor susceptibilidad a presentar inestabilidad genómica en sus distintos niveles, lo que podría explicar en parte, la aparición temprana de cáncer en la descendencia de los progenitores expuestos al agente genotóxico.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Toxicología

La toxicología es la ciencia que se ocupa de la detección, la composición química y la acción de agentes físicos o químicos, así como el efecto, el tratamiento, la ocurrencia y la prevención de sus efectos en los distintos organismos (Casarett *et al.*, 2008).

Uno de los objetivos relevantes en las ciencias biológicas y en la investigación biomédica es la evaluación de los riesgos potenciales que enfrentan los organismos ante dichos agentes y la determinación de los efectos biológicos a fin de establecer medidas preventivas para minimizar esta exposición o para adoptar medidas de protección a corto, mediano y largo plazo para la salud humana y el ecosistema, en general (Gibson y Skett, 2001).

Los factores biológicos intrínsecos que son determinantes en la toxicidad de un xenobiótico, además de sus propiedades inherentes incluyen: la duración de la exposición, la dosis administrada, la edad del organismo, así como los procesos de absorción, distribución y eliminación en las células y en el individuo (Medinsky y Valentine, 2001; Filser, 2008).

La mayoría de los xenobióticos que ingresan al organismo son lipofílicos, esto permite que penetren a través de las membranas lipídicas, sean transportados por lipoproteínas en la sangre y finalmente alcancen el órgano blanco; en ausencia de medios eficaces para la excreción constante de estos agentes químicos, éstos se acumularán hasta generar toxicidad o incluso la muerte del organismo (Gibson y Skett, 2001).

Los seres vivos han desarrollado mecanismos excretores eficientes que incluyen una serie de procesos bioquímicos para convertir las sustancias químicas lipofílicas a productos hidrosolubles y ayudar en su excreción, estos procesos enzimáticos son reacciones de biotransformación de fase I y fase II.

En las reacciones de fase I, las enzimas como las microoxigenasas y peroxidasas microsomales, oxidasas citosólicas y mitocondriales y enzimas hidrolíticas, se encargan de oxidar, reducir o hidrolizar al xenobiótico. Los citocromos P450 constituyen el sistema de enzimas más importante en las reacciones de la fase I (Guengerich, 2008).

Las enzimas del citocromo P450 y las reductasas están incrustadas en la matriz de fosfolípidos del retículo endoplásmico. La matriz de fosfolípidos es crucial para la actividad enzimática, ya que facilita la interacción entre ambas enzimas. En los vertebrados, las mayores concentraciones de citocromo P450 se encuentran en el hígado, sin embargo, también están presentes en pulmón, riñón, testículos, piel y el tracto gastrointestinal (Rendic, 1997).

Todas las enzimas del citocromo P450 comparten el grupo hemo, pero difieren en la estructura de la cadena polipeptídica, lo que les confiere una reacción metabólica específica (Ding y Kaminsky, 2003).

La fase II del proceso de biotransformación, requiere de un conjunto de enzimas, la mayoría de ellas localizadas en el citoplasma, que catalizan reacciones de conjugación en las que compuestos de alta energía donan grupos polares a los metabolitos provenientes de la fase I con la finalidad de obtener compuestos más solubles (Dekant, 2009).

El propósito general de las reacciones de biotransformación es la desintoxicación sin embargo, conforme a la estructura química del compuesto y de la enzima que cataliza la reacción, los xenobióticos se pueden transformar en metabolitos aún con un mayor potencial de toxicidad que el compuesto original, este proceso se denomina bioactivación (Filser, 2008; Dekant, 2009).

La interacción del metabolito tóxico con macromoléculas inicia acontecimientos que finalmente pueden dar lugar a la muerte celular, cáncer, insuficiencia de órganos y otras manifestaciones de toxicidad. En la actualidad, la toxicología cuenta con una amplia variedad de disciplinas que se encargan de responder distintas cuestiones y particularidades que presenta cada compuesto, entre ellas la Toxicología Genética.

1.1.1. Toxicología genética

La Toxicología Genética se enfoca en el estudio de los agentes químicos, físicos y biológicos que interactúan y pueden dañar el DNA y/o las proteínas asociadas a esta macromolécula en cualquiera de sus distintos niveles de compactación desde las bases nitrogenadas hasta la estructura cromosómica (Lodola y Stadler, 2011).

Los agentes genotóxicos pueden inducir rupturas de las cadenas de DNA, cambios de las bases nitrogenadas o formar complejos entre el genotóxico y el DNA o las proteínas, lo que obstaculiza la organización y expresión de la información genética y puede generar alteraciones en el genoma (Alberts *et al.*, 2011).

Las alteraciones en el DNA se pueden clasificar en (Langie *et al.*, 2015):

a) mutaciones puntuales, es decir, cambios en una sola base nitrogenada, que puede generar la adición, pérdida o sustitución (transición o transversión) de una base y tener consecuencias a nivel transcripcional y/o traduccional.

b) mutaciones estructurales como deleciones, inserciones, inversiones o translocaciones, suscitando amplificaciones de genes o rearrreglos cromosómicos que podrían tener efectos en la replicación y transcripción.

c) mutaciones numéricas, que se refiere a la adquisición o pérdida de cromosomas completos o segmentos de éstos (aneuploidías) a causa de fallas en la segregación de los cromosomas.

Por lo tanto, se han diseñado distintos ensayos *in vitro* e *in vivo* para detectar uno a más tipos de alteraciones genéticas, comprender los mecanismos de acción de los compuestos y las consecuencias biológicas en las células con el fin de identificar los riesgos a los que están expuestos los seres vivos.

La toxicología genética también se encarga de determinar si un compuesto es o no carcinógeno y clasificarlo con base en la existencia de estudios realizados en humanos y/o animales que permiten establecer la existencia o sospecha de una relación causal entre la exposición al compuesto y la aparición de cáncer (Phillips y Arlt, 2009).

1.2. Cáncer e Inestabilidad genómica

El cáncer es el resultado final de un proceso en el que un solo linaje clonal acumula de forma gradual mutaciones que otorgan a las células propiedades adaptativas y proliferativas como: 1) autosuficiencia en señales de crecimiento, 2) insensibilidad a inhibidores del crecimiento, 3) evasión de la muerte celular programada (apoptosis), 4) potencial replicativo ilimitado, 5) angiogénesis sostenida, 6) invasión de tejidos y metástasis, 7) vías metabólicas anormales y 8) evasión del sistema inmune (Hanahan y Weinberg, 2011; Martincorena *et al.*, 2017).

El cáncer se caracteriza porque las células afectadas tienen una tasa de proliferación superior a la normal, por ese motivo es crucial descifrar los mecanismos iniciales de la transición hacia un estado maligno. Diversos autores plantean que la Inestabilidad Genómica (IG) es la fuerza motriz para la transformación de una célula normal a una célula precancerosa; la acumulación de subsiguientes alteraciones permitirá a algunas de las células adquirir diferentes propiedades distintivas de las células neoplásicas hasta un estado clínico diagnosticado como cáncer (Negrini *et al.*, 2010; Loeb, 2011; Hanahan y Weinberg, 2011; Giam y Rancati, 2015).

La IG se refiere al incremento en la propensión a adquirir alteraciones genéticas, abarcando desde cambios en un sólo nucleótido hasta todo el cromosoma y es consecuencia de las mutaciones que afectan distintas vías que regulan: *i.*- fidelidad de replicación del DNA, *ii.*- segregación cromosómica correcta en la mitosis, *iii.*- reparación eficiente del DNA a lo largo del ciclo celular, *iv.*- regulación de los puntos de control y progresión en el ciclo celular (Negrini *et al.*, 2010; Shen, 2011; Aguilera y García-Muse, 2013; Pikor *et al.*, 2013).

Cabe destacar que la cantidad y los distintos tipos de IG (nucleotídica, microsatélites, cromosómica) pueden presentar en un mismo tumor, esto facilita que las poblaciones de células cancerosas se adapten a los microambientes fluctuantes que existen, lo cual contribuye a la heterogeneidad en un mismo tipo de cáncer (Merlo y Maley 2010; Lee *et al.*, 2011; Pikor *et al.*, 2013).

1.3. Efecto multigeneracional

Varios estudios se han centrado en el hecho de que la exposición parental a agentes químicos en la edad adulta puede incrementar la incidencia de infertilidad, abortos, malformaciones y/o enfermedades en la descendencia como el cáncer (Tomatis, 1994; Marchetti *et al.*, 2007; ACOG, 2013).

La evidencia más contundente se ha encontrado en la incidencia de leucemia infantil y la exposición de los padres a disolventes (Colt y Blair, 1998), pinturas y pesticidas (Wigle *et al.*, 2009; Van Maele-Fabry *et al.*, 2010), así como el consumo de alcohol y de cigarro (Ji *et al.*, 1997; MacArthur *et al.*, 2008) y la exposición a solventes e hidrocarburos aromáticos incrementaron los casos de tumores del sistema nervioso en la siguiente generación (Huoi *et al.*, 2014; Spycher *et al.*, 2017).

Este fenómeno se denomina efecto multigeneracional, que se define como la transmisión de algún efecto a través de la línea germinal a la siguiente generación en ausencia de la exposición directa al factor estresante inicial (Skinner, 2008; Glen y Dubrova, 2012; Hanson y Skinner, 2016).

A pesar de que los mecanismos moleculares implicados en el efecto multigeneracional no se conoce del todo, se tiene evidencia que los mecanismos de reparación actúan en diferentes momentos dependiendo de la célula germinal que se esté generando (espermatozoide u óvulo) (Ashwood y Edwards, 1996; Baarends *et al.*, 2001; Olsen *et al.*, 2005).

Por otra parte, las células embrionarias contienen citoplasma con altos niveles de RNAm, proteínas, mitocondrias, ribosomas y otros organelos celulares que fueron proporcionados exclusivamente de la vía materna. También presentan una fase G1 del ciclo celular corta, una rápida proliferación y son más propensas a activar casacadas de muerte celular en respuesta al daño en su genoma (Cervantes *et al.*, 2002; Bloom *et al.*, 2019).

Otro aspecto que se debe tomar en consideración para explicar el efecto multigeneracional son las marcas epigenéticas que se establecen durante determinados periodos críticos en la vida fetal y neonatal (Langie *et al.*, 2013; Bunkar *et al.*, 2016).

Las marcas epigenéticas son aquellas que remodelan la condensación de la cromatina en ausencia de cualquier alteración en la secuencia del ADN tal como, la metilación de los sitios CpG en el ADN (ya sea hipometilación o hipermetilación), modificaciones postraduccionales en las colas N-terminal de las histonas (metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación y sumoilación) y los distintos tipos de RNAs no codificantes (RNAi, RNAncl, miRNA, siRNA, piRNA) (Bunkar *et al.*, 2016).

Cada vez existe mayor evidencia de que la exposición de los progenitores a agentes químicos, disruptores endocrinos o su estilo de vida puede tener un impacto permanente en la estructura y función de los tejidos (fenotipo) de la siguiente generación (Langie *et al.*, 2013) e incluso en generaciones subsecuentes (Fernandez-Twinn *et al.*, 2015).

1.4. Características del Etil Carbamato

El etil carbamato (EC) generalmente llamado uretano, es un etil éster de ácido carbámico. Su fórmula química es $C_3H_7NO_2$ y su peso molecular es de 89.1 g/mol. Es un compuesto sólido en forma de cristales, de color blanco, sin olor, soluble en agua (1g/0.5 mL), etanol (1g/0.8 mL) y otros disolventes orgánicos (IARC, 2010).

El EC se produce al reaccionar etanol con urea (Fig. 1), o por el calentamiento de nitrato de urea con etanol y nitrato de sodio (Budavari, 2001). Es un compuesto ampliamente estudiado en distintos organismos y se considera un promutágeno de referencia porque la actividad metabólica de los organismos modifica y potencia su función genotóxica.

La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) lo ha clasificado como un probable carcinógeno en humanos (grupo 2B), esto respaldado por experimentos en distintos modelos animales (IARC, 2010).

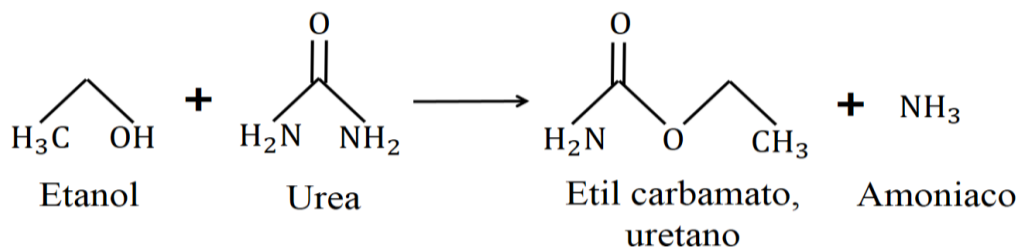


Fig. 1 Reacción química para la formación de etil carbamato (Modificado de Zimmerli y Schlatter, 1991).

1.4.1. Tipos de exposición y usos

El EC se sintetizó en 1944 y se empleó comercialmente durante 30 años, teniendo una gran variedad de usos; para la fabricación de meprobamato, un relajante muscular y tranquilizante (desacelera la actividad del Sistema Nervioso Central) (Adams y Baron, 1965), en la preservación de tejidos de poliéster/algodón y como solvente en los acondicionadores para el cabello (Adams y Baron, 1965; IARC, 2010).

En humanos, el EC se utilizó como co-disolvente de analgésicos insolubles en agua utilizados para el dolor post-operatorio (Nomura, 1975), como agente anti-neoplásico de varios tipos de cáncer en dosis de hasta 3 g/día para mieloma múltiple (Paterson *et al.*, 1946; Hirschboeck *et al.*, 1948). Actualmente el uso del EC está restringido como anestésico para animales de laboratorio (Hara y Harris, 2002).

En el campo de la agricultura, Kolbezen y colaboradores (1954) produjeron los primeros insecticidas compuestos de N-metilcarbamato, un derivado del EC (Kolbezen *et al.*, 1954). Los pesticidas de carbamato son ampliamente utilizados como insecticidas, herbicidas y fungicidas. Su uso anual a nivel mundial se estima entre 20,000 a 35,000 toneladas (CDC, 2003).

Los insecticidas de carbamato inhiben por carbamitación a la enzima acetilcolinesterasa (AChE) que genera un aumento de acetilcolina en ciertas terminaciones nerviosas lo que desencadena varios síntomas (como debilidad, convulsiones, temblores, parálisis) hasta llegar a la muerte. Los insecticidas de carbamato tienen una estructura semejante a la acetilcolina (Fig. 2) en consecuencia, no necesitan ser activados como los insecticidas organofosforados (OF) para lograr su toxicidad.

Esto les ha brindado ventajas a los insecticidas de carbamato frente a otros insecticidas como; ser una alternativa ante las plagas resistentes a otros insecticidas, ser menos persistentes en el suelo (de 1 a 4 meses) por lo que tienden a no bioacumularse (Plese *et al.*, 2005) e inhibir por un tiempo más corto (de manera reversible) la actividad de la AChE y por lo tanto causan un envenenamiento menos severo que los pesticidas OF (Kolbezen *et al.*, 1954; Fukuto, 1979).

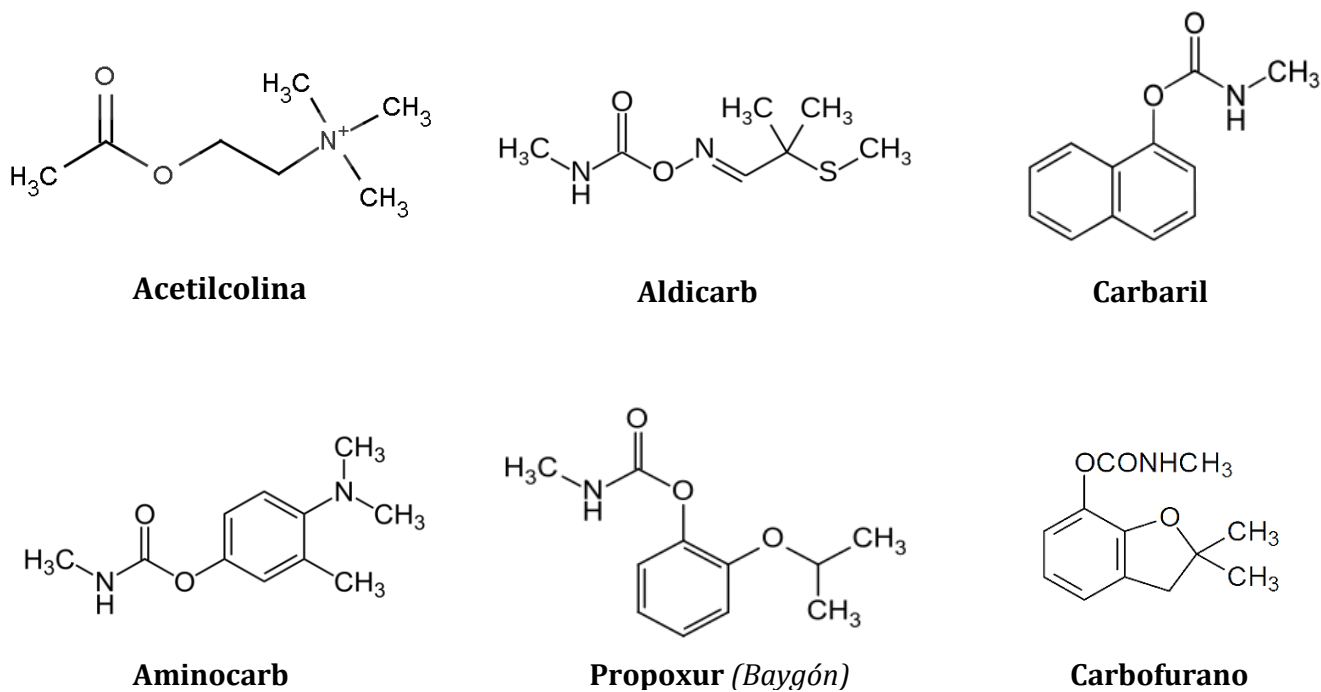


Fig. 2 Estructura química de algunos de los insecticidas de carbamato más utilizados en la industria agroalimentaria (Modificado de Metcalf, 2000).

Actualmente se conocen más de 50 tipos de insecticidas que tienen como químico principal un éster de carbamato, los cuales son eficaces contra uno o varios tipos de larvas u insectos, arácnidos, nematodos, caracoles y/o babosas. El insecticida llamado propoxur se comercializa como reemplazo del DDT y se utiliza para controlar insectos domésticos como cucarachas, chinches, arañas, avispas y para el control de la malaria, entre otros (Metcalf, 2000).

La exposición de la población general a estos plaguicidas ocurre principalmente por ingestión de alimentos o animales que han estado en contacto o consumido dicho compuesto. Otras fuentes de exposición ocurren a través de la inhalación de partículas o por contacto dérmico; ya sea en el lugar de trabajo durante la fabricación, aplicación y recolección de cultivos agrícolas o durante su uso residencial en casas u oficinas (Metcalf, 2000; CDC, 2003).

Por otro lado, el EC se genera de manera natural como consecuencia de la fermentación de algunos alimentos fermentados y bebidas alcohólicas (Tabla 1). El amplio rango de concentraciones de EC está sujeto a condiciones ambientales, principalmente la exposición a la luz, la temperatura y el tiempo de almacenamiento (Zimmerli y Schlatter, 1991; Suzuki *et al.*, 2001).

La formación de EC en las bebidas alcohólicas ocurre por dos procesos:

- 1) Por la reacción del etanol con la urea presente en el medio, que se libera por el metabolismo de la arginina por parte de las levaduras (Ough *et al.*, 1988; Battaglia *et al.*, 1990).
- 2) En los licores derivados de frutas con hueso (durazno, la ciruela y la cereza) debido a la remoción de glucósidos cianogénicos por acción enzimática (principalmente β -glucosidasa) se forma cianuro el cual, es oxidado a cianato y al reaccionar con el etanol se forma EC (An y Ough, 1993; Aresta *et al.*, 2001; Lachenmeier *et al.*, 2005).

Tabla 1. Ocurrencia de etil carbamato en alimentos fermentados y bebidas alcohólicas.

Producto	Año	N° muestras	Rango de EC (mg/L)	Referencia
Pan		33	0.8 – 12	
Yogurt y otros productos de Leche	1988-90	19	<0.1 – 0.3	Vahl (1993)
Kimchi	2000	20	3.5 – 16.2	Kim <i>et al.</i> (2000)
Salsa de Soya		15	10.1 – 73.3	
Vinagre		5	0.3 – 2.5	
Soju	2006	7	0.8 – 10.1	Ha <i>et al.</i> (2006)
Takju		7	0.4 – 0.9	
Vino Tinto Italiano		30	6 – 22	
Vino Blanco Italiano	2000	30	6 – 16	Cerutti <i>et al.</i> (2000)
Vino Rosado Italiano		30	7 – 15	
Vino Merlot		17	1.8 – 32.4	
Vino Gamay	2002	3	3.4 – 6.5	Francisquetti <i>et al.</i> (2002)
Vino Pinot Blanc		5	2.7 – 10.1	
Vinos Tintos		9	2.4 – 36.2	
Vino Tinto Español	2004	36	0 – 25	Uthurry <i>et al.</i> (2004)
Vino	2006	3	1.7 – 11.7	Ha <i>et al.</i> (2006)
Cerveza		6	0.5 – 0.8	

1.4.2. Metabolismo

El EC puede ingresar al cuerpo mediante diversas rutas de exposición: absorción, inhalación, ingestión e inyección subcutánea (National Toxicology Program, 2004). En estudios realizados en diferentes roedores se mostró que el EC se absorbe fácilmente a través de la piel, puede inmunosuprimir la médula ósea y puede llegar a la descendencia puesto que atraviesa la barrera placentaria o por medio de la leche materna (Zimmerli y Schlatter, 1991; IARC, 2010).

Se ha determinado que existen 3 vías por las cuales se metaboliza el EC (Fig. 3):

- 1) Mediante las enzimas esterasas; el EC se degrada en CO₂ y NH₃ (< 1%).
- 2) Por hidroxilación, llevando a la formación de metabolitos como N-hidroxi-etil-carbamato y N-acetil-N-hidroxi-etil-carbamato, que son excretados en la orina (Boyland y Nery, 1965).
- 3) Por oxidación, en la que participan los citocromos P450, principalmente el citocromo CYP2E1 que bioactiva al EC convirtiéndolo en vinil carbamato epóxido (VCE) (96%).

El VCE es un metabolito electrofílico altamente reactivo con el DNA dado que alquila distintas bases nitrogenadas como la guanina, la citosina y la adenina ocasionando aductos: 7-(2oxoetil) desoxiguanosina (Fig. o), 3, N⁴-etenodesoxicitidina y 1, N⁶etenodesoxiadenosina (Guengerich y Kim, 1991), por lo tanto, juega un papel principal en la carcinogénesis de mamíferos (Park *et al.*, 1993; Levine *et al.*, 2000; Hoffler *et al.*, 2005).

La alquilación de las bases nitrogenadas es seguida de otras reacciones como la despurinación, esto promueve sitios abásicos en el material genético y junto con otros tipos de lesiones, puede provocar mutaciones genéticas y aberraciones cromosómicas (Lajovic *et al.*, 2015).

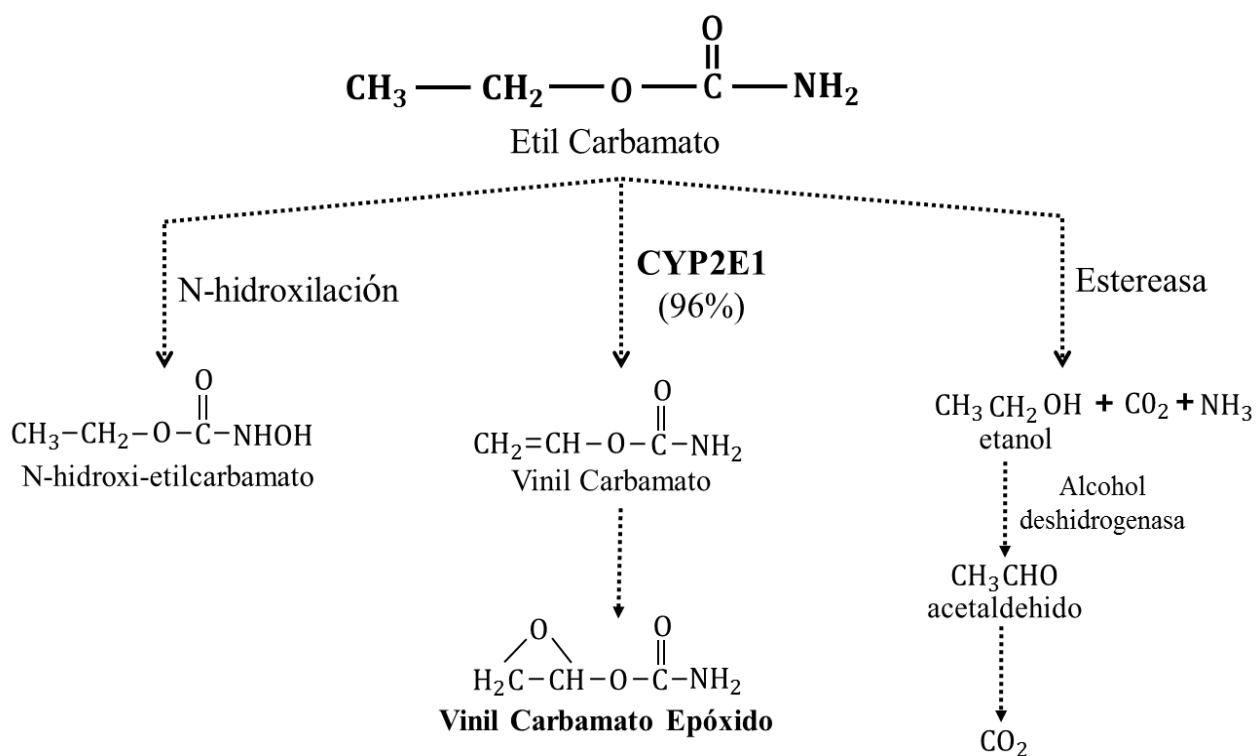


Fig. 3 Rutas metabólicas del Etil-Carbamato (Modificado de Ghanayem, 2007)

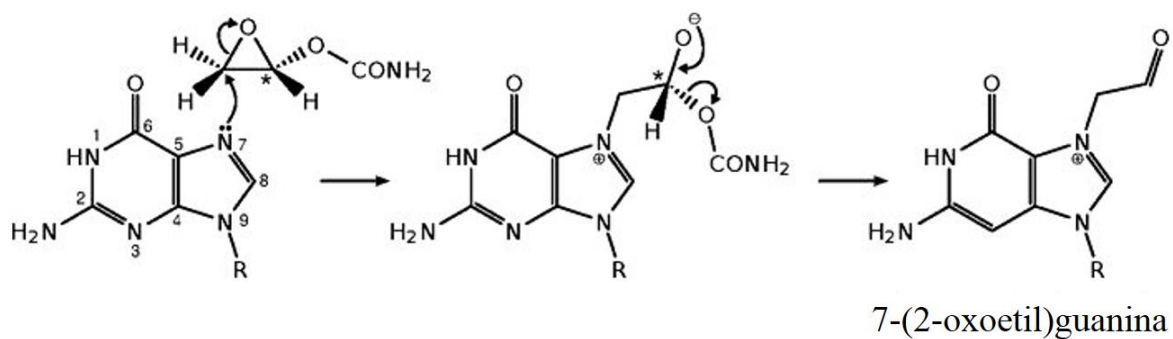


Fig. 3 Ejemplo de la reacción química entre Vinil Carbamato Epóxido (VCE) y la base nitrogenada Guanina para originar el aducto 7-(2oxoetil) desoxiguanosina (Modificado de Lajovic *et al.*, 2015).

1.4.3. Efecto mutagénico y carcinogénico

En bacterias como *Salmonella typhimurium* (ensayo de Ames) y en hongos como *Saccharomyces cerevisiae* (Sharp y Parry, 1981; Galli y Schiestl; 1996) y *Aspergillus nidulans* (Crebelli *et al.*, 1986) el EC no mostró evidencia de mutagenicidad ni de inducción de recombinación intracromosómica.

En *Drosophila melanogaster*, el EC aumentó la frecuencia de mutación somática y recombinación mitótica (Frölich y Würgler, 1990; Graf y van Schaik, 1992), modificó la capacidad reproductiva (fecundidad) en concentraciones bajas y periodos agudos de exposición en larvas de tercer estadio (Meza-González, 2015) y en células germinales del macho indujo translocaciones recíprocas (Oster, 1958).

Se ha evaluado su capacidad carcinogénica en ratón, rata y hámster, la incidencia de adenomas y carcinomas en hígado, pulmones, linfomas tímicos y leucemias a distintas concentraciones (Kay y Trainin, 1966; Allen *et al.*, 1986; Beland *et al.*, 2005) y en células *in vitro*, en roedores y leucocitos humanos el EC indujo intercambio de cromátidas hermanas (Abe y Sasaki, 1977), rompimiento de cadenas de DNA (Petzold y Swenberg, 1978) y aberraciones cromosómicas (He *et al.*, 1991; Hoffler *et al.*, 2005)

La exposición al EC durante la gestación en los roedores, produjo anomalías en el feto, principalmente paladar hendido, polidactilia, espina bífida y en algunos casos reabsorción de los fetos (Ferm y Hanover, 1966; Nomura, 1977; Burkhard *et al.*, 1987).

Por otro lado, se han realizado estudios con distintos tipos de insecticidas de carbamato, entre ellos, carbofurano, carbarilo y aldicarb encontrándose efectos tóxicos en aves, peces y abejas (Ibrahim y Harabawy, 2014). Se han encontrado asociaciones significativas entre el aldicarb y la presencia de cáncer de colon (4.1 veces mayor riesgo) (IC_{95%} 1.3-12.8) (Lee *et al.*, 2007) y el carbaril y la presencia de melanoma (1.7 veces mayor) (IC_{95%} 1.1-2.5) (Dennis *et al.*, 2010).

El carbaril en un cultivo *in vitro* de células primarias de la granulosa humana inhibió la biosíntesis de progesterona basal (Cheng *et al.*, 2006). En ratas que fueron alimentadas con carbaril se encontró disminución en la cantidad y motilidad de los espermatozoides, además de anomalías en su morfología (Pant *et al.*, 1996).

En trabajadores agrícolas expuestos al carbaril se encontró aumento en la fragmentación del DNA y aberraciones cromosómicas numéricas en espermatozoides (Xia *et al.*, 2005).

El carbofurano, administrado vía oral a ratones hembra mostró disminución significativa en el número de ciclos del estro, en la duración de las fases de cada ciclo y en el número de folículos sanos (Baligar y Kaliwal, 2002). En otro estudio realizado en ratas macho, el carbofurano fue inyectado vía subcutánea y se registró aumento significativo en los niveles de progesterona, cortisol y estradiol, mientras que los niveles de testosterona disminuyeron (Goad *et al.*, 2004).

Los trabajos antes mencionados coinciden en que el EC afecta la esteroidogénesis en animales y humanos por lo tanto, se podría considerar un disruptor endocrino, que es cualquier sustancia química capaz de alterar la producción, liberación, transporte, metabolismo, unión, acción o eliminación de las hormonas naturales en el cuerpo (EPA, 1997; Myers y Hesler, 2007). Esto es de gran relevancia ya que la población está expuesta a los insecticidas de carbamato a través de su uso continuo en el hogar.

1.5. *Drosophila melanogaster* como modelo biológico

Drosophila melanogaster fue un recurso esencial para la genética clásica sin embargo, durante la última mitad del siglo XX con la revolución de la biología molecular y la secuenciación de su genoma (Adams *et al.*, 2000) se corroboró como un modelo *in vivo* central para la comprensión de procesos biológicos en eucariontes; como el desarrollo embrionario (Lawrence, 1992), el ciclo celular (Lee y Orr Weaver, 2003), el desarrollo y función del sistema nervioso (Bellen *et al.*, 2010) y en aspectos moleculares de distintas enfermedades humanas (Bier, 2005).

En el área de la Toxicología Genética, *Drosophila melanogaster* es considerada una especie no mamífero imprescindible para la evaluación *in vivo* de los efectos producidos por distintos xenobióticos, incluyendo los promutágenos (sustancias que para ser tóxicas tienen que ser metabolizadas) puesto que posee complejos enzimáticos dependientes de citocromos P450 semejantes a los que se presentan en la fracción S9 del hígado de los mamíferos, responsables del metabolismo oxidativo del compuesto original (Vogel, 1975; Hällstrom *et al.*, 1981; Graf *et al.*, 1983).

Cabe resaltar que la actividad metabólica durante la etapa larvaria acontece con mayor eficiencia en el tercer estadio (Hällstrom *et al.*, 1981; Clark 1982), dado que los citocromos P450 se expresan en el tubo digestivo y los cuerpos grasos, mientras que en la mosca adulta éstos se encuentran principalmente en los tubos de Malpighi y en el aparato reproductor (Tijet *et al.*, 2001).

D. melanogaster presenta además otras ventajas como, ciclo de vida corto (10 a 12 días a 25°C), descendencia abundante, mantenimiento de bajo costo y una gran cantidad de líneas mutantes que facilitan el estudio de diferentes mecanismos genéticos y fisiológicos tanto a nivel somático como germinal (Graf *et al.*, 1984; Ramos-Morales *et al.*, 1993, 2000).

1.5.1. Ciclo de vida

Drosophila melanogaster es un insecto de la familia *Drosophilidae* y del orden Diptera, presenta metamorfosis completa (holometábolo) de la que surge un imago o adulto. El ciclo de vida comienza con la fecundación del huevo, el cual es depositado en el exterior, iniciándose la embriogénesis, aquí se determina la polaridad antero-posterior y más tarde la dorso-ventral. También se establecen dos linajes celulares que presentará durante el estadio larval: las células larvianas y las células imagales, estas últimas forman las estructuras de la mosca adulta (Fig. 5) (Cohen, 1993)

Después de aproximadamente 24 horas, del huevo eclosiona una larva de 1° estadio que después pasará por dos estadios más. El cuerpo larval está formado por 12 segmentos; uno forma la cabeza, tres segmentos torácicos y ocho segmentos abdominales. En este período las células larvianas no proliferan, sin embargo, crecen en volumen por endoreduplicación de su material genético (Tyler, 2000).

A los 5 días, la larva entra en pupación y se inicia la metamorfosis, aquí, la mayoría del tejido larvario es histolisado (glándulas salivales, intestino, cuerpos grasos y músculos) y las estructuras adultas se forman a partir de la diferenciación de su respectivo disco imagal y los histoblastos (Tyler, 2000) (Fig. 5).

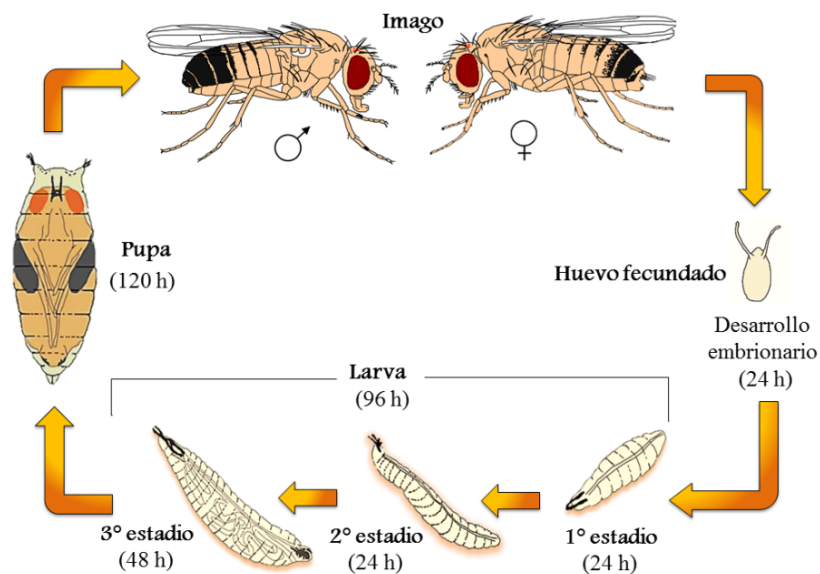


Fig. 5 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (Modificado de Ramón Giráldez).

1.5.2. Discos imagales

Los discos imagales son pequeños paquetes de células epiteliales que forman las estructuras epidérmicas del adulto (Fristrom y Fristrom, 1993) como antenas, ojos, alas, patas halterios, genitales (este disco formará los ductos genitales, glándulas accesorias y genitales externos), entre otros (Fig. 6).

Durante la embriogénesis, los discos imagales presentan de 20 a 50 células, después comienzan a desarrollarse (mitosis) en engrosamientos epidérmicos que luego se invaginan para convertirse en vesículas (éstos nunca se separan completamente de la epidermis). Una vez que se formaron las vesículas, un lado de ella comienza a crecer considerablemente, formando un tubo que se va doblando hacia el interior a medida que va creciendo, el lado opuesto de la vesícula no se dobla y forma la membrana peripodial.

En el 3° estadio larval y durante la pupación el tubo de cada disco imagal, comienza a desdoblarse empujando en contra de la membrana peripodial al mismo tiempo, las células se alargan y comienzan a diferenciarse en su estructura adulta correspondiente. En el caso de los discos imagales de las alas, la última ronda de división celular ocurre 24 h después de la formación del pupario (Bate y Martínez-Arias, 1991; Cohen, 1993; Tyler, 2000; Worley *et al.*, 2012).

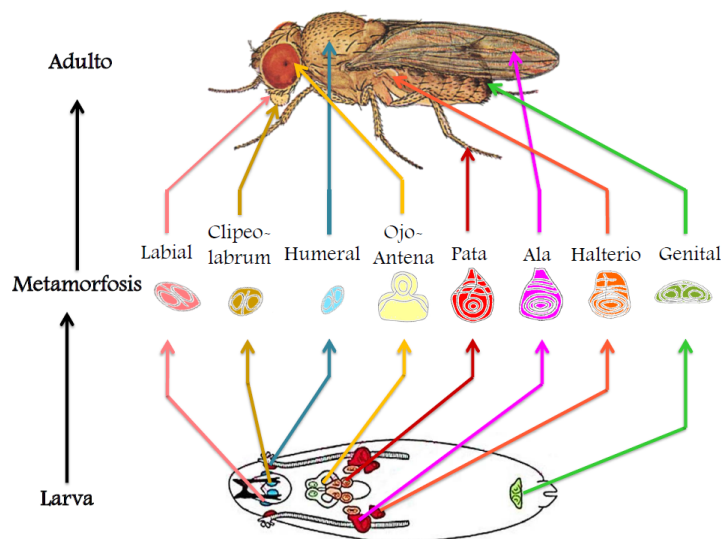


Fig. 6 Localización y desarrollo de los discos imagales de *Drosophila melanogaster* (Modificado de Gilbert, 2000).

1.6. Prueba de Mutación Somática y Recombinación Mitótica (SMART)

La prueba de mutación somática y recombinación mitótica en *Drosophila melanogaster* (SMART, por sus siglas en inglés) propuesto por Graf *et al.*, (1984) provee una evaluación del potencial de los xenobióticos, ya que estima cuantitativamente la actividad mutagénica y recombinogénica de dichos compuestos, a través del uso de marcadores genéticos recesivos para los tricomas de las alas que se expresarán en los organismos adultos, como consecuencia de la pérdida de heterocigosidad, resultado de alteraciones genéticas causadas por la exposición a un genotóxico durante el desarrollo de los discos imagales de las alas a lo largo de la etapa larvaria (García-Bellido y Merriam, 1971; Graf *et al.*, 1984).

Mediante los mecanismos de reparación, las lesiones se reparan y las células continúan su división celular, lo que dará lugar a clones celulares, es decir, “manchas” detectables en el contexto silvestre de las alas de la mosca adulta (García-Bellido y Merriam, 1971; Graf *et al.*, 1984). Los marcadores genéticos utilizados son *mwh* (multiple wing hair) y *flr³* (flare), ambos son marcadores autosómicos recesivos que se localizan en el cromosoma III a 0.0 y 39.0 unidades de mapa (um), respectivamente.

Los eventos genéticos como mutación puntual, no disyunción, deleción y recombinación entre *flr³* y *mwh*, darán lugar a una mancha simple, es decir, formada por sólo alguno de los marcadores genéticos utilizados (*mwh* o *flr³*). Mientras que los eventos de recombinación mitótica entre el marcador proximal *flr³* y el centrómero originarán una mancha gemela que se expresa fenotípicamente en las alas como una mancha formada por tricomas *mwh* y *flr³* (Fig. 7) (Graf *et al.*, 1984).

Las ventajas de este ensayo respecto a otros sistemas de prueba de mutagénesis son: 1) el utilizar las alas facilita la realización de preparaciones permanentes, manteniendo así el material original y permitiendo analizar y rectificar los resultados posteriormente, 2) la exposición de los organismos es *in vivo*, 3) es lo suficientemente sensible y tiene la capacidad de establecer relaciones entre la estructura química del compuesto y la respuesta del organismo.

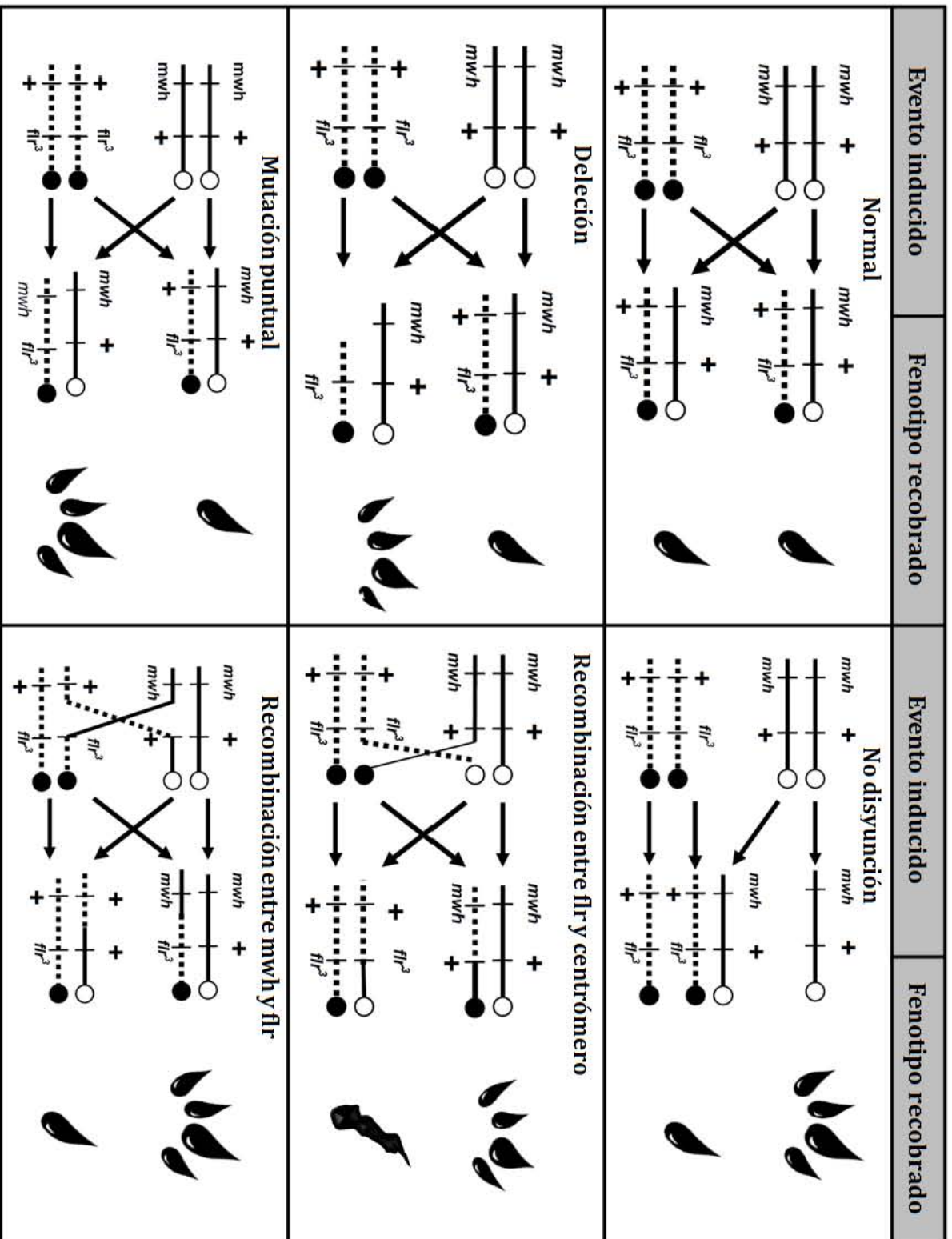


Fig. 7 Eventos genéticos que se detectan en la prueba SMART (Modificado de Graf *et al.*, 1984).

2. JUSTIFICACIÓN

Diversos estudios muestran que el desarrollo del cáncer en humanos es un proceso prolongado, sin embargo algunos tipos de cáncer se diagnostican en los primeros años de vida. Esta rápida aparición es incompatible con el tiempo esperado para acumular las alteraciones necesarias para la transformación celular y la progresión del tumor. Por otro lado, se sabe que la Inestabilidad Genómica acelera la transformación de una célula normal a neoplásica.

Una explicación que se ha propuesto es que la exposición de los progenitores lo largo de su vida ante agentes tóxicos o su estilo de vida podría influir en la aparición de inestabilidad genómica en la descendencia, ya que durante el desarrollo embrionario del nuevo individuo se afectaría la integridad de su genoma lo que aumentaría la susceptibilidad de desarrollar enfermedades crónicas a una edad más temprana, entre ellas el cáncer.

Por estas razones, en este trabajo se buscó investigar la correlación entre la exposición de los padres a un genotóxico conocido como el EC y los posibles efectos en su descendencia (efecto multigeneracional) utilizando la prueba SMART, la cual evalúa de manera cuantitativa la inestabilidad genómica de las células.

3. HIPÓTESIS

Si la frecuencia de manchas en las células somáticas de la descendencia proveniente de padres expuestos al EC es diferente al de la descendencia de padres no expuestos, entonces existiría un impacto multigeneracional.

4. OBJETIVOS

4.1. General

Determinar el posible efecto multigeneracional del compuesto EC utilizando la prueba de mutación somática y recombinación mitótica en las alas de *Drosophila melanogaster*.

4.2. Particulares

- » Evaluar la respuesta genotóxica en las células somáticas de los organismos expuestos directamente al EC.
- » Estimar la fertilidad de los organismos tratados y compararla contra su testigo.
- » Estimar la cantidad de progenie por familia de los organismos tratados y compararla contra su testigo.
- » Comparar la respuesta genotóxica en las células somáticas de la progenie proveniente de padres expuestos (ya sea ambos o sólo uno de ellos) contra la respuesta genotóxica por exposición directa al EC.
- » Determinar si existe un efecto diferencial en la respuesta genotóxica de las células somáticas de la progenie dependiendo del progenitor que haya sido expuesto al EC ya sea ambos o sólo uno de ellos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Preparación del EC

Las concentraciones del compuesto uretano o etil carbamato (EC), CAS 51-79-6 (Sigma-Aldrich®) se elaboraron a partir de diluciones sucesivas de EC en agua destilada a partir de la mayor concentración a evaluar: 1, 0.078, 2.4×10^{-6} , 4.7×10^{-9} , 1.9×10^{-12} y 1.8×10^{-14} mM; estas concentraciones en parte, se tomaron de un trabajo anterior en el laboratorio en el cual se obtuvieron respuestas con el EC (Meza-González, 2015).

El EC se disolvió a temperatura ambiente. Posteriormente en los tubos homeopáticos de vidrio que contenían 1g de medio instantáneo para *Drosophila* (Carolina Biological Supply) se agregaron 4.5 ml de la concentración de EC correspondiente. Como testigo negativo se utilizó agua destilada.

5.2. Cruza SMART

La craza SMART propuesta por Graf y colaboradores (1983) consiste en cruzar hembras vírgenes *flr³/In(3LR)TM3,Bd^S* con machos *mwh,e/mwh,e*. La descendencia de esta craza son moscas transheterocigotas con dos genotipos: moscas libres de inversiones y moscas portadoras de inversiones, que se distinguen fenotípicamente hasta la etapa adulta cuando pueden ser diferenciadas por el color del cuerpo y la forma de sus alas (Fig. 8) (Graf *et al.*, 1983; Muñoz-Hernández *et al.*, 2008).

Las moscas libres de inversiones (LI) (*+,flr³/mwh,e,+*) presentan el color del cuerpo pardo y sus alas son silvestres, mientras que las moscas portadoras de inversiones (PI) (*TM3,Bd^S/mwh,e,+*) tienen el color de su cuerpo ébano, ya que son homocigotas para el marcador *ebony* y presentan muescas en el borde de sus alas (Fig. 8) (Lindsley y Grell, 1972; Graf *et al.*, 1983; Ashburner *et al.*, 2005).

El marcador *e* (*ebony*) es un gen autosómico recesivo que permite tener un segundo control para garantizar la correcta identificación de las moscas PI (Muñoz-Hernández *et al.*, 2008).

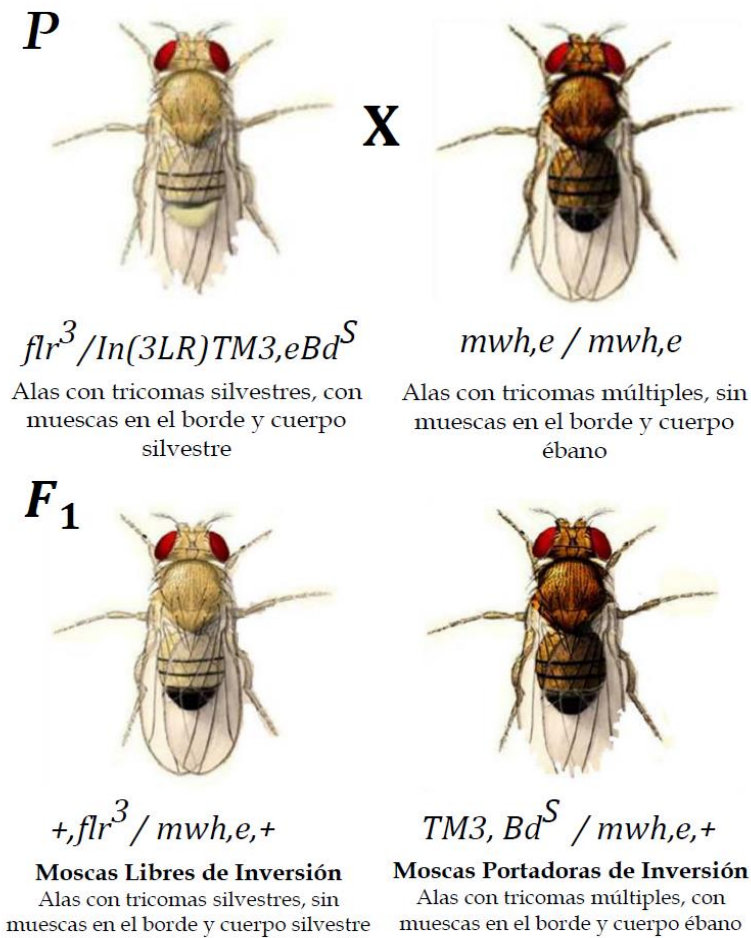


Fig. 8 Esquema de la obtención de la progenie de la cruce SMART.

5.3. Procedimiento experimental

Para evaluar la exposición directa del EC, se expusieron a moscas transheterocigotas de la cruce SMART durante su desarrollo larval y se analizaron sus alas en la etapa adulta. Posteriormente, para evaluar el efecto multigeneracional, fertilidad y promedio de progenie por familia, se expusieron a las cepas $flr^3/TM3,Bd^S$ y $mwh,e/mwh,e$ al EC durante su desarrollo larval y en la etapa adulta se realizaron diferentes sistemas de cruce, dependiendo el progenitor expuesto al EC y se analizaron las alas de sus hijos (Fig. 10).

5.3.1. Tratamiento a las moscas transheterocigotas de la cruza SMART

Para evaluar el daño del EC por exposición directa, se realizó una cruza masiva con hembras vírgenes *flr³/TM3, Bd^S* y machos *mwh,e* en frascos de vidrio con medio de cultivo. Tres días después, las moscas se transfirieron a frascos con medio fresco durante 8 horas para recolectar huevos.

Transcurridos otros tres días, las larvas de 72 ± 4 h de edad fueron extraídas por el método de Nöthinger (1970), el cual consiste en separar las larvas mediante un gradiente de densidad generado por una disolución de sacarosa al 20 % que fue vertida en un embudo de separación de 4 mm de \varnothing junto con las larvas, las cuales fueron enjuagadas y recuperadas en una malla de nylon.

Con la ayuda de una espátula se colocaron aproximadamente 100 larvas en tubos homeopáticos de vidrio que contenían 1 g de medio instantáneo (Carolina Biological Supply) y 4.5 ml de la concentración de EC correspondiente o de agua destilada, la cual se utilizó como disolvente y testigo negativo.

Las larvas permanecieron en este medio hasta que entraron a metamorfosis y emergieron como moscas adultas (exposición subcrónica de 72 x 48 h, vía alimentación). Como testigo negativo se empleó agua destilada. Para cada concentración se realizaron tres series (réplicas) y el experimento se repitió en dos ocasiones.

Las moscas adultas transheterocigotas (LI y PI) obtenidas de la cruza SMART se cuantificaron por sexo y fenotipo, para calcular la sobrevivencia y la proporción sexual. Posteriormente, se sacrificaron por exceso de anestesia (éter) y se fijaron en etanol al 70% para posteriormente realizar las laminillas y analizar el fenotipo de las alas.

5.3.2. Tratamiento a las líneas de la cruza SMART modificada

Con el objetivo de determinar el posible efecto multigeneracional del EC mediante la prueba de inducción de mutación y recombinación somática, se colocaron de manera independiente larvas de 72 ± 4 h de edad de las líneas *flr³/In(3LR)TM3,eBd^s* y *mwh,e/mwh,e* en tubos homeopáticos de vidrio, las cuales se expusieron durante 48 horas al medio Carolina con las distintas concentraciones de EC.

Al llegar a la edad adulta, las moscas de las líneas *flr³/In(3LR)TM3,eBd^s* y *mwh,e/mwh,e* se retiraron de los tubos homeopáticos, se contabilizaron y clasificaron con base en su sexo para obtener la sobrevivencia y la proporción sexual de cada cepa parental. Por cada líneas se realizaron tres series (réplicas) de cada concentración y el experimento completo se repitió en dos ocasiones.

Posteriormente para realizar los sistemas de cruza SMART modificada, se tomaron hembras vírgenes *flr³/In(3LR)TM3,eBd^s* y machos *mwh,e/mwh,e* ambos de máximo 3 días de edad. En total se colocaron 30 parejas por concentración en proporción 1:1 (hembra: macho) en tubos de plástico con medio de cultivo fresco libre de EC.

Los sistemas de cruza SMART modificada fueron los siguientes: 1) Ambos padres fueron tratados (T x T), 2) sólo la hembra fue tratada (T x NT) y 3) sólo el macho fue tratado (NT x T). Como control negativo del tratamiento, se sembró una cruza en la cual ninguno de los padres estuvo expuesto al EC, estos organismos se obtuvieron de cultivos con la misma edad que las demás cruza.

Transcurridos 5 días, los progenitores fueron retirados de los tubos y se dejó que sus hijos continuaran su desarrollo hasta imago (adulto). Después se contabilizó y clasificó la progenie recobrada de cada sistema de cruza por sexo y fenotipo (LI o PI). Con esa información se obtuvo la fertilidad, el promedio de la progenie por familia y la proporción sexual de cada sistema de cruza. Finalmente, se sacrificó por exceso de anestesia (éter) y se fijó en etanol al 70% para posteriormente realizar las laminillas y analizar el fenotipo de las alas.

5.3.3. Preparación de laminillas

Para el análisis de la inducción de mutación somática y recombinación mitótica, se procedió al montaje de las alas de las moscas LI obtenidas tanto de la cruce SMART, como de los sistemas de cruce SMART modificada. Se separaron las alas del cuerpo de cada mosca con ayuda de unas pinzas de relojero y se colocaron en un portaobjetos con solución Fauré (30g de goma de arábica, 20ml de glicerol, 50 g de hidrato de cloral y 50 ml de agua) (Graf *et al.*, 1984).

En cada portaobjetos se colocaron 20 pares de alas: 10 de hembras y 10 de machos y se montaron tres laminillas (120 alas) por concentración de EC y para cada sistema de cruce. Los tricomas de las alas se revisaron con un microscopio óptico a un aumento de 40X, se registraron con base en fenotipo de la mancha (*mwh*, *flr³* o ambos), el número de células que forman la mancha y su ubicación en el ala.

5.3.4. Criterios de registro

Los criterios de registro de las manchas se establecieron con base en Graf *et al.* (1984).

Las manchas simples están constituidas por tricomas con el marcador *flr³* o *mwh*, mientras que las manchas gemelas exhiben ambos tipos de marcadores formando la mancha (Fig. 9).

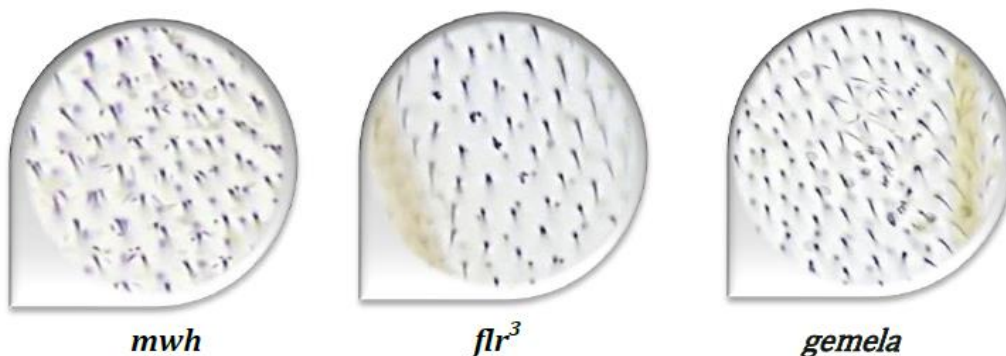


Fig. 9 Tipos de manchas recobradas en la prueba SMART.

Las manchas *mwh*, se cuantifican a partir de la presencia de tres o más tricomas por célula en la mancha, puesto que las células con dos tricomas se pueden originar por una alteración independiente de la mutación *mwh* y por esto no se toman en cuenta, a menos que se encuentren formando una mancha en la que haya al menos una célula con tres tricomas (Graf *et al.*, 1984).

Por último, se consideran que dos manchas son eventos independientes cuando existe una separación de tres o más hileras de tricomas regulares (silvestres) entre ambas.

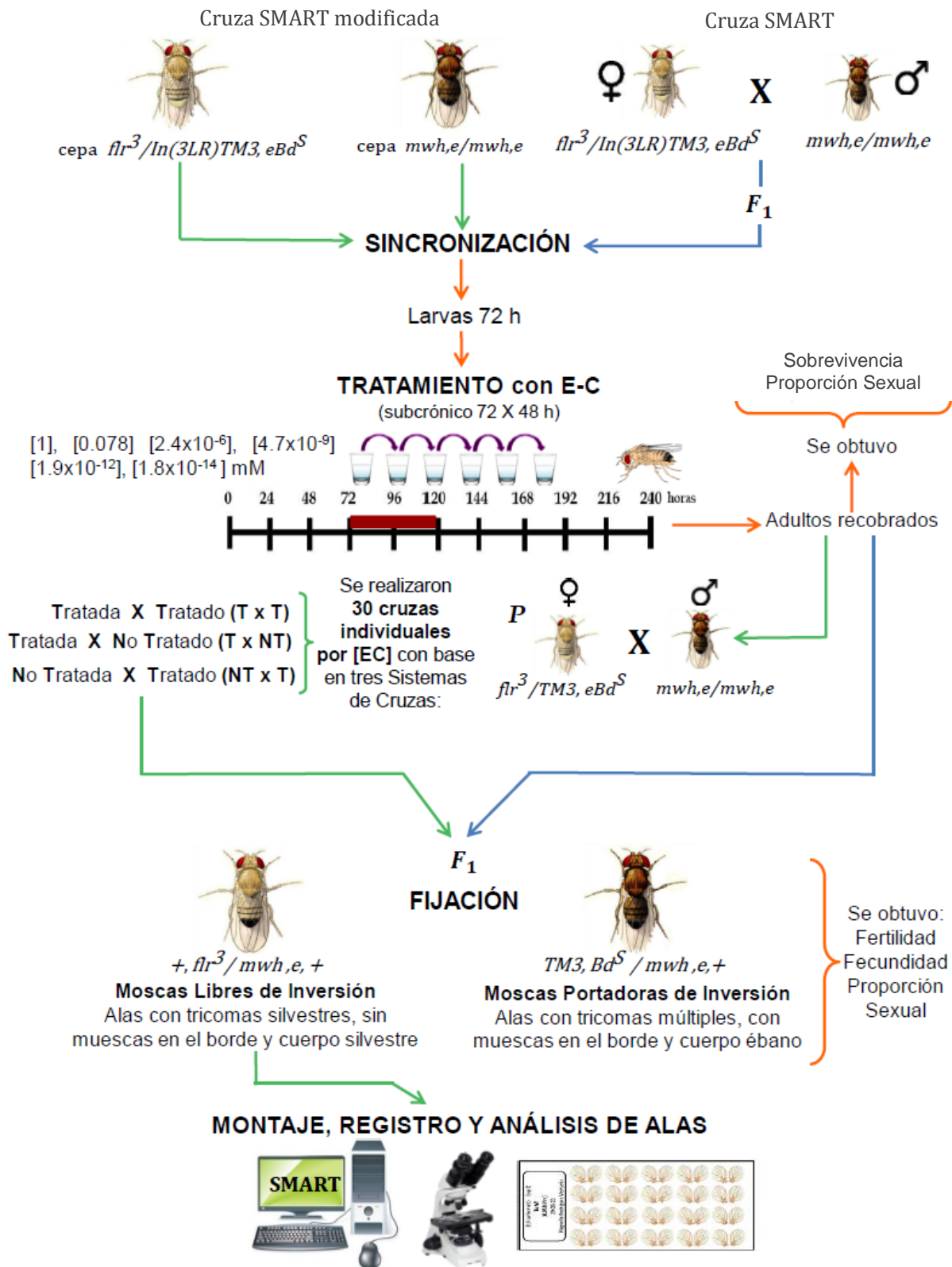


Fig. 10 Diagrama de la metodología utilizada.

5.4. Análisis estadístico

5.4.1. Supervivencia y proporción sexual

Para establecer la toxicidad de la exposición al EC se obtuvo el promedio de la Supervivencia (S) por tubo. Se integraron los resultados obtenidos en las repeticiones para obtener un promedio por cada concentración.

$$\text{Supervivencia promedio} = \frac{\text{Número total de moscas recobradas por [X] EC}}{\text{Número total de tubos por [X] EC}}$$

Se realizó un ANOVA de una vía para determinar las diferencias significativas entre las concentraciones de EC y el testigo y una prueba de Tukey cuando el ANOVA mostró una diferencia significativa, en todos los casos se utilizó $\alpha = 0.05$.

La Proporción Sexual (PSx) permite identificar si la exposición al EC afectó de manera particular a un sexo. Se calculó mediante el cociente de la suma de todos los individuos reobrados de un sexo en un tubo entre el total de individuos de ambos sexos por tubo.

Se integraron los resultados obtenidos de todas las repeticiones para obtener un promedio de la PSx por cada concentración.

$$\text{Proporción Sexual} = \frac{\text{Número machos o hembras recobrados por [X] EC}}{\text{Número total de moscas recobradas por [X] EC}}$$

Para comparar la proporción sexual de las series experimentales y sus testigos correspondientes se calculó el Intervalo de Confianza del 95% (IC_{0.95}), con base en los valores de los testigos respectivos de cada sexo.

5.4.2. Efecto reprotóxico: fertilidad y progenie por familia

Para evaluar el impacto reprotóxico en los sistemas de cruza SMART modificada (NTxT, TxNT, TxT), se determinó la fertilidad, el cual evalúa la repercusión en la capacidad reproductiva de los progenitores expuestos al EC.

La Fertilidad (*frt*) se calculó dividiendo el número total de familias que tuvieron progenie, entre el número total de familias que se sembraron; esto se calculó para cada concentración de EC y para el testigo, así como en cada sistema de cruza.

$$Fertilidad = \frac{\text{Número total de tubos con progenie por [X] EC}}{\text{Número total de tubos sembrados por [X] EC}}$$

Para determinar diferencias significativas en la fertilidad, se realizó una prueba de Z para proporciones a un nivel de significación de 0.05 ($\alpha = 0.05$), comparando la proporción de familias que tuvieron hijos de cada concentración de EC, con la proporción de familias fértiles del testigo.

La progenie por familia (*ppf*) es un biomarcador que evalúa si se modifica la cantidad de descendencia ante la exposición de los progenitores al EC. Para ello, se dividió el número total de hijos, entre el número total de familias que tuvieron hijos; esto se calculó para cada concentración de EC y para el testigo, así como en cada sistema de cruza.

$$Progenie\ por\ familia = \frac{\text{Número total de hijos por familia sembrada en cada [X] EC}}{\text{Número total de familias con hijos en cada [X] EC}}$$

Se realizó un ANOVA de una vía por sistema de cruza, para determinar las diferencias significativas en la *ppf* entre las concentraciones de EC y el testigo y una prueba de Tukey cuando el ANOVA mostró una diferencia significativa, en todos los casos se utilizó un nivel de significación de 0.05 ($\alpha = 0.05$).

5.4.3. Frecuencia de mutación somática y recombinación mitótica

El análisis estadístico de la comparación total de las manchas encontradas en las alas de la descendencia de cada sistema de cruce puede llevar a cuatro posibles resultados indicados en la tabla 2:

Tabla 2. Análisis estadístico del procedimiento de decisión múltiple
Frei & Wurgler (1988)

Hipótesis	No se rechaza H_a	Se rechaza H_a
No se rechaza H_o	Indeterminado (i)	Negativo (-)
Se rechaza H_o	Positivo (+)	Débil Positivo (w)

Se evaluaron distintos atributos en lo que se refiere a la frecuencia de mutación somática y recombinación mitótica:

↻ El tamaño de la mancha: las manchas *chicas* corresponden a 1 o 2 células y las manchas *grandes* están representadas por 3 o más células. El tamaño de la mancha permite estimar el número de divisiones celulares que ocurrieron después de la inducción del cambio genético en la célula original afectada, por lo tanto, es un indicador del tiempo en el que se originó la mancha durante el desarrollo de la mosca, en ausencia de arresto o muerte celular (Graf *et al.*, 1984; Ramos-Morales *et al.*, 2000).

↻ Fenotipo de la mancha: cuando la mancha presenta el marcador ya sea *flr³* o *mwh* se dice que es una mancha *simple*, en cambio, cuando la mancha está constituida por ambos marcadores se le denomina *gemela*.

↻ El número de manchas por mosca: se determina para identificar la diferente susceptibilidad de los organismos de una población al tratamiento, es decir, en una población de organismos que estuvo expuesta a un compuesto, algunos mostrarán mayor evidencia del daño ocasionado por el compuesto, mientras que otros llegarán a mostrar poco o ningún daño (Ramos-Morales *et al.*, 2000).

6. RESULTADOS

De acuerdo con los objetivos establecidos en este trabajo; en primera instancia se evaluó el efecto directo del EC en los organismos expuestos durante el desarrollo larvario, mediante los biomarcadores de sobrevivencia y proporción sexual, tanto en las moscas de la cruce SMART como en las líneas utilizadas para la cruce SMART modificada .

Posteriormente, para evaluar el daño multigeneracional se realizaron tres sistemas de cruces SMART modificada, a partir de las líneas parentales expuestas al EC: NTxT, TxNT, TxT y en cada una se evaluó la capacidad reproductiva (fertilidad, progeñe por familia) y la repercusión en alguno de los sexos en particular. Finalmente, se analizó la frecuencia de mutación somática y recombinación mitótica en la descendencia de los diferentes sistemas cruce y se comparó con la frecuencia de mutación somática y recombinación mitótica en las moscas de la cruce SMART expuesta directamente al EC durante su desarrollo larvario.

6.1. Efecto del EC en moscas de la cruce SMART

6.1.1. Sobrevivencia y Proporción Sexual

En la tabla 3 se muestran los valores obtenidos de la Sobrevivencia y la Proporción Sexual de las moscas transheterocigotas expuestas durante su desarrollo larval a las diferentes concentraciones de EC.

Como se muestra en la figura 11, la sobrevivencia de las moscas LI es notoriamente mayor a su testigo sólo en las concentraciones más altas (0.078 y 1Mm) por el contrario, la sobrevivencia de las moscas PI se mantiene por debajo de su testigo en todas las concentraciones probadas; aunque en ningún tipo de moscas hubo diferencias significativas respecto a su testigo ($p > 0.05$).

Tabla 3. Supervivencia (promedio \pm e.e.) y Proporción Sexual (promedio \pm e.e.) de las moscas transheterocigotas tratadas con EC durante su desarrollo larvario.

EC [mM]	LIBRES DE INVERSIÓN				PORTADORAS DE INVERSIÓN			
	N	Promedio	Proporción Sexual		N	Promedio	Proporción Sexual	
			Hembras	Machos			Hembras	Machos
0.0E+00	104	17.33 \pm 2.30	0.57 \pm 0.06	0.43 \pm 0.06	146	24.33 \pm 3.61	0.53 \pm 0.07	0.47 \pm 0.07
1.8E-14	116	19.33 \pm 5.57	0.44 \pm 0.03 *	0.56 \pm 0.03 *	127	21.17 \pm 5.58	0.59 \pm 0.04	0.41 \pm 0.04
9.1E-12	111	18.50 \pm 3.87	0.41 \pm 0.04 *	0.59 \pm 0.04 *	142	23.67 \pm 4.02	0.52 \pm 0.03	0.48 \pm 0.03
4.7E-09	119	19.83 \pm 3.88	0.42 \pm 0.04 *	0.58 \pm 0.04 *	124	20.67 \pm 4.81	0.50 \pm 0.07	0.50 \pm 0.07
2.4E-06	112	18.67 \pm 4.81	0.58 \pm 0.10	0.42 \pm 0.10	134	22.33 \pm 4.98	0.51 \pm 0.04	0.49 \pm 0.04
7.8E-02	149	24.83 \pm 6.48	0.37 \pm 0.08 *	0.63 \pm 0.08 *	125	20.83 \pm 7.29	0.45 \pm 0.09	0.55 \pm 0.09
1.0E+00	167	27.83 \pm 5.99	0.50 \pm 0.11	0.50 \pm 0.11	125	20.83 \pm 5.66	0.42 \pm 0.03	0.58 \pm 0.03

N, progeñe total; Intervalo de Confianza 95%, *diferencias significativas con el testigo.

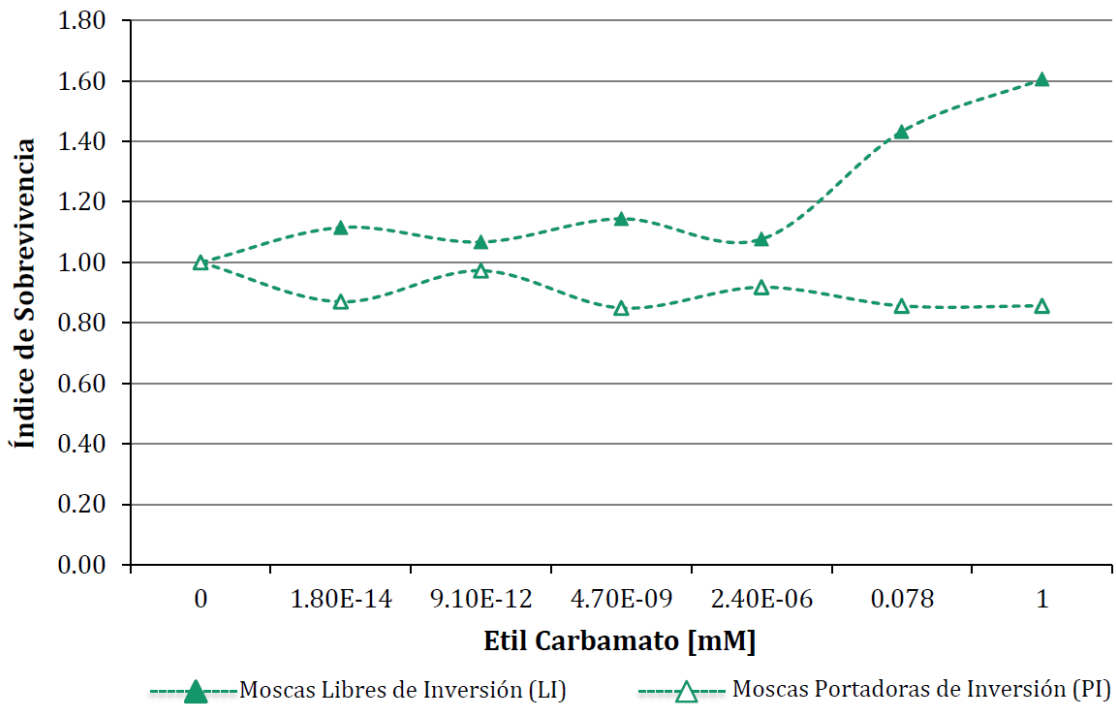


Fig. 11 Índice de Supervivencia de las moscas transheterocigotas expuestas directamente al EC durante su desarrollo larval.

En cuanto a la Proporción Sexual de las moscas transheterocigotas (Fig. 12), sólo en las moscas LI se afectó la proporción de hembras y machos de manera significativa en las concentraciones 1.8E-14, 9.1E-12, 4.7E-09 y 0.078 mM en comparación con el testigo (IC_{0.95}). En la figura 13 se muestra que la proporción sexual en las moscas PI es muy similar al testigo en sólo en las concentraciones intermedias (9.1E-12, 4.7E-09 y 2.4E-06).

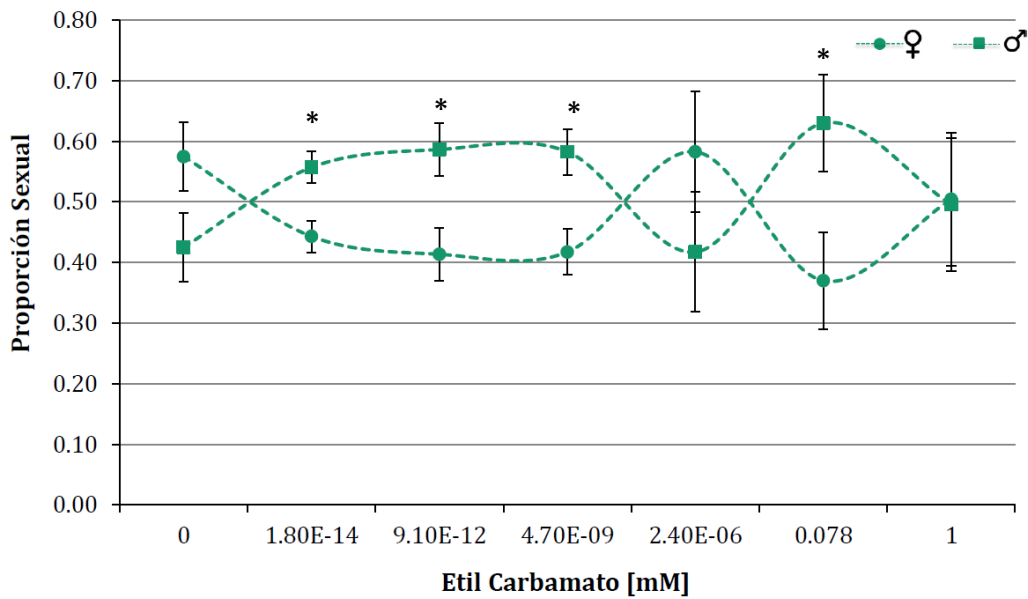


Fig. 12 Proporción Sexual de las moscas LI de la cruza SMART expuestas al EC durante su desarrollo larvario. * dif. sig. con su testigo (IC_{0.95}).

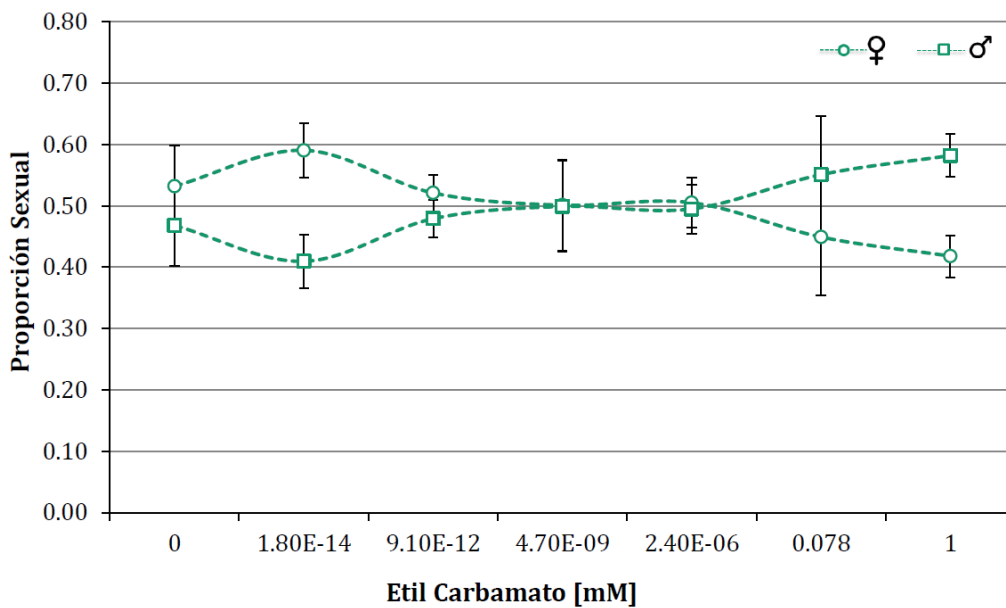


Fig. 13 Proporción Sexual de las moscas PI de la cruza SMART, expuestas al EC durante su desarrollo larvario.

6.1.2. Frecuencia de mutación somática y recombinación mitótica

En la tabla 4 se muestra la frecuencia de las manchas en las moscas transheterocigotas tratadas con EC durante su desarrollo larval. En lo que se refiere a las manchas totales, en todas las concentraciones la frecuencia es mayor en comparación con el testigo, teniendo diferencias significativas en tres concentraciones: 9.12E-12, 4.7E-09 y 1 mM.

La frecuencia de manchas chicas y grandes fue mayor en todas las concentraciones de EC comparado con su testigo. En la figura 14 se muestra el incremento en la frecuencia de manchas chicas en relación con la concentración de EC, desde la concentración más baja hasta 4.7E-09 mM. Respectivamente, la distribución de las manchas grandes tiene su límite en el rango de 9-16 células/mancha, obteniendo diferencias significativas sólo en la concentración más alta (Fig. 14 y Tabla 4).

Por último, se observó que en todas las concentraciones probadas, la frecuencia de moscas sin manchas fue menor al testigo, por lo tanto, se encontró una amplia distribución de las manchas/moscas, específicamente en las concentraciones 4.7E-09 y 1Mm poco más de la mitad de las moscas tuvieron manchas aunque de tamaño pequeño (1-2 células)(Fig. 15).

Tabla 4. Frecuencia de manchas en las alas de las moscas transheterocigotas tratadas con EC.

[mM] EC	Nº alas	Frecuencia de manchas por ala (número de manchas)							
		Manchas chicas (1-2 células)		Manchas grandes (>2 células)		Manchas gemelas		Manchas totales	
0.0E+00	120	0.24 (29)	(i)	0.02 (2)	(i)	0.01 (1)	(i)	0.27 (32)	(i)
1.8E-14	120	0.31 (37)	(-)	0.06 (7)	(i)	0.02 (2)	(i)	0.38 (46)	(i)
9.1E-12	120	0.37 (44)	(i)	0.06 (7)	(i)	0.00 (0)	(i)	0.43 (51)	(+)
4.7E-09	120	0.50 (60)	(+)	0.04 (5)	(i)	0.01 (1)	(i)	0.55 (66)	(+)
2.4E-06	120	0.30 (36)	(-)	0.04 (5)	(i)	0.03 (3)	(i)	0.37 (44)	(i)
7.8E-02	120	0.29 (35)	(-)	0.04 (5)	(i)	0.02 (2)	(i)	0.35 (42)	(-)
1.0E+00	120	0.41 (49)	(+)	0.08 (10)	(+)	0.01 (1)	(i)	0.50 (60)	(+)

Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Wurgler (1988): (+) positivo; (-) negativo; (i) indeterminado, nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

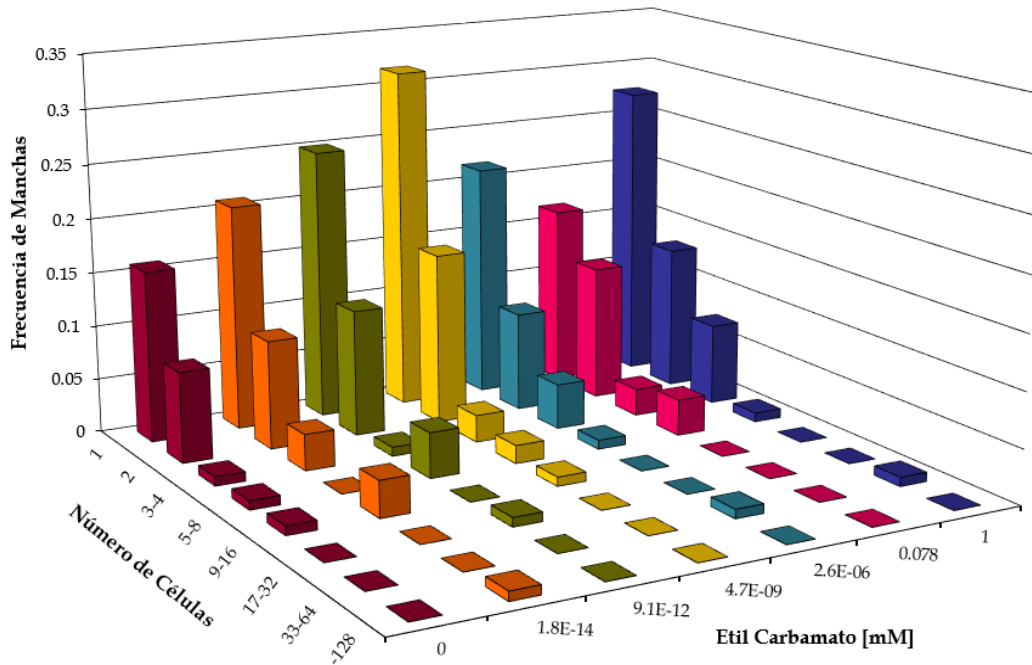


Fig. 14 Distribución de la frecuencia del tamaño de mancha (número de células) de las moscas transheterocigotas expuestas al EC.

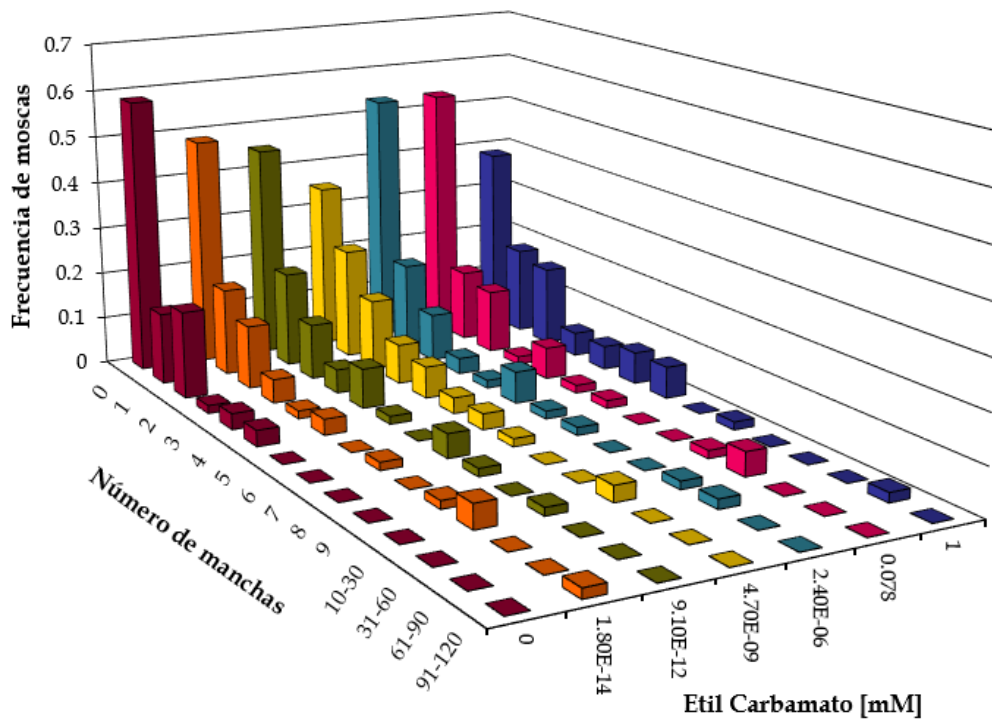


Fig. 15 Distribución de la frecuencia de manchas/mosca de las moscas transheterocigotas expuestas al EC.

6.2. Efecto del EC en las líneas de la cruza SMART modificada

6.2.1. Supervivencia y Proporción Sexual

Se obtuvieron dos indicadores de toxicidad: la supervivencia y la Proporción Sexual (PS). La supervivencia se refiere al número de organismos adultos que se recuperan en las diferentes concentraciones y en el testigo.

En la tabla 5 se muestran los valores obtenidos de la Supervivencia y la Proporción Sexual de las líneas parentales (*flr³/InTM3* y *mwh,e*) y la cepa Canton-S (control de línea) tratadas durante la etapa larvaria a diferentes concentraciones de EC (1.8E-14 a 1 mM) y en el testigo de sacarosa al 5%.

En la cepa *mwh,e*, a partir de 9.1E-12 mM, se recuperaron más moscas en las series experimentales que en el testigo, mientras que en la cepa *flr³/InTM3* se obtuvo una mayor supervivencia respecto al testigo hasta las concentraciones más altas, específicamente a partir de 2.4E-06 mM. Sin embargo, la supervivencia promedio fue muy similar en las dos cepas parentales.

La comparación de la supervivencia entre las dos cepas parentales no mostró diferencias significativas con respecto a la CS (ANOVA de dos vías, $p > 0.05$).

Tabla 5. Supervivencia (promedio \pm e.e.) y Proporción Sexual (promedio \pm e.e.) de las distintas cepas parentales tratadas con EC.

EC [mM]	CS				<i>flr³ / InTM3, e Bd^S</i>				<i>mwh, e / mwh, e</i>			
			Proporción Sexual				Proporción Sexual				Proporción Sexual	
	N	Promedio	Hembras	Machos	N	Promedio	Hembras	Machos	N	Promedio	Hembras	Machos
0.0E+00	381	42.33 \pm 4.08	0.43 \pm 0.03	0.57 \pm 0.03	92	30.67 \pm 9.61	0.40 \pm 0.06	0.60 \pm 0.06	180	30.00 \pm 3.53	0.51 \pm 0.05	0.49 \pm 0.05
1.8E-14	411	45.67 \pm 6.79	0.45 \pm 0.02	0.55 \pm 0.02	73	24.33 \pm 6.69	0.51 \pm 0.06	0.49 \pm 0.06	174	29.00 \pm 2.91	0.42 \pm 0.02	0.58 \pm 0.02
9.1E-12	398	44.22 \pm 8.66	0.42 \pm 0.03	0.58 \pm 0.03	81	27.00 \pm 7.57	0.51 \pm 0.05	0.49 \pm 0.05	198	33.00 \pm 0.89	0.43 \pm 0.03	0.57 \pm 0.03
4.7E-09	389	43.22 \pm 5.04	0.48 \pm 0.02	0.52 \pm 0.02	82	27.33 \pm 4.26	0.36 \pm 0.07	0.64 \pm 0.07	219	36.50 \pm 2.50	0.49 \pm 0.05	0.51 \pm 0.05
2.4E-06	459	51.00 \pm 4.98	0.49 \pm 0.02 *	0.51 \pm 0.02	95	31.67 \pm 3.28	0.43 \pm 0.03	0.57 \pm 0.03	207	34.50 \pm 1.69	0.54 \pm 0.01	0.46 \pm 0.01
7.8E-02	421	46.78 \pm 7.15	0.52 \pm 0.02 *	0.48 \pm 0.02	94	31.33 \pm 8.95	0.42 \pm 0.04	0.58 \pm 0.04	213	35.50 \pm 0.85	0.48 \pm 0.03	0.52 \pm 0.03
1.0E+00	424	47.11 \pm 8.58	0.43 \pm 0.03	0.57 \pm 0.03	114	38.00 \pm 8.08	0.43 \pm 0.02	0.57 \pm 0.02	192	32.00 \pm 2.68	0.51 \pm 0.03	0.49 \pm 0.03

N, supervivencia; Intervalo de Confianza 95%, *diferencias significativas con el testigo

Para comparar el efecto del tratamiento en las líneas parentales contra sus testigos, se obtuvo el Índice de Supervivencia (IS) (Fig. 16).

Este indicador se obtuvo dividiendo la cantidad de organismos recuperados en los lotes de cada concentración (incluyendo al testigo) entre el número de organismos recuperados del testigo (valor 1.0), con ello se puede apreciar mejor la tendencia de la respuesta en cada línea. En general, en las tres cepas el EC no resultó ser letal y la supervivencia fue mayor en comparación con su testigo en las tres concentraciones más altas (Fig. 16).

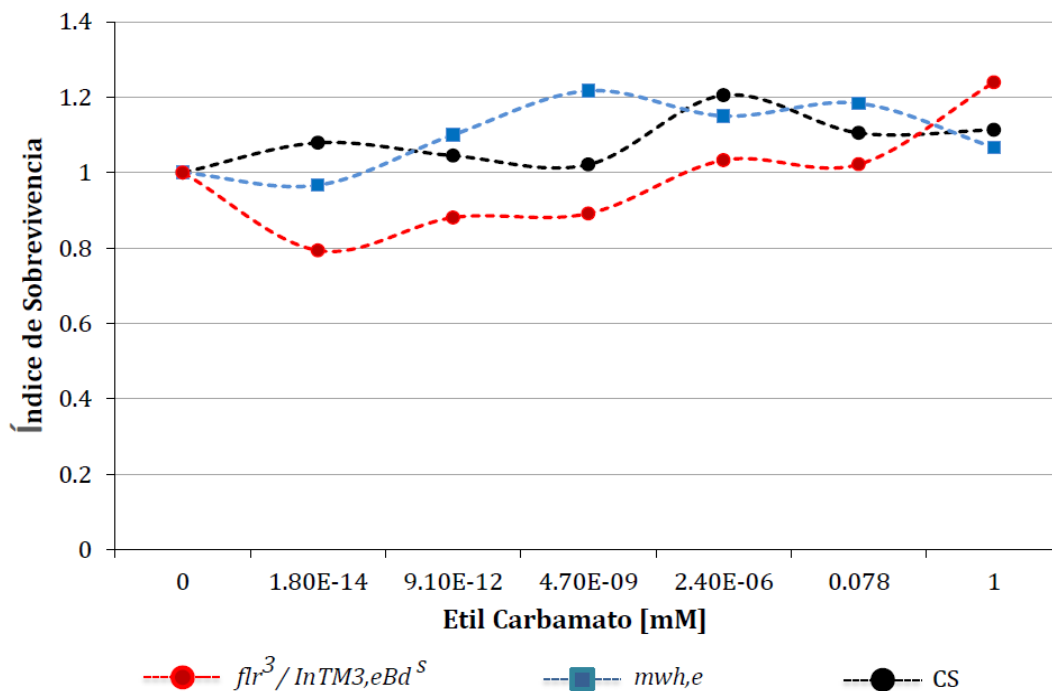


Fig. 16 Índice de Supervivencia de las cepas parentales tratadas con EC.

La Proporción Sexual (PS) de las líneas de la cruce SMART modificada se calculó para determinar si el EC influyó de manera particular a alguno de los sexos (Tabla 5 y Fig. 17). La línea *flr*³/*InTM3* mostró una mayor desviación respecto al valor del testigo, sin embargo, en ninguna concentración llegó a ser significativa (Fig. 17a). La línea *mwh,e* (Fig. 17b) mostró una respuesta similar a la cepa CS en la mayoría de las concentraciones experimentales, sin embargo, en la cepa CS hubo diferencias significativas en las concentraciones 2.4E06 y 0.078 mM en comparación con la PS de su testigo ($IC_{0.95}$) (Fig. 17c).

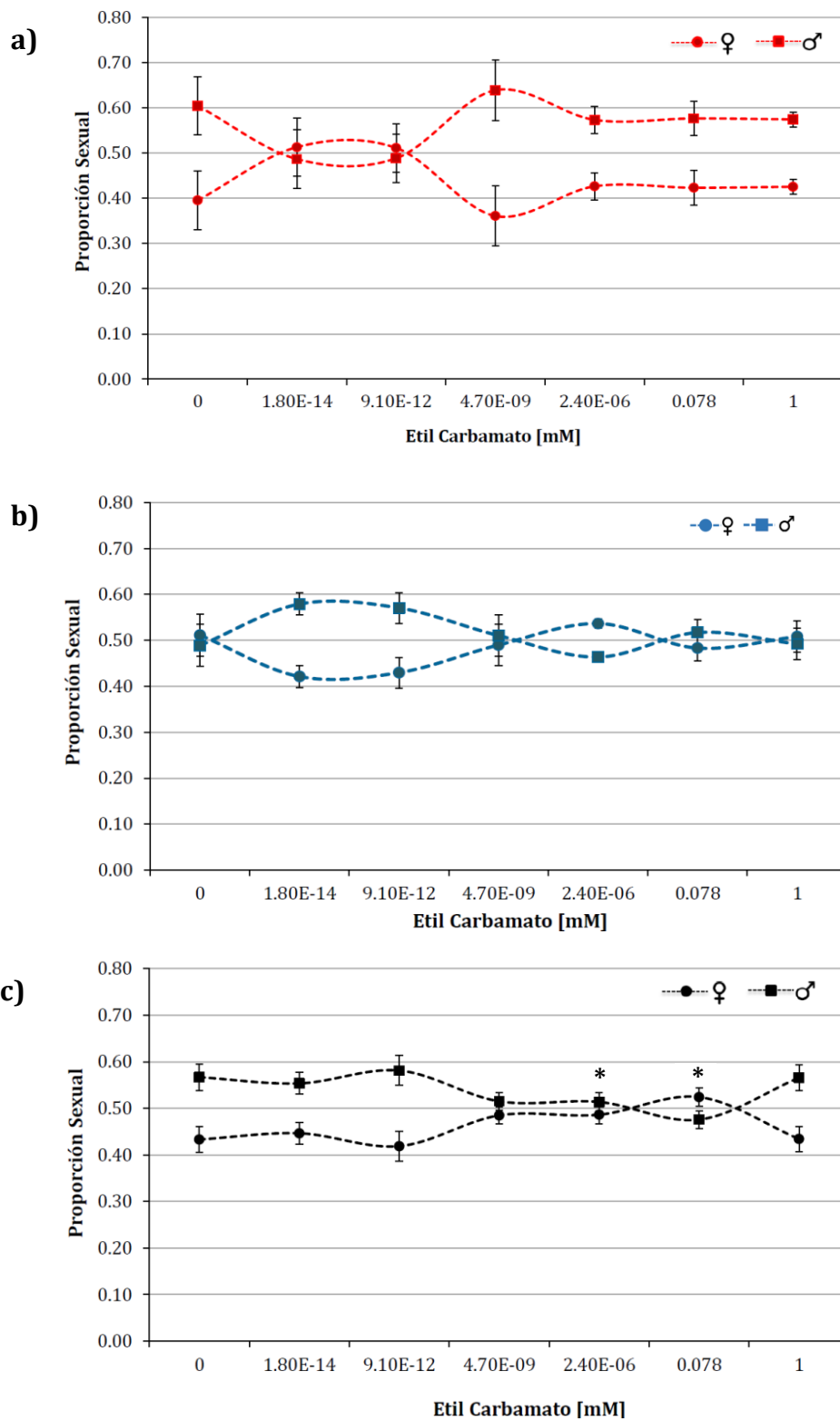


Fig. 17. Proporción Sexual de las líneas de la cruz SMART modificada: **a)** cepa *flr³/InTM3, eBd^S*, **b)** *mwh,e* y **c)** Canton S, *diferencias significativas (IC_{0.95}).

6.2.2. Daño reprotóxico: fertilidad, progenie por familia, proporción sexual

Una vez que se contabilizaron todos los organismos recobrados del tratamiento de cada línea parental: *flr³/InTM3* y *mwh, e*, se realizaron los distintos sistemas de cruza: NTxT, TxNT y TxT. Se evaluó la capacidad reproductiva (fertilidad), la cantidad de progenie por familia y la proporción sexual de la descendencia de estos sistemas de cruza.

Los resultados de la fertilidad de cada sistema de cruza se compararon con una prueba Z para proporciones ($\alpha=0.05$), en cada una se comparó el número de parejas de los lotes experimentales que tuvieron hijos contra su testigo correspondiente. Sólo en la concentración 4.7E-09 mM en la cruza TxT (Fig. 18) se obtuvo un efecto significativo respecto a su testigo.

Al comparar la fertilidad entre los distintos tipos de cruza, se encontraron diferencias significativas entre las cruza TxT y NTxT en la concentración 4.7E-09 mM (Tabla 6).

La cantidad de progenie por familia recobrada en los lotes experimentales se contrastó por medio de un ANOVA de una vía; sólo se confirmaron diferencias significativas en la concentración 2.4E-06mM en la cruza TxT ($p=0.02$) en comparación con su testigo.

Para comparar la progenie por familia de cada sistema de cruza, se dividió la cantidad de progenie recobrada de cada concentración (tanto las moscas libres como las portadoras de inversión) entre el número de organismos correspondientes recobrados en el testigo (Fig. 19).

En comparación con su testigo de cada sistema de cruza, se recobró menos descendencia cuando sólo la hembra estuvo afectada y mayor descendencia cuando ambos padres fueron tratados, en especial en las concentraciones 9.1E-12, 2.4E-06 y 0.078 mM.

Tabla 6. Fertilidad y Progenie por Familia de los distintos sistemas de cruzas.

EC [mM]	NT x T			T x NT			T x T		
	N	Fert	ppf	N	Fert	ppf	N	Fert	ppf
0.0E+00	1526	0.8	38.15 ± 3.1	548	0.8	60.89 ± 7.2	271	0.9	33.88 ± 8.0
1.80E-14	1151	0.7	34.88 ± 3.6	518	0.7	64.75 ± 8.3	275	0.9	34.38 ± 6.7
9.10E-12	1820	0.8	46.67 ± 4.0	610	0.9	61.00 ± 9.2	498	1.0	55.33 ± 7.8
4.70E-09	1764	0.8 ^b	44.10 ± 3.5	295	0.6	42.14 ± 5.4	155	0.4 ^{*a}	18.75 ± 7.0
2.40E-06	1320	0.7	37.71 ± 3.9	584	0.9	58.40 ± 8.5	521	0.9	65.13 ± 11.7 [*]
7.8E-02	1689	0.8	41.20 ± 4.3	450	0.9	45.00 ± 10.6	556	1.0	61.78 ± 8.5
1.0E+00	1891	0.8	48.49 ± 4.0	469	0.8	52.11 ± 7.3	287	0.9	35.88 ± 5.7

N, progenie total; Fert, fertilidad; ppf, progenie por familia, * diferencia con el testigo; ^{a, b} diferencia entre cruzas (ANOVA p=0.021) (z proporciones α=0.05).

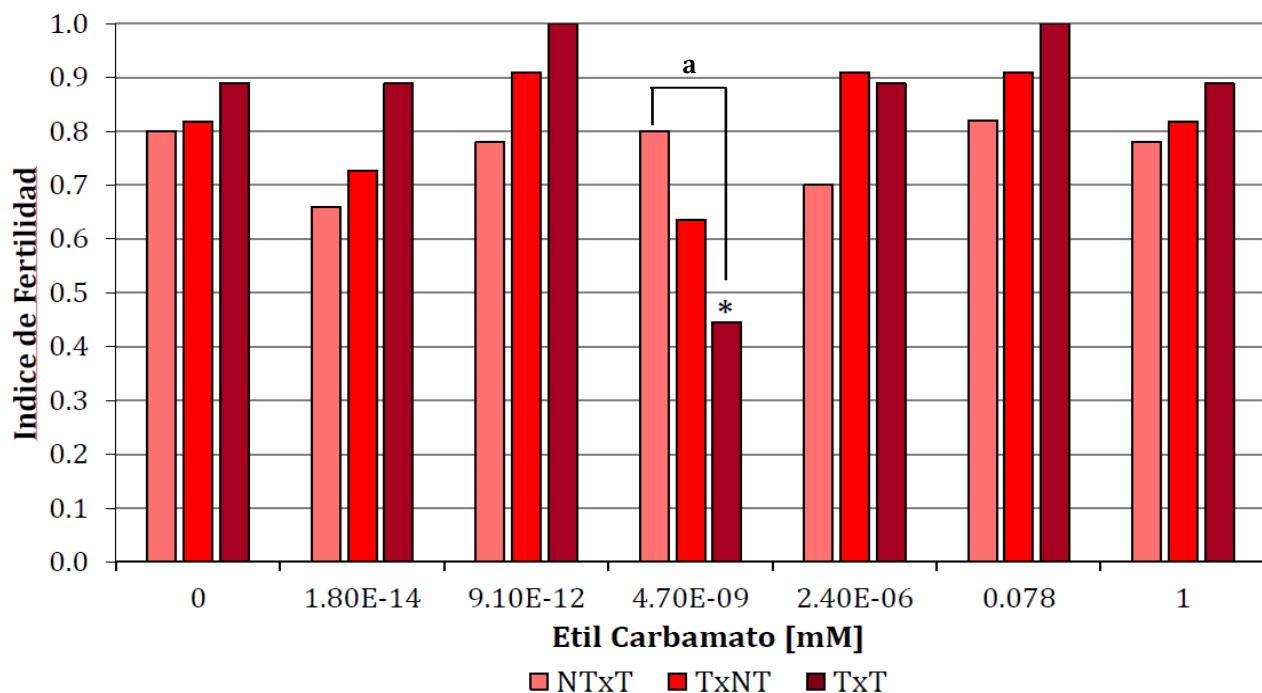


Fig.18 Fertilidad de las cruzas SMART modificadas: TxT, TxNT, NTxT: realizadas a partir de las líneas expuestas al EC, z para proporciones, * diferencia con el testigo, ^a diferencia entre cruzas, p<0.05

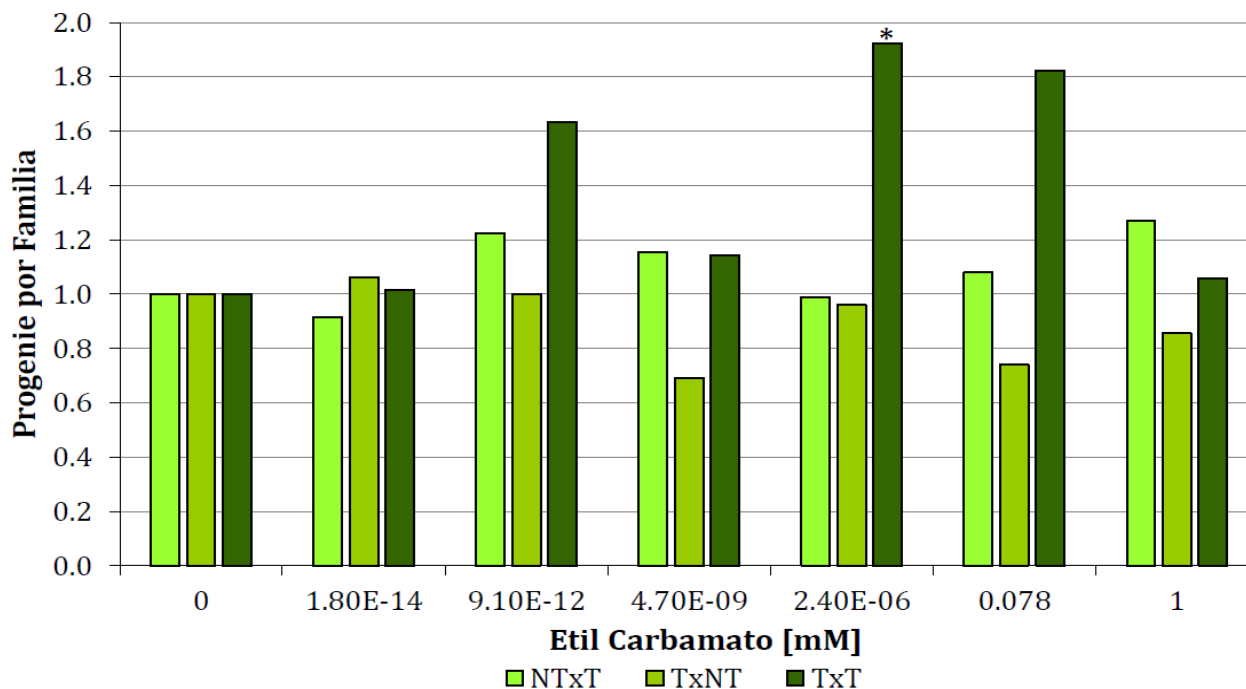


Fig. 19 Progenie por familia corregida de las cruza SMART modificadas realizadas a partir de las a partir de las líneas expuestas al EC. ANOVA una vía, * $p < 0.05$ diferencia con el testigo.

Los resultados de la Proporción Sexual (PS) de los dos genotipos de moscas (LI y PI) pertenecientes a la progenie de los distintos sistemas de cruza NTxT, TxNT y TxT, se encuentran en las tablas 7, 8 y 9 respectivamente.

En general, en todas las concentraciones probadas se encontraron afectaciones significativas en el número de hembras y machos en comparación con su testigo correspondiente, y la concentración 0.078 mM es la que más se repite como significativa (IC_{0.95}) (Fig. 20, 21 y 22).

Al comparar la PS de la progenie de los diferentes sistemas de cruza, se muestra que en la cruza NTxT (padre tratado), sólo en las moscas PI se presentaron resultados significativos a partir de las concentraciones intermedias hasta las más altas, además se obtuvieron más resultados significativos en comparación con los otros sistemas de cruza (Fig. 20).

En la descendencia de la cruce donde sólo la madre estuvo expuesta, la PS en las moscas LI resultó ser significativa sólo en la concentración 0.078 mM y para el caso de las moscas PI sólo en las concentraciones intermedias de EC: 9.1E-12 y 2.4E-06 mM (Fig. 21).

Para la cruce con dos padres tratados, en las moscas LI los datos significativos de la PS fue alternando a lo largo de las concentraciones (1.8E-14, 4.7E-09 y 0.078 mM) en cambio, en las moscas PI las diferencias se limitaron a las dos concentraciones más altas (0.078 y 1 mM) (Fig. 22).

La exposición de los padres al EC durante su desarrollo larvario, alteró la proporción de hembras y machos en su descendencia, tanto en el genotipo de las moscas LI como en las moscas PI, aunque las moscas LI presentaron un mayor número de valores significativos en la PS, sin importar el sistema de cruce.

Tabla 7. Progenie por familia (promedio \pm e.e.) y Proporción Sexual (promedio \pm e.e.) de la descendencia de la cruz NT x T.

EC [mM]	LIBRES DE INVERSIÓN				PORTADORAS DE INVERSIÓN			
	N	Promedio	Proporción Sexual		N	Promedio	Proporción Sexual	
			Hembras	Machos			Hembras	Machos
0.0E+00	815	20.38 \pm 1.66	0.48 \pm 0.03	0.52 \pm 0.03	711	17.78 \pm 1.62	0.47 \pm 0.02	0.53 \pm 0.02
1.8E-14	584	17.70 \pm 1.94	0.51 \pm 0.03	0.49 \pm 0.03	567	17.18 \pm 1.84	0.47 \pm 0.03	0.53 \pm 0.03
9.1E-12	964	24.72 \pm 2.05	0.50 \pm 0.02	0.50 \pm 0.02	856	21.95 \pm 2.18	0.55 \pm 0.03 *	0.45 \pm 0.03 *
4.7E-09	890	22.25 \pm 1.81	0.49 \pm 0.02	0.51 \pm 0.02	874	21.85 \pm 1.83	0.52 \pm 0.02 *	0.48 \pm 0.02 *
2.4E-06	680	19.43 \pm 2.00	0.47 \pm 0.03	0.53 \pm 0.03	640	18.29 \pm 2.08	0.49 \pm 0.03	0.51 \pm 0.03
7.8E-02	848	20.68 \pm 2.31	0.52 \pm 0.02	0.48 \pm 0.03	841	20.51 \pm 2.11	0.51 \pm 0.02 *	0.49 \pm 0.02 *
1.0E+00	926	23.74 \pm 2.09	0.52 \pm 0.02	0.48 \pm 0.02	965	24.74 \pm 2.07	0.54 \pm 0.02 *	0.46 \pm 0.02 *

N, progenie total; Intervalo de Confianza 95%, * diferencias significativas con el testigo.

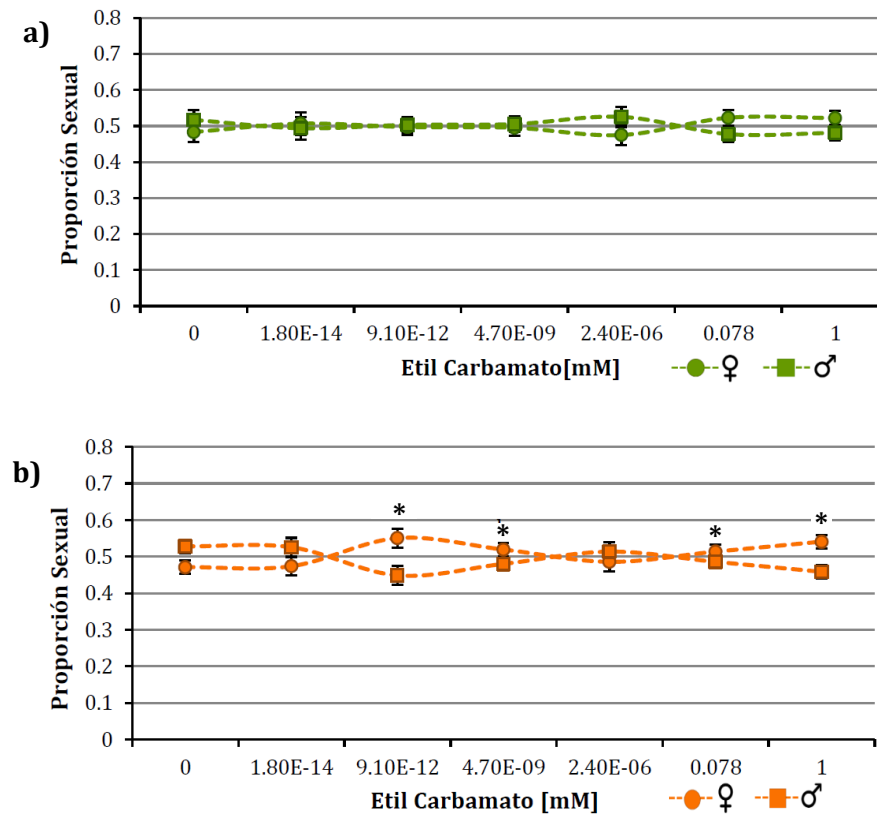


Fig. 20 Proporción Sexual de la descendencia de la cruz NTxT: **a)** Libres de inversión y **b)** Portadoras de Inversión, *dif. sig. con su testigo (IC_{0.95}).

Tabla 8. Progenie por familia (promedio \pm e.e.) y Proporción Sexual (promedio \pm e.e.) de la descendencia de la cruz T x NT.

EC [mM]	LIBRES DE INVERSIÓN				PORTADORAS DE INVERSIÓN			
	N	Promedio	Proporción Sexual		N	Promedio	Proporción Sexual	
			Hembras	Machos			Hembras	Machos
0.0E+00	280	31.11 \pm 4.88	0.54 \pm 0.02	0.46 \pm 0.02	268	29.78 \pm 4.13	0.58 \pm 0.03	0.42 \pm 0.03
1.8E-14	284	35.50 \pm 5.06	0.53 \pm 0.03	0.47 \pm 0.03	234	29.25 \pm 4.52	0.54 \pm 0.03	0.46 \pm 0.03
9.1E-12	300	30.00 \pm 5.09	0.54 \pm 0.04	0.46 \pm 0.04	310	31.00 \pm 4.43	0.50 \pm 0.04*	0.50 \pm 0.04 *
4.7E-09	152	21.71 \pm 2.91	0.54 \pm 0.02	0.46 \pm 0.02	143	20.43 \pm 2.68	0.53 \pm 0.04	0.47 \pm 0.04
2.4E-06	303	30.30 \pm 4.28	0.54 \pm 0.03	0.46 \pm 0.03	281	28.10 \pm 4.70	0.48 \pm 0.04*	0.52 \pm 0.04 *
7.8E-02	223	22.30 \pm 5.72	0.47 \pm 0.06	0.53 \pm 0.06	227	22.70 \pm 5.04	0.58 \pm 0.03	0.42 \pm 0.03
1.0E+00	239	26.56 \pm 4.17	0.56 \pm 0.04	0.44 \pm 0.04	230	25.56 \pm 3.45	0.57 \pm 0.03	0.43 \pm 0.03

N, progenie total; Intervalo de Confianza 95%, *diferencias significativas con el testigo.

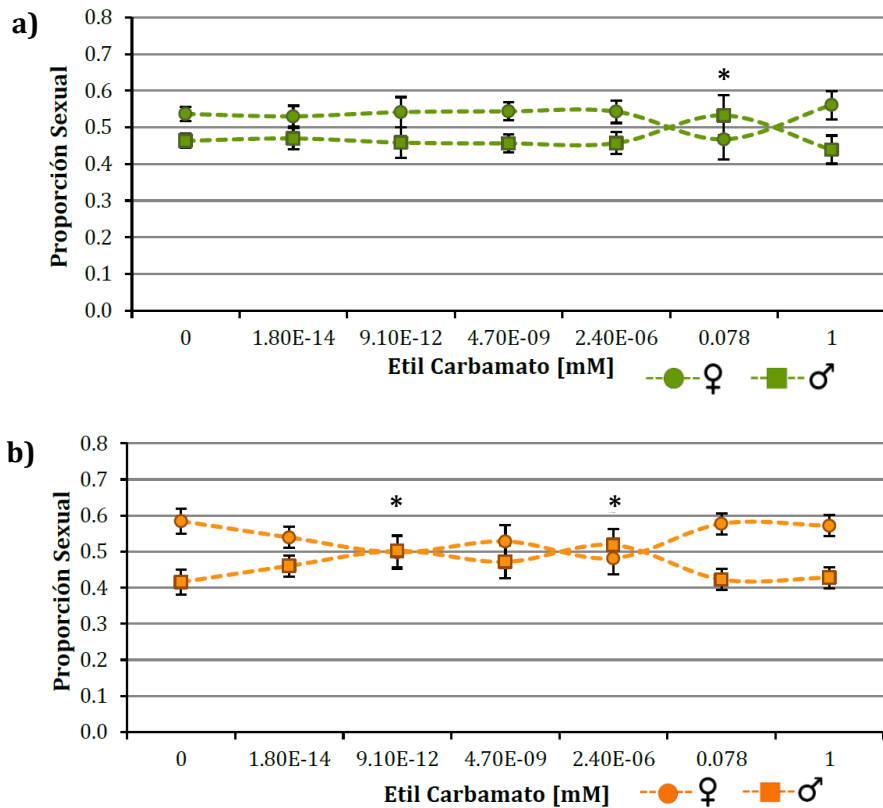


Fig. 21 Proporción Sexual de la descendencia de la cruza TxNT a) Libres de inversión y b) Portadoras de Inversión de la cruz TxNT, * dif. sig. con su testigo (IC_{0.95}).

Tabla 9. Progenie por familia (promedio \pm e.e.) y Proporción Sexual (promedio \pm e.e.) de la progenie de la cruz T x T.

EC [mM]	LIBRES DE INVERSIÓN				PORTADORAS DE INVERSIÓN			
	N	Promedio	Proporción Sexual		N	Promedio	Proporción Sexual	
			Hembras	Machos			Hembras	Machos
0.0E+00	126	15.75 \pm 3.78	0.41 \pm 0.05	0.59 \pm 0.05	145	18.13 \pm 4.54	0.44 \pm 0.04	0.56 \pm 0.04
1.8E-14	139	17.38 \pm 3.63	0.59 \pm 0.08 *	0.41 \pm 0.08 *	136	17.00 \pm 3.41	0.52 \pm 0.03	0.48 \pm 0.03
9.1E-12	252	28.00 \pm 4.43	0.50 \pm 0.03	0.50 \pm 0.03	246	27.33 \pm 3.88	0.50 \pm 0.01	0.50 \pm 0.01
4.7E-09	89	22.25 \pm 3.12	0.52 \pm 0.05 *	0.48 \pm 0.05 *	66	16.50 \pm 4.44	0.46 \pm 0.08	0.54 \pm 0.08
2.4E-06	285	35.63 \pm 6.99	0.48 \pm 0.06	0.52 \pm 0.06	236	29.50 \pm 5.59	0.52 \pm 0.05	0.48 \pm 0.05
7.8E-02	267	29.67 \pm 4.41	0.54 \pm 0.04 *	0.46 \pm 0.04 *	289	32.11 \pm 4.45	0.55 \pm 0.02 *	0.45 \pm 0.02 *
1.0E+00	142	17.75 \pm 3.51	0.45 \pm 0.05	0.55 \pm 0.05	145	18.13 \pm 3.34	0.56 \pm 0.05 *	0.44 \pm 0.05 *

N, progenie total; Intervalo de Confianza 95%, * diferencias significativas con el testigo.

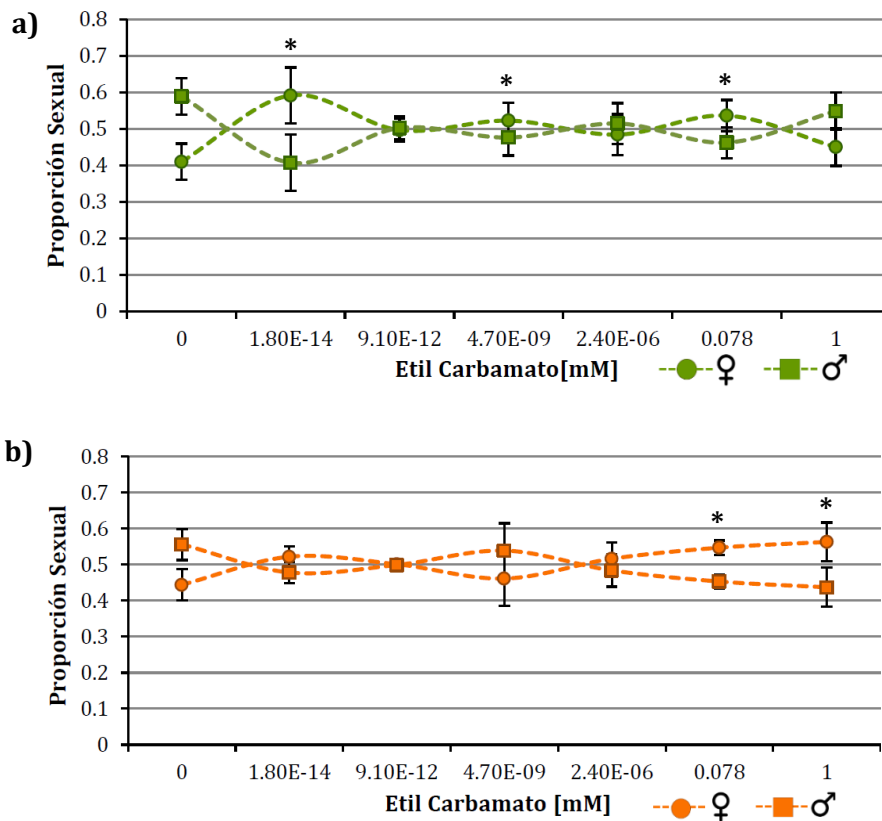


Fig. 22 Proporción Sexual de la descendencia de la cruz TxT: **a)** Libres de inversión y **b)** Portadoras de Inversión, *dif. sig. con su testigo (IC_{0.95}).

6.2.3. Daño multigeneracional

Para determinar el daño multigeneracional del EC, se analizaron las células somáticas de la descendencia de los distintos sistemas de cruce SMART modificadas, dependiendo el progenitor expuesto al EC durante su desarrollo larvario. En todos los casos se evaluó la cantidad, el tamaño de las manchas (células por mancha), así como su prevalencia a nivel poblacional (manchas por mosca) encontrándose resultados particulares dependiendo el tipo de progenitor expuesto al EC.

6.2.3.1. Frecuencia de manchas chicas, grandes y totales

La tabla 10a indica la frecuencia de manchas de la descendencia de la cruce NTxT, la frecuencia de manchas chicas y totales que se obtuvo en las concentraciones intermedias ($9.1E-12$, $4.7E-09$ y $2.4E-06$) se encontró por debajo de la frecuencia de manchas del testigo, siendo la frecuencia de la concentración $9.1E-12$ mM significativamente más baja que la del testigo (Fig. 25).

Por otro lado, en todas las concentraciones experimentales (excepto $9.1E-12$), la frecuencia de manchas grandes fue estadísticamente significativa en comparación con su testigo (Tabla 10a).

Cuando sólo la madre estuvo expuesta (TxNT), la frecuencia de manchas chicas y totales en la descendencia fue variable a lo largo de las concentraciones, sólo la concentración $2.4E-06$ fue estadísticamente significativa, mientras que en las concentraciones $4.7E-09$ y 0.078 mM la frecuencia de manchas totales fue inferior respecto al testigo (Tabla 10b).

En la descendencia de la cruce TxT la frecuencia de manchas chicas y totales mostró un incremento a la par de las concentraciones de EC; la concentración más baja ($1.8E-14$) y las tres más altas ($2.4E-06$, 0.078 y 1 mM) mostraron resultados significativos en comparación con el testigo (Tabla 10c).

Tabla 10. Frecuencia de manchas de la descendencia de los sistemas de cruce expuestos al EC**a)** Progenie de la cruce hembra No Tratada X macho Tratado (NT x T)

[mM] EC	Nº alas	Frecuencia de manchas por ala (número de manchas)							
		Manchas chicas (1-2 células)		Manchas grandes (>2 células)		Manchas gemelas		Manchas totales	
0.0E+00	120	0.34 (41)	(i)	0.00 (0)	(i)	0.01 (1)	(i)	0.35 (42)	(i)
1.8E-14	120	0.31 (37)	(-)	0.12 (14)	(+)	0.01 (1)	(i)	0.43 (52)	(-)
9.1E-12	120	0.12 (14)	(+)	0.03 (3)	(i)	0.03 (4)	(i)	0.17 (21)	(+)
4.7E-09	120	0.23 (28)	(-)	0.06 (7)	(+)	0.01 (1)	(i)	0.30 (36)	(-)
2.4E-06	120	0.19 (23)	(-)	0.07 (8)	(+)	0.01 (1)	(i)	0.27 (32)	(-)
7.8E-02	120	0.31 (37)	(-)	0.08 (10)	(+)	0.03 (3)	(i)	0.42 (50)	(-)
1.0E+00	120	0.29 (35)	(-)	0.04 (5)	(+)	0.02 (2)	(i)	0.35 (42)	(-)

b) Progenie de la cruce hembra Tratada X macho No Tratado (T x NT)

[mM] EC	Nº alas	Frecuencia de manchas por ala (número de manchas)							
		Manchas chicas (1-2 células)		Manchas grandes (>2 células)		Manchas gemelas		Manchas totales	
0.0E+00	120	0.25 (30)	(i)	0.08 (10)	(i)	0.00 (0)	(i)	0.33 (40)	(i)
1.8E-14	120	0.26 (31)	(-)	0.08 (9)	(i)	0.00 (0)	(i)	0.33 (40)	(-)
9.1E-12	120	0.33 (39)	(-)	0.05 (6)	(i)	0.02 (2)	(i)	0.39 (47)	(-)
4.7E-09	120	0.20 (24)	(-)	0.04 (5)	(i)	0.02 (2)	(i)	0.26 (31)	(-)
2.4E-06	120	0.38 (46)	(+)	0.12 (14)	(-)	0.03 (3)	(i)	0.52 (63)	(+)
7.8E-02	120	0.22 (27)	(-)	0.07 (7)	(-)	0.02 (2)	(i)	0.31 (37)	(-)
1.0E+00	120	0.24 (29)	(-)	0.08 (9)	(-)	0.03 (4)	(i)	0.35 (42)	(-)

c) Progenie de la cruce hembra Tratada X macho Tratado (T x T)

[mM] EC	Nº alas	Frecuencia de manchas por ala (número de manchas)							
		Manchas chicas (1-2 células)		Manchas grandes (>2 células)		Manchas gemelas		Manchas totales	
0.0E+00	120	0.17 (21)	(i)	0.08 (10)	(i)	0.00 (0)	(i)	0.26 (31)	(i)
1.8E-14	120	0.37 (44)	(+)	0.06 (7)	(-)	0.03 (3)	(i)	0.45 (54)	(+)
9.1E-12	120	0.22 (26)	(i)	0.04 (5)	(-)	0.01 (1)	(i)	0.28 (32)	(i)
4.7E-09	120	0.28 (33)	(i)	0.08 (9)	(-)	0.01 (1)	(i)	0.36 (43)	(i)
2.4E-06	120	0.34 (41)	(+)	0.04 (5)	(-)	0.03 (4)	(i)	0.42 (50)	(+)
7.8E-02	120	0.41 (49)	(+)	0.08 (9)	(-)	0.00 (0)	(i)	0.48 (58)	(+)
1.0E+00	120	0.31 (37)	(+)	0.06 (7)	(-)	0.03 (3)	(i)	0.39 (47)	(+)

Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Wurgler (1988): (+) positivo; (-) negativo; (i) indeterminado, nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

En la figura 23 se muestra la frecuencia de manchas totales registradas en la progenie de los tres sistemas de cruce y de las moscas expuestas al EC durante el desarrollo larvario. La descendencia de la cruce TxT presentó una respuesta muy similar a los organismos expuestos directamente al EC, mientras que la progenie de la cruce donde sólo la hembra estuvo expuesta al EC, tuvo fluctuaciones a lo largo de los lotes experimentales y la progenie donde sólo el macho estuvo expuesto al EC presentó la menor cantidad de manchas totales en comparación con los otros tipos de cruce y con los organismos expuestos al EC.

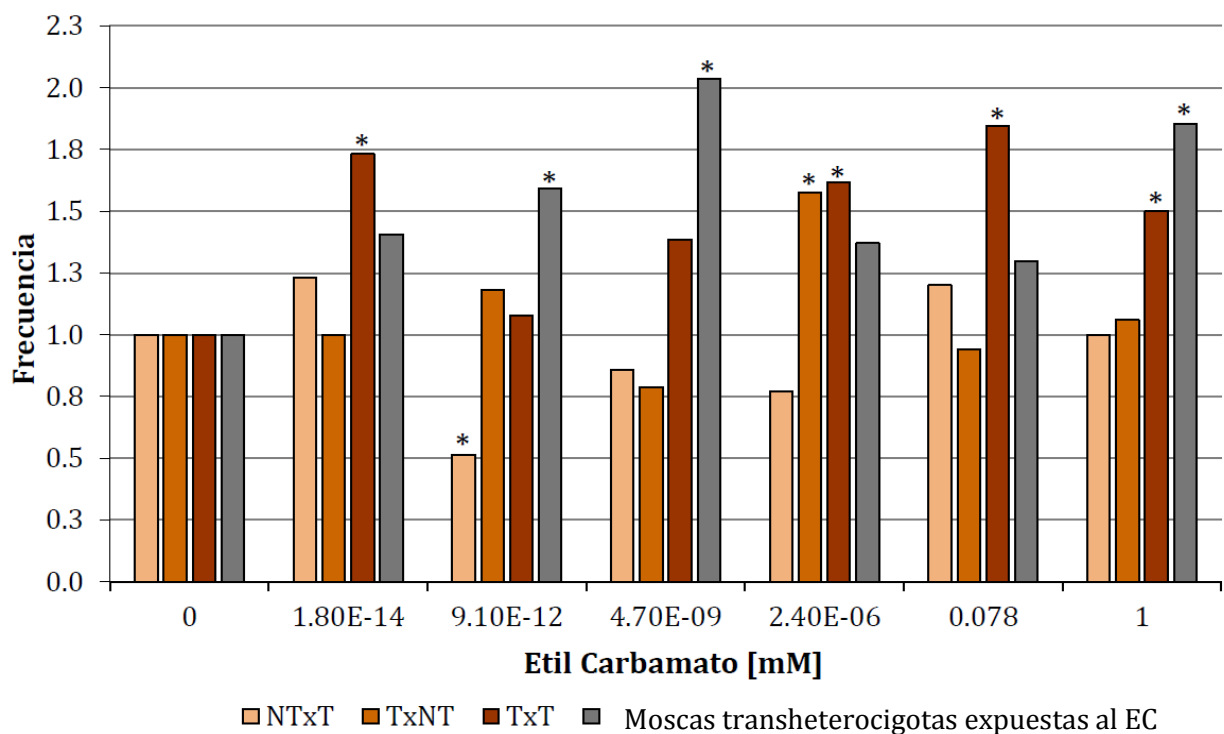


Fig. 23 Frecuencia corregida de las manchas totales de la descendencia de los sistemas de cruces SMART modificada y de las moscas transheterocigotas de la cruce SMART * Diferencias significativas respecto al testigo ($\alpha = 0.05$)

6.2.3.2. Distribución de la frecuencia de células por mancha

En la figura 24 se muestra la distribución de la frecuencia de células/mancha de la progenie de la crucea NTxT, a pesar de que en todas las concentraciones probadas se encontraron manchas de tamaño pequeño, ninguna rebasó a las de su testigo. Sin embargo, se obtuvo una distribución continua de manchas grandes en la mayoría de las concentraciones probadas, percibiéndose claramente en $1.8E-14$, $4.7E-09$ y 0.078 mM.

En la concentración $9.1E-12$ mM se encontró la menor cantidad de manchas, sin embargo, una tercera parte corresponde a manchas grandes. Además, se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de manchas con más de 3 células (incluidas las manchas gemelas) en todas concentraciones probadas de EC en comparación con su testigo (Tabla 10a).

Para la progenie de la crucea cuando sólo la madre fue tratada (Fig. 25) se encontró que la distribución de las manchas chicas a lo largo de las concentraciones de EC, a pesar de presentar variaciones siempre fue menor al testigo y la distribución de la frecuencia de manchas grandes fue más amplia, encontrando manchas de hasta más de 100 células/mancha, aunque en una baja frecuencia y sólo en $1.8E-14$ y $2.4E-06$ mM.

En el caso de la progenie de ambos padres expuestos al EC, la distribución de las células/mancha se comportó de manera opuesta a los otros sistemas de crucea, en la figura 26 se muestra que en todas las concentraciones se obtuvo una mayor cantidad de manchas chicas en comparación con su testigo y la distribución de la frecuencia de manchas grandes no superó a la del testigo en ninguno de los lotes experimentales.

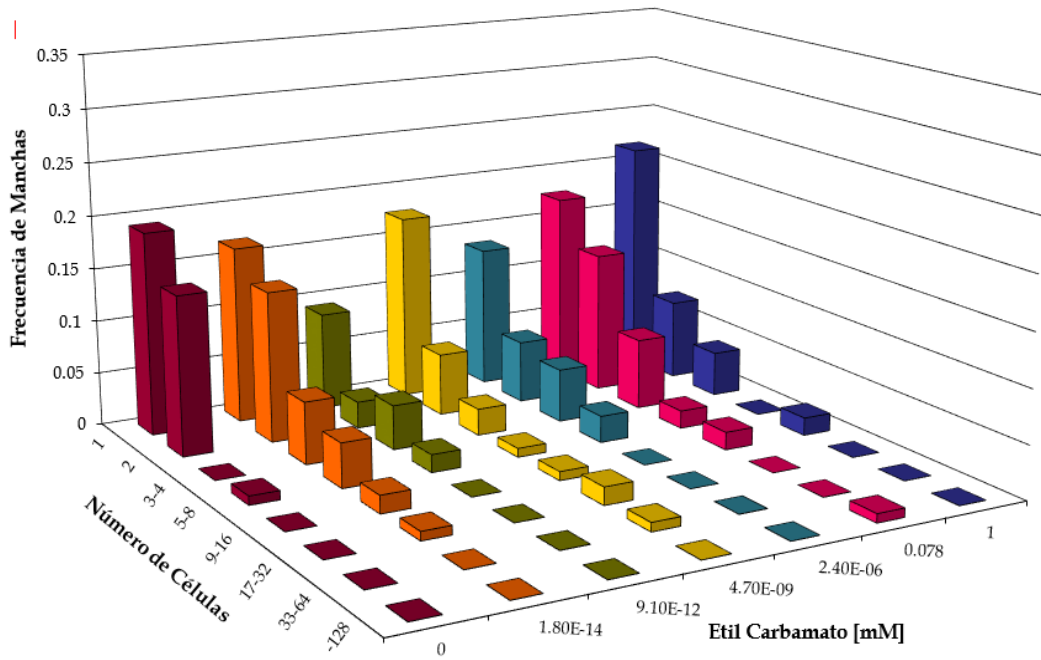


Fig. 24 Distribución de la frecuencia del tamaño de mancha (número de células) de la progenie de la cruce NTxT - macho tratado.

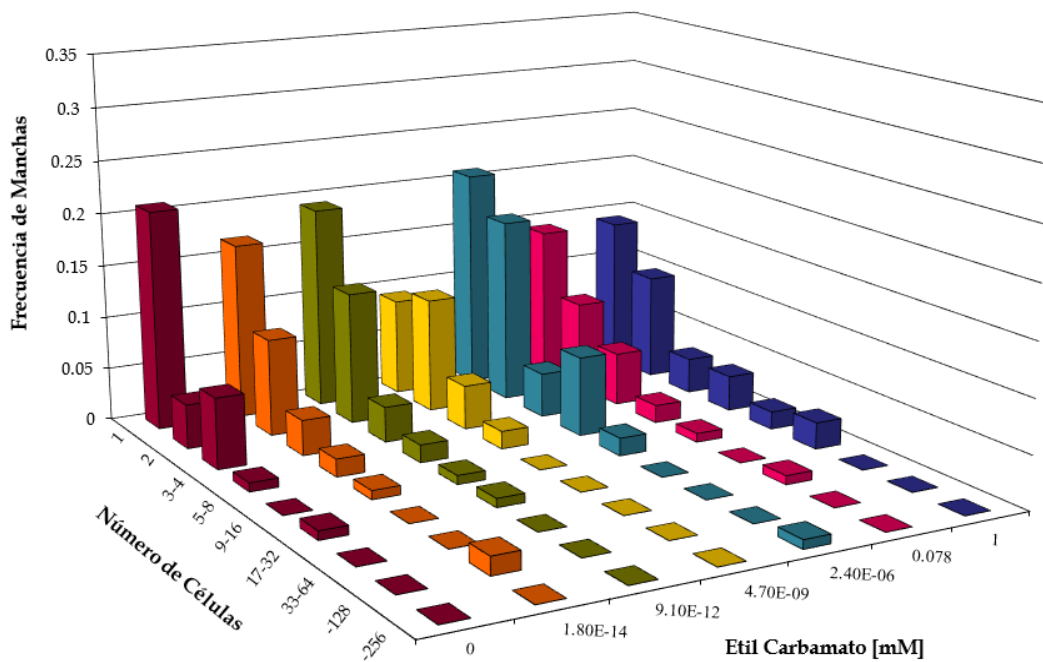


Fig. 25 Distribución de la frecuencia del tamaño de mancha (número de células) de la progenie de la cruce TxNT - hembra tratada.

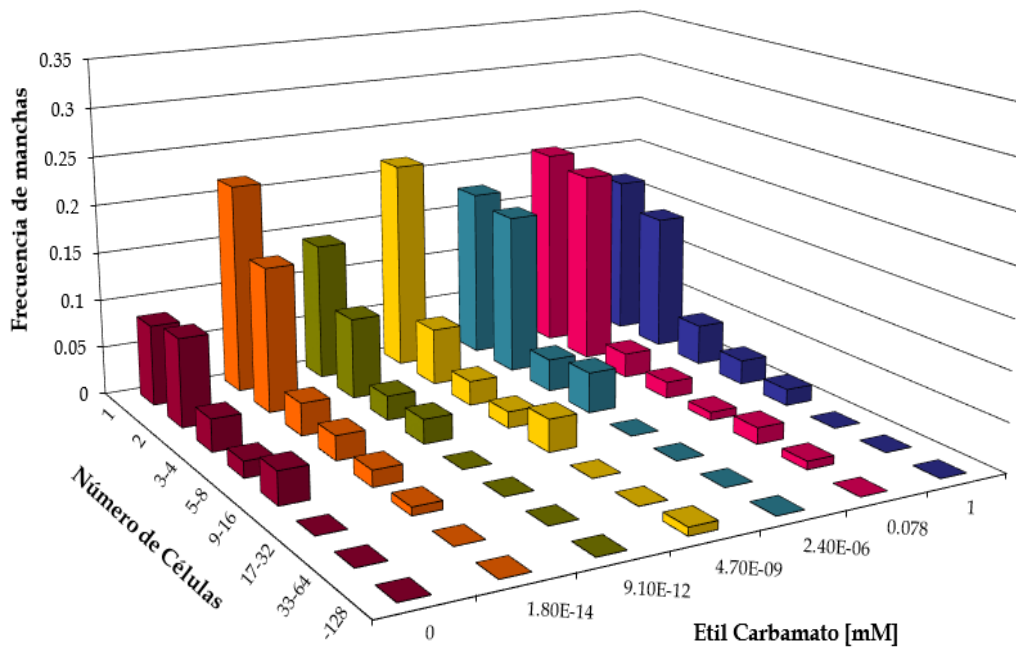
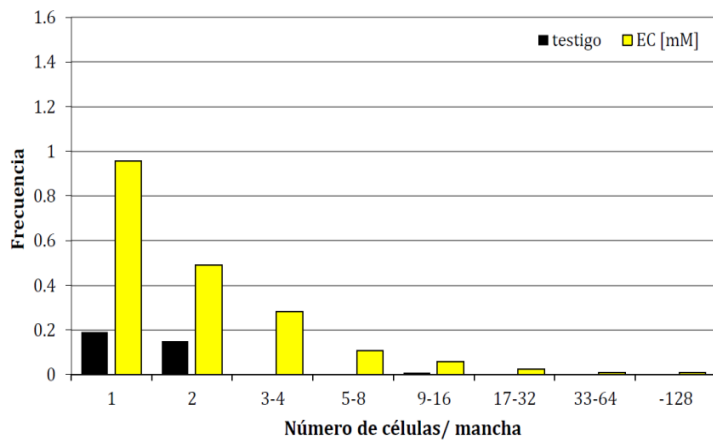


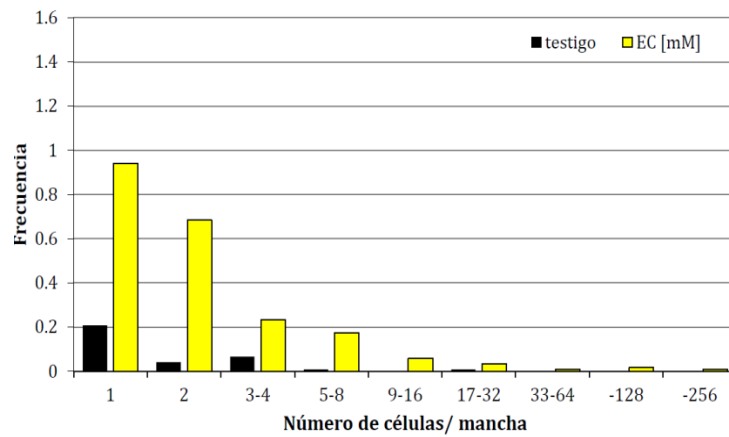
Fig. 26 Distribución de la frecuencia del tamaño de mancha (número de células) de la progenie de la cruce TxT- ambos padres tratados.

En la figura 27 se compara la frecuencia del tamaño de las manchas encontradas en los lotes testigo y experimentales de los tres sistemas de cruce y de las moscas expuestas directamente al EC.

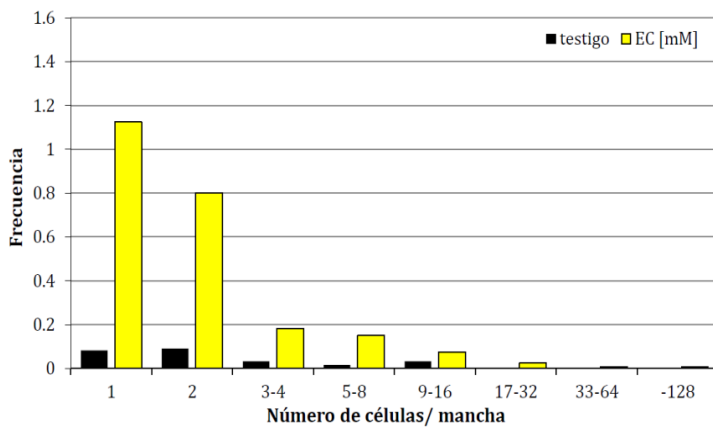
En general, en todos los tipos de progenie sin importar el género del progenitor expuesto al EC, se recuperaron manchas de tamaños similares a las de los organismos expuestos directamente durante la etapa larvaria (moscas transheterocigotas de la cruce SMART) (Fig. 27 a, b y c).



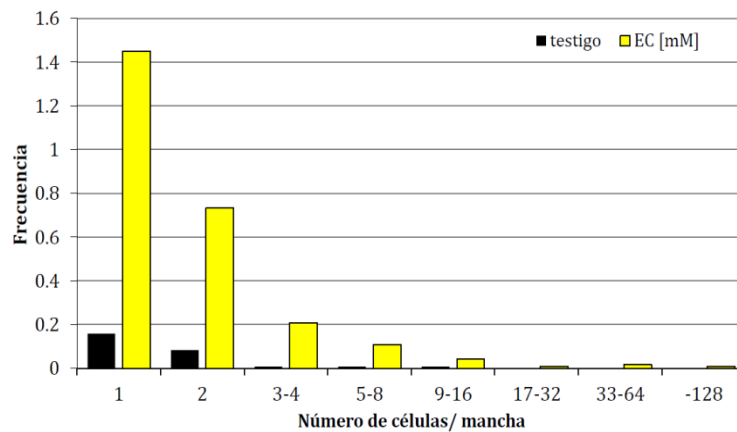
a) Progenie de la cruz NT x T - padre expuesto al EC



b) Progenie de la cruz T x NT - madre expuesta al EC



c) Progenie no expuesta de la cruz T x T - ambos padres tratados



d) Moscas transheterocigotas expuestas al EC

Fig. 27 Frecuencia acumulada sin considerar la concentración de EC, de las células por mancha de la descendencia de los diferentes sistemas de cruce **a)** NTxT **b)** TxNT y **c)** TxT comparada con la frecuencia de **d)** moscas transheterocigotas de la cruz SMART expuestas al EC .

6.2.3.3. Distribución de la frecuencia de manchas por mosca

En la figura 28, se muestra la distribución de la frecuencia de manchas por mosca que exhibió la progenie de la cruce NTxT. En las concentraciones intermedias $9.1E-12$, $4.7E-09$ y $2.4E-06$ mM se recobró un mayor número de moscas sin manchas, incluso más que en el testigo.

En la concentración $4.7E-9$ mM, a pesar de presentar menos moscas afectadas en comparación con el testigo, la distribución de las manchas fue particular debido a que sólo se encontraron moscas dentro de los rangos: con 1 a 3 manchas y con 10 a 60 manchas por mosca. En $1.8E-14$ y 0.078 mM cerca del 60% de las moscas analizadas presentaron manchas y la mitad de ellas tuvo más de 3 manchas por mosca.

En la descendencia de la cruce donde sólo la hembra fue tratada (TxNT) se obtuvo una respuesta similar al de la cruce NTxT, sólo que en este caso con un patrón alterno entre los lotes experimentales; en las concentraciones $1.8E-14$, $4.7E-9$ y 0.078 mM se recobraron más organismos sin manchas en comparación con el testigo y las concentraciones $9.1E-12$, $2.4E-6$ y 1 mM presentaron una mayor frecuencia de moscas afectadas en comparación con el testigo (Fig. 29).

En la figura 30 se muestra la distribución de la frecuencia de manchas/mosca de la descendencia de la cruce TxT, en todas las concentraciones se presentó una mayor frecuencia de moscas con manchas en comparación con el testigo específicamente a partir de $9.1E-12$ mM, la frecuencia de moscas con manchas fue en aumento con respecto al testigo, aunque la mayoría tuvo pocas manchas por mosca (de 1-2 manchas/mosca).

Cabe resaltar que el rango de 10 a 30 manchas/mosca es el umbral de la máxima cantidad de manchas que presentó una mosca, puesto que después de esa categoría se recuperaron muy pocas moscas, independientemente de la concentración de EC o el sistema de cruce del que se tratara.

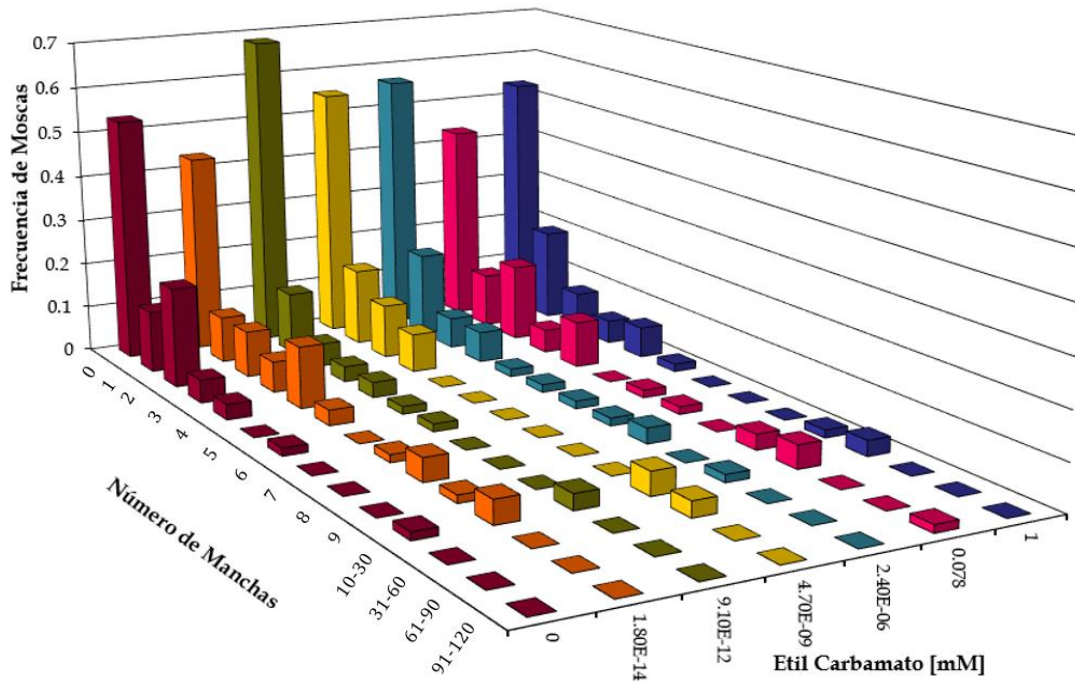


Fig. 28 Distribución de la frecuencia de manchas/mosca de la progenie de la cruz NTxT - macho tratado.

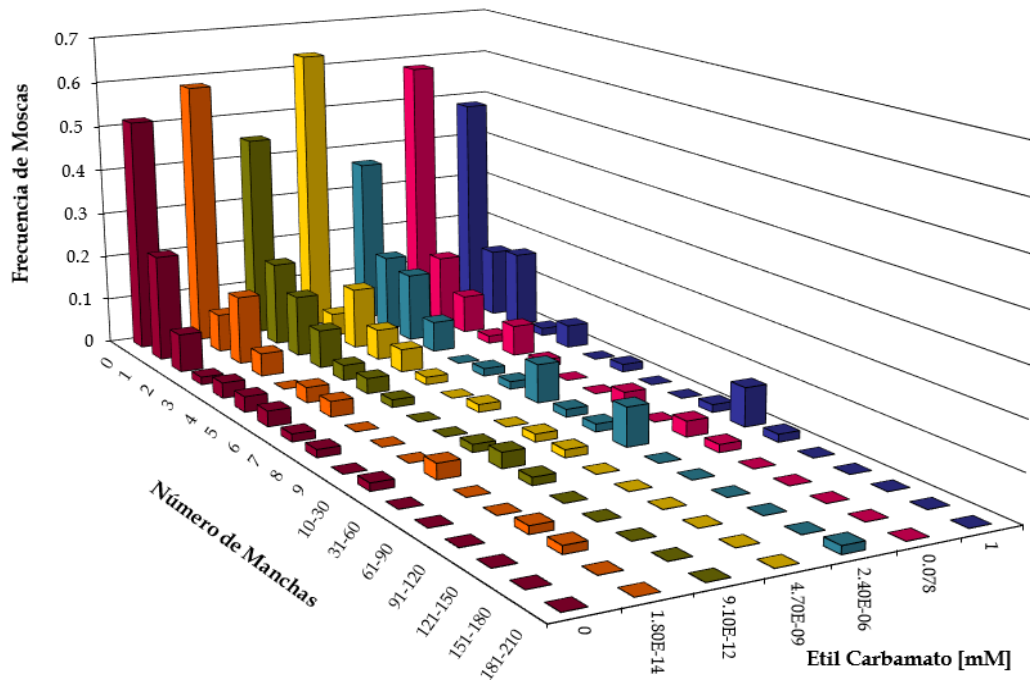


Fig. 29 Distribución de la frecuencia de manchas/mosca de la progenie de la cruz TxNT- hembra tratada.

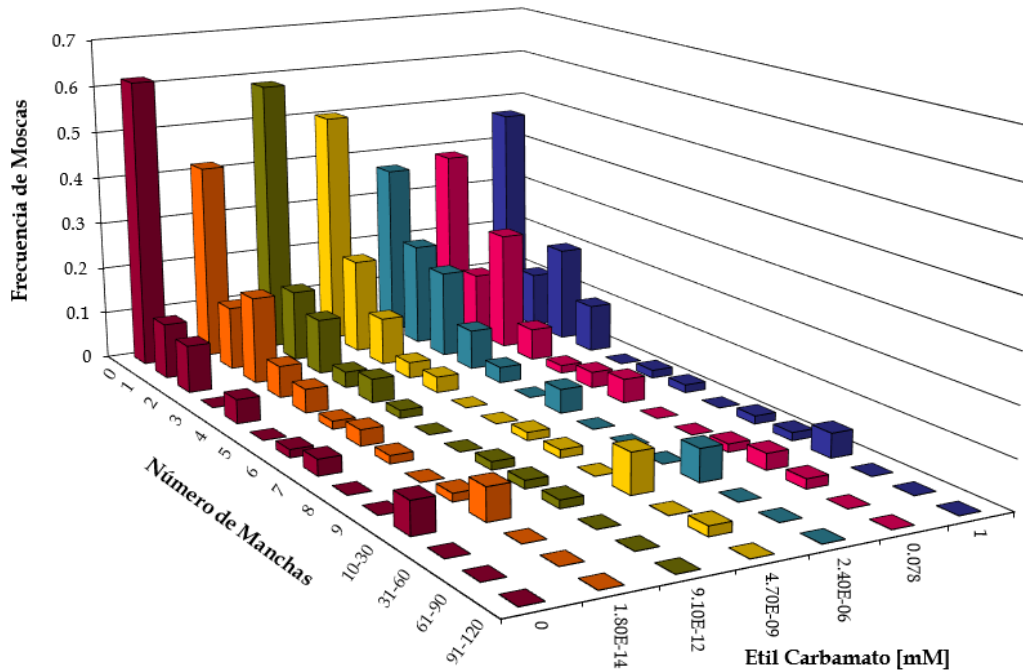
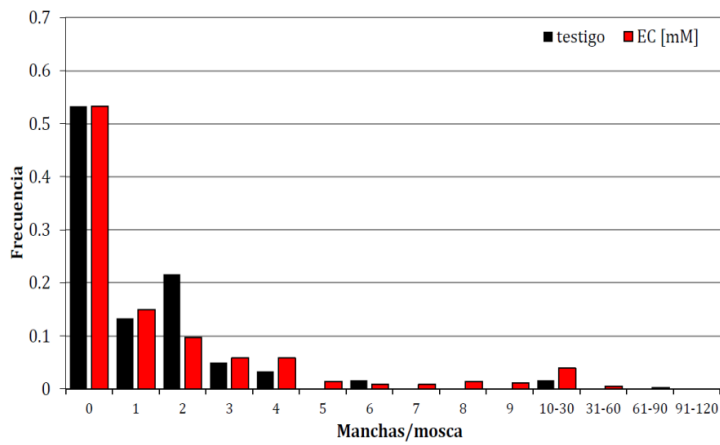


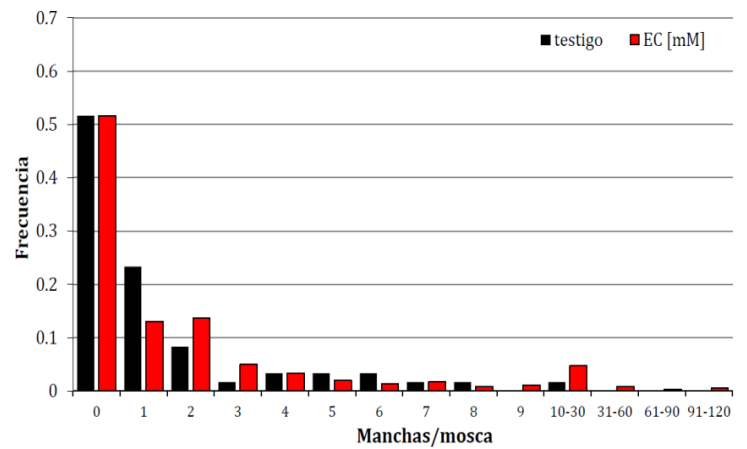
Fig. 30 Distribución de la frecuencia de manchas/mosca de la progenie de la cruce TxT – ambos padres tratados.

En la figura 31 se muestra la frecuencia de moscas con manchas de los lotes testigo y experimentales de los tres sistemas de cruce y de las moscas expuestas directamente al EC.

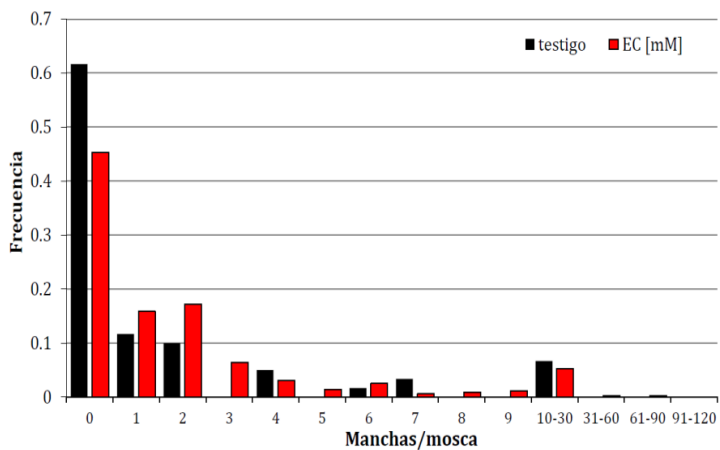
Con base en los tres sistemas de cruce y sin importar el progenitor expuesto al EC en la descendencia resultante de dichas cruces, se recupera una frecuencia de manchas por mosca muy similar (Fig. 31a y c) o incluso mayor (Fig. 31b) a la encontrada en las moscas transheterocigotas de la cruce SMART (Fig, 31d).



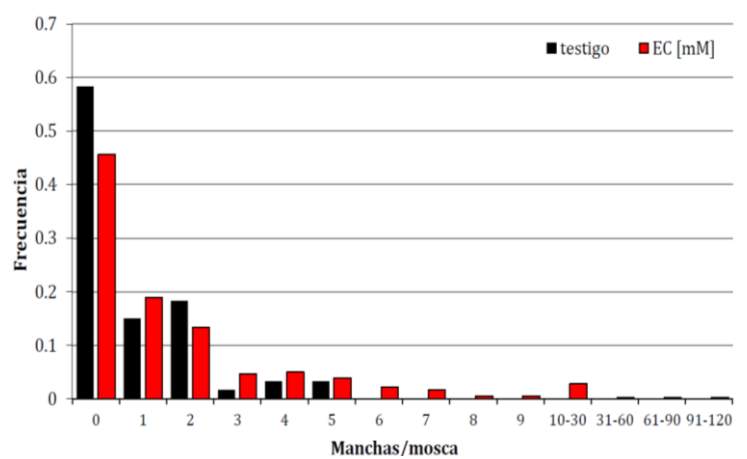
a) Progenie de la cruz NT x T - padre expuesto al EC



b) Progenie de la cruz T x NT - madre expuesta al EC



c) Progenie de la cruz T x T - ambos padres expuestos al EC



d) Moscas transheterocigotas expuestas al EC

Fig. 31 Frecuencia acumulada sin considerar la concentración de EC, de las manchas por mosca de la descendencia de los diferentes sistemas de cruce a) NTxT b) TxNT y c) TxT comparada con la frecuencia de d) las moscas transheterocigotas de la cruce SMART expuestas al EC .

7. DISCUSIÓN

La exposición a una gran variedad de agentes químicos y físicos está presente en la vida diaria de los seres vivos, algunos de estos compuestos tienen el potencial de poner en riesgo la integridad y la reproducción de los organismos. Actualmente, más de 84,000 sustancias químicas que se encuentran en la lista de la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. (EPA, 2007), presentan deficiencias en su regularización, por consiguiente, se ignoran los riesgos a la salud y otros efectos tóxicos a largo plazo (Vogel y Roberts, 2011) entre ellos el daño a las generaciones posteriores.

Durante los últimos 25 años se han realizado estudios en humanos y en distintos modelos animales sobre la posible asociación entre la exposición parental frente a los agentes mutagénicos y/o carcinogénicos y la ocurrencia de infertilidad, abortos espontáneos. Así como el impacto negativo en la descendencia que incluye cambios morfológicos en el desarrollo embrionario, mortalidad infantil, riesgo de padecer enfermedades crónicas como diabetes tipo 2, obesidad, enfermedades cardiovasculares y distintos tipos de cáncer (Smulevich *et al.*, 1999; Barber *et al.*, 2006; Glen y Dubrova, 2012).

La integridad de la información genética de los gametos masculino y femenino es vital para asegurar una transmisión correcta al nuevo individuo, por lo tanto, es crucial el entendimiento de los fenómenos involucrados, lo cual podría ser un paso importante en la prevención y tratamiento de problemas reproductivos y de igual manera en las enfermedades que se presentan a edades tempranas en generaciones siguientes.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la exposición de los padres a distintas concentraciones de EC durante la etapa larvaria provocó cambios en la integridad genética de las células somáticas de la progenie que se reflejó indirectamente en la aparición, multiplicación y distribución de los biomarcadores *flr³* y/o *mwh*, *e* en los tricomas de las alas de la progenie. Conjuntamente hubo repercusiones en el contexto reproductivo de los padres expuestos al EC; en la fertilidad, cantidad de progenie por familia y proporción sexual.

7.1. Efecto del EC en las moscas de la cruza SMART

Se obtuvo una menor sobrevivencia en la descendencia de moscas portadoras del cromosoma balanceador ($TM3, Bd^S/mwh,e,+$) en todas las concentraciones probadas en comparación con las moscas libres de inversión ($+, flr^3/mwh,e,+$), condición que puede atribuirse a los cambios en la localización de genes asociados a la modulación de la actividad metabólica y aunado a la falta de reparación por recombinación homóloga es probable que presenten varias consecuencias, entre ellas, la disminución en la sobrevivencia (Muñoz, 2008).

En cuanto a la Proporción Sexual (PS), en las moscas LI se contabilizó un mayor número de hembras y menor número de machos en cuatro de las seis concentraciones probadas de EC respecto a la PS promedio encontrada en el lote testigo ($IC_{0.95}$). Esto indica que en esas concentraciones la PS de ambos sexos se aleja de los valores de sus respectivos testigos, lo cual se debe al afecto directo ejercido por la exposición al EC.

Esta respuesta coincide con estudios llevados a cabo en otros organismos modelo que fueron expuestos a distintas concentraciones de insecticidas elaborados a partir del compuesto EC en donde encontraron alteraciones en la síntesis de hormonas reproductivas, deficiencias a nivel de maduración sexual y producción de gametos (Baligar y Kaliwal, 2002; Cheng *et al.*, 2006; Goad *et al.*, 2004).

Se analizó la frecuencia de manchas y la susceptibilidad poblacional al EC, en donde se pudo apreciar que, en las tres concentraciones más bajas hay incremento en la frecuencia de moscas afectadas al mismo tiempo que aumenta la aparición de manchas chicas y totales; esto se puede explicar porque la afectación en los organismos va siendo cada vez mayor y aunque las moscas lo metabolizan y reparan el daño genotóxico, se llega a un punto en el que es demasiado el daño en sus células (en este caso en la concentración $4.7E-9mM$) y si se sobrepasa ese límite se activan nuevos mecanismos de reparación de daño y capacidad de seguir con el proceso de división mitótica, esto explicaría el aumento en la cantidad de manchas grandes y el decaimiento en la cantidad de moscas afectadas y como consecuencia una disminución en la frecuencia de manchas totales

7.2. Efecto del EC en las líneas de las cruzas SMART modificada

En las cepas parentales *flr³/TM3,eBd^S* y *mwh,e* ninguna concentración resultó letal y se obtuvo una respuesta similar para ambos tipos de líneas de moscas expuestas, esto significa que la constitución genética de las cepas no fue una variable de intervención en la respuesta biológica obtenida (Lindsley y Zimm, 1992).

La mayor fluctuación de la PS respecto a su testigo se mostró en la cepa *flr³/TM3,eBd^S* sin embargo, no fue estadísticamente significativa. Esto puede deberse a la sofisticada construcción genética de la cepa, dado que los rearrreglos de los marcadores genéticos que posee dicha cepa, le confiere una sensibilidad distinta y considerando la toxicidad del tratamiento, se recuperaron pocos organismos por lo que la menor aparición de machos podría estar sesgada por el bajo número de sobrevivientes.

Por otro lado, en la PS de la cepa CS utilizada como testigo de línea hubo una respuesta significativa en concentraciones altas (2.4E-6 y 0.078mM), lo cual se aprecia en una mayor cantidad de hembras en comparación con el testigo, lo que indica que el EC sin duda ejerce un efecto en la proporción de sexos independientemente de los marcadores genéticos de las cepas.

La diferenciación sexual en la mosca de la fruta comprende el empalme alternativo de RNAs mensajeros de genes sexuales (*Sxl*, *tra*, *dsx*) (Burtis, 1993; Keisman *et al.*, 2001) y a pesar de que posee un sistema endocrino complejo ninguna hormona ha sido explícitamente implicada en tal proceso, otros autores proponen a la ecdisona y a la 20-hidroxiecdisona como contrapartes de las hormonas de mamíferos: testosterona y estrógeno, respectivamente (De Loof y Huybrechts, 1998) y que la formación de ovocitos maduros requiere de la hormona 20-hidroxiecdisona y la hormona juvenil (Carney y Bender, 2000).

7.2.1. Daño reprotóxico en los sistemas de la cruza SMART modificada

El efecto de la exposición al EC en los diferentes sistemas de cruza con relación a los biomarcadores de fertilidad (capacidad de tener hijos) y progenie promedio por familia fue distinta dependiendo el tipo de progenitor expuesto. Aun cuando no se confirmaron diferencias estadísticas significativas en todos los sistemas de cruza, de manera cualitativa pueden observarse diferencias que implican una importancia biológica en niveles más altos de organización (Lagadic *et al.*, 2000; Meza-González, 2015).

En cuanto a la fertilidad, es relevante mencionar que sólo en la concentración intermedia (4.7E-09mM) se mostró claramente un efecto sinérgico es decir, la disminución en la capacidad de procrear fue mucho más intensa en la cruza donde ambos progenitores estuvieron expuestos al EC (TxT) que la respuesta mostrada por separado en los sistemas de cruza donde sólo uno de los progenitores estuvo expuesto.

No obstante, en las demás concentraciones experimentales, la cruza TxT fue la que mayor fertilidad mostró, en segundo lugar la cruza TxNT y por último la cruza NTxT. Esto podría explicarse en virtud de que los organismos han desarrollado una serie de respuestas que se activan para hacer frente a cualquier factor que modifique o interrumpa la homeostasis del individuo (cambios en el ambiente, depredadores, clima, escasez de alimentos y otros) e inducen cambios que modifican su fisiología y/o su comportamiento con el propósito de maximizar su supervivencia y restablecer la homeostasis (Páez-Serna, 1998; Sapolsky, 2000; Monaghan y Hausmann, 2015).

Con relación al biomarcador de la cantidad de progenie por familia de los tres sistemas de cruza en general, se recobró un menor número de descendencia sólo cuando la hembra estuvo afectada y más descendencia cuando ambos padres fueron tratados. Esta fluctuación observada en concentraciones bajas de EC podría estar asociada al fenómeno de hormesis, esto implica que el organismo puede presentar una estimulación ante cantidades mínimas e inhibición en dosis altas de un compuesto; sin definirse umbrales delimitados ya que, a pesar de no representar letalidad, no existen dosis seguras o inofensivas (Lovell, 2000).

Existe evidencia de hormesis en diversos modelos biológicos considerándose una respuesta adaptativa ante estímulos tanto endógenos como ambientales que pueden desencadenar desde enfermedades multifactoriales hasta problemas de infertilidad y del desarrollo (Calabrese, 2008; Mattson, 2008; Ramírez-Flores, 2015).

Las fluctuaciones en la proporción sexual mostraron que en las cruzas NTxT y TxT la cantidad de hembras aumentó, aunque cuando ambos padres fueron expuestos se modificó la PS tanto de las moscas LI como de las PI. En cambio, en la cruce TxNT la cantidad de hembras disminuyó, como ocurrió en la PS de la progenie de la cruce SMART y de la cepa testigo CS. Por lo que se determinó que el EC afecta de manera importante la distribución normal de los sexos incluso una generación posterior a la exposición directa con el compuesto.

Lo anterior puede significar un efecto más devastador que si ocurriera durante la etapa adulta debido a que durante el desarrollo embrionario los disruptores endocrinos químicos pueden afectar de manera permanente la expresión génica y el desarrollo de los órganos que modulan la producción de hormonas y el número de receptores (Sugawara *et al.*, 2002).

Aun cuando no se ha explorado del todo la determinación sexual en *Drosophila*, la repercusión del EC a nivel reproductivo y en la PS es similar a la observada en otros modelos animales expuestos a pesticidas de carbamato (Baligar y Kaliwal, 2002; Goad *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2006).

Por esta razón, *Drosophila melanogaster* puede ser un modelo muy útil para la evaluación de disruptores endocrinos, puesto que es importante conocer más a fondo qué productos químicos tienen la capacidad de alterar las hormonas, los efectos en el sistema endocrino de los organismos expuestos y hasta cuantas generaciones pueden trascender las consecuencias de estos compuestos.

7.2.2. Daño multigeneracional del EC en los sistemas de cruza SMART modificada

El efecto multigeneracional del EC se evaluó a través de la prueba SMART, la cual proporcionó información cuantificable de los efectos provocados en el DNA; como mutación puntual, deleción, no disyunción o recombinación mitótica (Graf *et al.*, 1984) dichas alteraciones genéticas se evidenciaron indirectamente en la morfología de los tricomas de las alas de la descendencia de organismos expuestos al compuesto durante su etapa larvaria.

7.2.2.1. Cruza NT x T - macho progenitor tratado

La descendencia recuperada de la cruza donde sólo el macho estuvo expuesto al EC mostró una frecuencia significativamente mayor de manchas conformadas por más de dos células en comparación con el lote testigo, lo que implica la presencia de inestabilidad cromosómica que se manifiesta como daño en las células somáticas, las cuales se repararon en etapas tempranas del desarrollo y continuaron con el proceso de división mitótica.

Esto puede explicarse debido a que en los machos, la reparación del DNA es altamente eficiente durante la mitosis y en la interfase meiótica de las células germinales pero declina drásticamente al iniciar la meiosis, específicamente a partir de la reorganización y reemplazo de histonas por protaminas que junto con los mecanismos epigenéticos contribuyen entre otras cosas a proteger el genoma paterno del daño físico y químico (Rathke *et al.*, 2014) por lo que cualquier lesión en el DNA antes de esta etapa no puede ser reparada sino hasta después de la fecundación, a través de la maquinaria de reparación materna (Marchetti y Wyrobek. 2008; Castillo-Manzanilla, 2015). En *Drosophila* los espermatozoides deficientes en protaminas presentan una mayor sensibilidad a los rayos X (Rathke *et al.*, 2010).

Esto se reflejó en el descenso en la frecuencia de manchas totales en comparación con el testigo, ya que si la inestabilidad genómica de la descendencia es tal, que sobrepasa un determinado umbral, la maquinaria de reparación materna se satura y si los rompimientos no se reparan de inmediato, se activan cascadas de señalización que

conducen a la muerte celular por lo que el daño genotóxico podría no ser evidenciado, ya que la ausencia de células reparadas podría asociarse con una falta aparente de daño, lo que sería una conclusión errónea ya que el EC podría causar citotoxicidad hasta tal punto que una proporción de las células alteradas mueren (Ramos-Morales *et al.*, 2000; Herrera-Bazán, 2009).

7.2.2.2. Cruza T x NT - hembra progenitora tratada

En *Drosophila melanogaster* las células nodriza (células que acompañan al ovocito durante la ovogénesis) aportan RNAs, proteínas y organelos al ovocito en desarrollo hasta su maduración, estos factores embebidos en el citoplasma pasaran al futuro embrión para la activación de la transcripción del genoma del cigoto, la formación de los ejes antero-posterior y dorso-ventral y el comienzo del desarrollo del embrión en general (Farrell y O'Farrell, 2014; Laver *et al.*, 2015).

Durante el proceso de la ovogénesis existe una estricta regulación del mantenimiento del genoma materno. Un ejemplo, es la expresión de la proteína Dmp53 (*Drosophila p53*) en respuesta al daño del DNA, la cual se encarga de activar e inducir la apoptosis de las células germinales primordiales y también está involucrada en la reparación del DNA por rompimientos de doble cadena (Hu *et al.*, 2011; Robin *et al.*, 2019). Todo esto sugiere que existe una selección premeiótica de los ovocitos con la finalidad de asegurar la integridad genómica materna, garantizar la fertilidad y el adecuado desarrollo de la descendencia.

Cuando el proceso de la ovogénesis es afectado por algún factor genotóxico además del DNA, las proteínas, los RNAs y todos los factores encargados de la protección y reparación del genoma pueden verse afectados, por lo que las hembras manifestarán defectos en varios pasos de la reproducción incluyendo una disminución en la capacidad ovulatoria e inestabilidad genómica de los ovocitos (Tomasini *et al.*, 2008). Si el estrés genotóxico es excesivo o crónico puede conducir al agotamiento de la reserva folicular y por lo tanto llegar a la infertilidad.

La combinación de todos estos factores podría explicar los resultados obtenidos en las familias donde sólo la hembra fue expuesta al EC (TxNT); a pesar de que la capacidad de tener hijos no se modificó considerablemente (fertilidad), si disminuyó la fecundidad es

decir, la cantidad de hijos por familia fue menor y también modificó la integridad genómica de las células somáticas de la descendencia puesto que la frecuencia total de manchas así como el tamaño de las mismas fue diferente a la obtenida en el lote testigo, sin mostrar un patrón definido al aumentar la concentración de EC.

7.2.2.3. Cruza T x T – ambos progenitores tratados

Considerando todas las características particulares de la gametogénesis y el sistema reproductivo tanto del macho como de la hembra; en la descendencia proveniente de la cruce con ambos padres expuestos al EC (TxT) es probable que un estrés metabólico mucho mayor, promueva la activación de más cantidad o incluso nuevos mecanismos de desintoxicación que en condiciones individuales de exposición no se estimularían (Chen y Wagner, 2012; Garbuz *et al.*, 2017).

En el proceso reproductivo, diversos estudios coinciden en que en los machos, la capacidad de producir hijos está limitada al número de óvulos que consiga fecundar (Clutton-Brock, 2007) y los componentes del fluido seminal de *Drosophila melanogaster* como las proteínas de las glándulas accesorias (Acps) y el esperma, al transferirse a las hembras durante la cópula estimulan la maduración de los ovocitos (Heifetz *et al.*, 2001; Brommer *et al.*, 2012), esto explicaría el aumento en la fertilidad y en la cantidad de óvulos fecundados así como la deposición de los huevos.

Por otro lado, los resultados obtenidos en los biomarcadores de la prueba de inducción de mutación somática en las alas de las moscas proveniente de la cruce TxT exhibieron efectos muy similares a los obtenidos en las moscas transheterocigotas expuestas directamente al EC durante su desarrollo larval.

Esto significaría que el daño al DNA en las células de organismos expuestos a un compuesto durante un periodo largo o en etapas tempranas del desarrollo del individuo puede incrementar la propensión a adquirir alteraciones en el genoma de la futura descendencia. Si la capacidad de reparar no es suficiente o no repara eficazmente, estas alteraciones en su genoma se acumularán en periodos de tiempo muy cortos durante las subsiguientes divisiones celulares y dado que es un organismo que está en desarrollo la

dinámica de sus tejidos y órganos estarían en riesgo de transformación maligna, es decir en un estado diagnosticado como cáncer.

Dado que los resultados obtenidos en este trabajo no se pueden explicar fácilmente por los paradigmas actuales debido a que no existe una sola respuesta, sin duda este trabajo proporciona nuevas bases que pueden ser aprovechadas por las herramientas moleculares disponibles, con el objetivo de dilucidar la compleja red de causas del cáncer en edades tempranas y problemas de infertilidad.

7.3. Consideraciones finales

Las etapas tempranas en el ciclo de vida de la mayoría de los organismos son las más sensibles al estrés ambiental y, por lo tanto, la plasticidad fenotípica multigeneracional, mediante la cual el entorno parental y el entorno de la descendencia interactúan y como consecuencia se altera el fenotipo de la progenie, es clave para promover la persistencia de dichas modificaciones frente a los cambios ambientales.

Si bien, se han realizado un sinnúmero de estudios con relación a los efectos en la descendencia a través de la vía materna, en años recientes se ha encontrado cada vez más evidencia respecto a que el efecto paterno también puede desempeñar un papel igual de trascendental en las siguientes generaciones.

En este trabajo se descubrió que de manera individual las experiencias maternas y paternas frente a un compuesto genotóxico como el EC, afectaron heterogéneamente el rendimiento de la descendencia (fertilidad, progenie por familia, proporción sexual y estabilidad genómica).

Sin embargo, sorprendentemente, se encontró que el efecto paterno (cruza NTxT) a menudo redujo el rendimiento de la descendencia en comparación con el efecto materno (TxNT), reflejándose en una disminución en la frecuencia de manchas totales y aumento en la frecuencia de manchas grandes, lo que conlleva a una mayor cantidad de rearrreglos estructurales debidos a las constantes reparaciones del DNA y por lo tanto mayor propensión a desarrollar un proceso carcinogénico en etapas tempranas.

Por lo que es necesario un entendimiento más completo de los procesos fisiológicos asociados con la reproducción y obtener más información acerca del transporte, el destino y la biodisponibilidad del compuesto dentro del organismo expuesto por primera vez para la identificación del potencial daño, tanto a nivel germinal como somático y a lo largo de las generaciones para lograr una comprensión integral de las posibles consecuencias en los organismos expuestos y en sus descendientes.

8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten obtener las siguientes conclusiones:

- ≡ El EC tuvo un efecto multigeneracional ya que la frecuencia de los biomarcadores cuantitativos como: el número de manchas, su tamaño y su incidencia en las moscas expuestas durante su desarrollo larvario fue similar a la frecuencia de manchas de la F_1 de uno o ambos padres expuestos al EC durante etapas tempranas de su desarrollo.
- ≡ La respuesta al daño reprotóxico y el mecanismo que lo promueve es diferente cuando ambos padres estuvieron expuestos al EC que cuando sólo uno de los dos progenitores estuvo tratado.
- ≡ El EC provoca cambios significativos en la Proporción Sexual en *Drosophila melanogaster* tanto por exposición directa como a nivel multigeneracional, sin importar el progenitor que haya sido expuesto.
- ≡ La modificación de la prueba de SMART presentada en este trabajo al ser versátil, económica y cuantificable, puede ser utilizada como una alternativa *in vivo* para estudiar el efecto reprotóxico y multigeneracional de distintos compuestos de interés.

9. REFERENCIAS

- Abe, S. y M. Sasaki. 1977. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells exposed to various chemicals. *Journal of the National Cancer Institute*, 58(6): 1635–1641.
- ACOG, 2013. Exposure to toxic environmental agents. *The American College of Obstetricians and Gynecologists*. 17pp.
- Adams, P. y F. Baron. 1965. Esters of carbamic acid. *Chemical Reviews*, 65: 567-602.
- Adams, M., S. Celniker, R. Holt, C. Evans, J. Gocayne, P. Amanatides, S. Scherer, P. Li, R. Hoskins, R. Galle, R. George, S. Lewis, S. Richards, M. Ashburner, S. Henderson, G. Sutton, ... J. Venter. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461): 2185-2195.
- Aguilera, A. y T. García-Muse. 2013. Causes of Genome Instability. *Annual Review of Genetics*, 47: 1-32.
- Alberts, B., D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff y U. Patrone. 2011. Introducción a la biología celular. 3^o edición. Médica Panamericana, México. 900 pp.
- Allen, J., G. Stoner, M. Pereira, L. Backer, Y. Sharief, G. Hatch, J. Campbell, A. Stead y S. Nesnow. 1986. Tumorigenesis and genotoxicity of ethyl carbamate and vinyl carbamate in rodent cells. *Cancer Research*, 46(10): 4911–4915.
- An, D. y C. Ough. 1993. Urea excretion and uptake by wine yeasts as affected by various factors. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44: 35-40.
- Arellano-Aguilar, R. 2002. *Drosophila* como modelo *in vivo* para evaluar el potencial genotóxico de muestras ambientales en Los Azufres, Michoacán. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 61 pp.
- Aresta, M., M. Boscolo y D. Franco. 2001. Copper (II) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6): 2819-2824.
- Ashburner, M., K. Golic y R. Hawley. 2005. *Drosophila* a Laboratory Handbook 2^o edition. Cold Spring Harbor. New York. 1409pp.
- Ashwood, M. y R. Edwards. 1996. DNA repair by oocytes. *Molecular Human Reproduction*, 2(1): 46–51.
- Baarends, W., R. van der Laan y J. Grootegoed. 2001. DNA repair mechanisms and gametogenesis. *Reproduction*, 121(1): 31–39.
- Baligar, P., Kaliwal, B., 2002. Reproductive toxicity of carbofuran to female mice: effects on estrous cycle and follicles. *Ind. Health* 40, 3455–4352.

- Barber, R., P. Hickenbotham, T. Hatch, D. Kelly, N. Topchiy, G. Almeida, G. Jones, G. Johnson, J. Parry, K. Rothkamm y Y. Dubrova. 2006. Radiation-induced transgenerational alterations in genome stability and DNA damage, *Oncogene* 25(56): 7336-7342.
- Barton, T., B. Robaire y B. Hales. DNA damage recognition in the rat zygote following chronic paternal cyclophosphamide exposure. *Toxicological Science*, 100(2): 495–503.
- Bate, M. y A. Martínez-Arias. 1991. The embryonic origin of imaginal discs in *Drosophila*. *Development*, 112: 755-761.
- Battaglia, R., H. Conacher y B.D. Page. 1990. Ethyl carbamate (urethane) in alcoholic beverages and foods: a review. *Food Additives Contaminants*, 7(4): 477–496.
- Beland, F., R. Benson, P. Mellick, R. Kovatch, D. Roberts, J. Fang y D. Doerge. 2005. Effect of ethanol on the tumorigenicity of urethane (ethyl carbamate) in B6C3F1 mice. *Food and Chemical Toxicology*, 43(1): 1–19.
- Bellen, H., C. Tong, H. Tsuda. 2010. 100 years of *Drosophila* research and its impact on vertebrate neuroscience: a history lesson for the future. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(7): 514-522.
- Bier, E. 2005. *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nature Review Genetics*, 6(1): 9–23.
- Bloom, J., J. Schimenti y R. Weiss. 2019. Germline genome protection: implications for gamete quality and germ cell tumorigenesis. *Andrology*, 7(4): 516-526.
- Boyland, E. y R. Nery. 1965. The metabolism of urethane and related compounds. *Biochemical Journal*, 94(1): 198-208.
- Brommer, J. C. Fricke, D. Edward y T. Chapman. 2012. Interactions between genotype and sexual conflict to environmental influence transgenerational fitness in *Drosophila melanogaster*. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 66(2): 517-531.
- Brusick, D. 1987. Principles of Genetic Toxicology. 2ª edición. Plenum, New York. 285pp.
- Budavari, S. 2001. The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals 13th ed. Merck: Whitehouse Station, NJ. 2708pp.
- Bunkar, N., N. Pathak, N. Lohiya y P. Mishra. 2016. Epigenetics: a key paradigm in reproductive health. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 43(2): 59-81.
- Burtis, K. 1993. The regulation of sex determination and sexually dimorphic differentiation in *Drosophila*. *Current Opinion of the Cell Biology*, 5: 1006–1014
- Burkhard, W. y H. Fritz-Niggli. 1987. Antiteratogenic and anticarcinogenic effects of X-rays in urethane-treated NMRI mice. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 51(6): 1031–1039.

- Calabrese, E. 2008. Hormesis and medicine. *British Journal of Clinical Pharmacology* 66(5): 594-617.
- Canas, B., D. Havery, L. Robinson, M. Sullivan, F. Joe Jr y G. Diachenko. 1989. Ethyl carbamate levels in selected fermented foods and beverages. *Journal Association of Official Analytical Chemists*, 72(6): 873-876.
- Carney, G. y M. Bender. 2000. The *Drosophila* ecdysone receptor (EcR) gene is required maternally for normal oogenesis. *Genetics*, 154: 1203–1211.
- Casarett & Doull's essentials of toxicology. 2008. Ed. C.D. Klaassen y J.B. Watkins II.. Mexico City: McGraw-Hill Medical. 459pp
- Castillo-Manzanilla, M.M. 2015. Modulación por efecto materno del daño reprotóxico inducido por la azida de sodio en machos de *D. melanogaster*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 73 pp.
- CDC, 2003. Second National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals, 205, Carbamate Pesticides. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta. https://www.jhsph.edu/research/centers-and-institutes/center-for-excellence-in-environmental-health-tracking/Second_Report.pdf Fecha de consulta: 30 Junio 2019.
- CENSIA. 2015. Centro Nacional para la Salud de la Infancia y la Adolescencia. Recuperado de: http://censia.salud.gob.mx/contenidos/cancer/cancer_infantil.html. Fecha de consulta: 07 Septiembre 2018.
- Cerutti, G., F. Pavanello y L. Bolognini. 2000. Ethyl carbamate in wines and grappa produced in Veneto province *Imbottigliamento*, 23: 36–40.
- Cervantes, R., J. Stringer, S. Changshun, J. Tischfield y P. Stambrook. 2002. Embryonic stem cells and somatic cells differ in mutation frequency and type. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6): 3586–3590.
- Chen, B. y A. Wagner. 2012. Hsp90 is important for fecundity, longevity and buffering of cryptic deleterious variation in wild fly populations. *BioMed Central Evolutionary Biology*, 12(25).
- Cheng, S., Chen, J., Qui, Y., Hong, X., Xia, Y., Feng, T., Liu, J., Song, L., Zhang, Z., Wang, X., 2006. Carbaryl inhibits basal and FSH-induced progesterone biosynthesis of primary human granulosa-lutein cells. *Toxicology* 220, 37–45.
- Clark, A. 1982. The use of larval stages of *Drosophila* in screening for some naturally occurring mutagens. *Mutation Research*, 92(1-2): 89-97.
- Clegg, B., R. Frank, B. Ripley, N. Chapman, H. Braun, M. Sobolov y S. Wright. 1988. Contamination of alcoholic products by trace quantities of ethyl carbamate (urethane). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 41(6): 832–837.

- Cohen, S. 1993. Imaginal disc development. En "The Development of *Drosophila melanogaster*". Vol. 2 eds. M. Bate y A. Martinez-Arias. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 747-841.
- Colt, J. y A. Blair. 1998. Parental occupational exposures and risk of childhood cancer. *Environmental Health Perspective*, 106(Suppl 3): 909-925.
- Crebelli, R., D. Bellincampi, G. Conti, L. Conti, G. Morpurgo y A. Carere. 1986. A comparative study on selected chemical carcinogens for chromosome malsegregation, mitotic crossing-over and forward mutation induction in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 172 (2): 139-149.
- Dekant, W. 2009. The role of biotransformation, En: Lunch A. (ed). *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology, Vol.1: Molecular Toxicology*, Switzerland, 57-86.
- De Loof, A. y R. Huybrechts. 1998. Insects do not have sex hormones: a myth? *Gen. Comp. Endocrinol.* 111: 245-260
- Dennis, L., C. Lynch, D. Sandler y M. Alavanja. 2010. Pesticide use and cutaneous melanoma in pesticide applicators in the agricultural health study. *Environ Health Perspect* 118(6), 812-817.
- Ding, X. y L. Kaminsky. 2003. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annual Review of pharmacology and toxicology*, 43:149-173.
- Environmental Protection Agency, Office of Research and Development. 1997 Research Plan for Endocrine Disruptors. EPA/600/R-98/087. Washington, DC: U.S. https://cfpub.epa.gov/ncer_abstracts/index.cfm/fuseaction/display.rfatext/rfa_id/56. Fecha de consulta: 30 Junio 2019.
- EPA, Environmental Protection Agency. 2007. TSCA chemical substance inventory: basis information. Washington DC. Recuperado de: <https://www.epa.gov/chemicals-under-tsca> Fecha de consulta: 14 Diciembre 2018.
- Farrell, J. y P. O'Farrell. 2014. From egg to gastrula: How the cell cycle is remodeled during the *Drosophila* mid-blastula transition. *Annual Review Genetics*, 48; 269-294.
- Ferm, V. 1966. Severe developmental malformations. Malformations induced by urethane and hydroxyurea in the hamster. *Archives Pathology*, 81: 174-177.
- Fernandez-Twinn, D. Constanca y S. Ozanne. 2015. Intergenerational epigenetic inheritance in models of developmental programming of adult disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 43: 85-95.
- Filser, J. 2008. Toxicokinetics. En: H Greim, R Snyder (eds): *Toxicology and Risk Assessment*. John Wiley & Sons, Hoboken, 19-49.

- Francisquetti, E., R. Vanderlinde, J. Carrau y P. Moyna. 2002. Ethyl carbamate content in wines produced and commercialized in southern Brazil. *Acta Farmacéutica Bonarense*, 21: 201-204.
- Frei, H. y F. Würgler. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutation Research*, 203(4): 297-308.
- Fristrom, D. y J. Fristrom. 1993. The metamorphic development of adult epidermis. En "The Development of *Drosophila melanogaster*" Vol. 2. eds. M Bate y A Martinez-Arias. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 843-897.
- Frölich, A. y F. Würgler. 1990. Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing spot test: dependence on genotype-controlled metabolic capacity. *Mutation Research*, 244(3): 201-208.
- Fukuto, T. 1979. Effect of structure on the interaction of organophosphorus and carbamate esters with acetylcholinesterase. En: "Neurotoxicology of Insecticides and pheromones", eds. Narahashi T. Springer, USA. 277-295.
- Galli, A. y R. Schiestl. 1998. Effect of Salmonella assay negative and positive carcinogens on intrachromosomal recombination in S-phase arrested yeast cells. *Mutation Research*, 419(1-3): 53-68.
- Garbuz, D. 2017. Regulation of Heat Shock Gene Expression in response to stress. *Molecular Biology* 51(3): 352-367.
- García-Bellido, A. y J. Dapena. 1974. Induction, detection, and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila melanogaster*. *Molecular & General Genetics*, 128(2): 117-130.
- García-Bellido, A. y J. Merriam. 1971. Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 24(1): 61-87.
- Ghanayem, B. 2007. Inhibition of urethane-induced carcinogenicity in Cyp2e1^{-/-} in comparison to Cyp2e1^{+/+} mice. *Toxicological Sciences*, 95(2): 331-339.
- Giam, M. y G. Rancati. 2015. Aneuploidy and chromosomal instability in cancer: a jackpot to chaos. *Cell Division*, 10(3):1-12.
- Gibson, G. y P. Skett. 2001. Introduction to drug metabolism. Nelson Thornes, 3^o ed. Cheltenham. 256p.
- Glen, C. y Y. Dubrova. 2012. Exposure to anticancer drugs can result in transgenerational genomic instability in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(8): 2984-2988.
- Goad, R., J. Goad, B. Atieh y R. Gupta. 2004. Carbofuran-induced endocrine disruption in adult male rats. *Toxicology mechanisms and methods*, 14(4): 233-239.

- Graf, U., H. Juon, A. Katz, H. Frei y F. Würgler. 1983. A pilot study on a new *Drosophila* spot test. *Mutation Research*, 120(4): 233-239.
- Graf, U. y N. van Schaik. 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 271(1): 59-67.
- Graf, U., F. Würgler, A. Katz, H. Frei, H. Juon, C. Hall y P. Kale. 1984. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*, 6(2): 152-188
- Guengerich, F. y D. Kim. 1991. Enzymatic oxidation of ethyl carbamate to vinyl carbamate and its role as an intermediate in the formation of 1,N6-ethenoadenosine. *Chemical Research Toxicology*, 4(4):413-421.
- Guengerich, F. 2008. Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, 21(1): 70-83.
- Ha, M., S. Hu, H. Park, H. Lee, K. Kwon, E. Han, K. Kim, E. Ko, S. Ha y D. Bae. 2006. Estimation of Korean adult's daily intake of ethyl carbamate through Korean commercial alcoholic beverages based on the monitoring 2006. *Food Science and Biotechnology*, 15(1): 112-116.
- Hällstrom, I., A. Sundvall, U. Rannung, B. Grafstrom y C. Ramel. 1981. The metabolism of drugs and carcinogens in isolated subcellular fractions of *Drosophila melanogaster* activation of vinyl chloride, 2-aminoanthracene and benzo[a]pyrene as measured by mutagenic effects in *Salmonella typhimurium*. *Chemico-Biological Interactions*, 34(2): 129-143.
- Hanahan, D. y R. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5): 646-674.
- Hanson, M. y M. Skinner. 2016. Developmental origins of epigenetic transgenerational inheritance. *Environmental Epigenetics*, 2(1):1-9.
- Hara, K. y R. Harris. 2002. The anesthetic mechanism of urethane: the effects on neurotransmitter-gated ion channels. *Anesthesia & Analgesia*, 94(2): 313-318.
- He, S. y R. Baker. 1991. Micronuclei in mouse skin cells following in vivo exposure to benzo[a]pyrene, 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, chrysene, pyrene and urethane. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 17(3): 163-168.
- Heifetz, Y. U. Tram y M.F. Wolfner. 2001. Male contributions to egg production: the role of accessory gland products and sperm in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings Biological Sciences*, 268(1463):175-180.
- Hirschboeck, J., M. Lindert, J. Chase y T. Calvy. 1948. Effects of urethane in the treatment of leukemia and metastatic malignant tumors. *Journal of the American Medical Association*, 136(2): 90-95.
- Hoffler, U. y B. Ghanayem. 2005. Increased bioaccumulation of urethane in CYP2E1-/- versus CYP2E1+/- mice. *Drug Metabolism & Disposition*, 33(8):1144-50.

- Hu, W., T. Zheng y J. Wang. 2011. Regulation of fertility by the p53 family members. *Genes & Cancer*, 2(4): 420-430.
- Huoi, C., A. Olsson, T. Lightfoot, E. Roman, J. Clavel, B. Lacour, P. Kaatsch, H. Kromhout, R. Vermeulen, S. Peters, H. Bailey y J. Schüz. 2014. Parental occupational exposure and risk of childhood central nervous system tumors: a pooled analysis of case-control studies from Germany, France, and the UK. *Cancer causes & control*, 25(12): 16013-1613.
- IARC, International Agency for Research of Cancer. 2010. Monographs on Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Alcohol consumption and ethyl carbamate. Lyon, France. 96: 1281-1378.
- Ibrahim, A.Th. y A.S. Harabawy. 2014. Sublethal toxicity of carbofuran on the African catfish *Clarias gariepinus*: Hormonal, enzymatic and antioxidant responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 106(33-39).
- Ji, B., X. Shu, M. Linet, W. Zheng, S. Wacholder, Y. Gao, D. Ying y F. Jin. 1997. Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *Journal of the National of Cancer Institute*, 89(3): 238-244.
- Keisman, E., A. Christiansen y B. Baker. 2001. The sex determination gene doublesex regulates the A/P organizer to direct sex-specific patterns of growth in the Drosophila genital imaginal disc. *Developmental Cell* 1(2): 215-225
- Kim, Y., E. Koh, H. Chung y H. Kwon. 2000. Determination of ethyl carbamate in some fermented Korean foods and beverages. *Food Additives Contaminants*, 17(6): 469-475.
- Klaassen, C. y J. Watkins. 2005. Fundamentos de Toxicología. 2ª edición. McGraw-Hill, 536 pp.
- Kolbezen, M., R. Metcalf y T. Fukuto. 1954. Insecticide structure and activity, insecticidal activity of carbamate cholinesterase inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2(17): 864-870.
- Kumar, M., K. Kumar, S. Jain, T. Hassan, R. Dada. 2013. Novel insights into the genetic and epigenetic paternal contribution to the human embryo. *Clinics*, 68(S1): 5-14.
- Lachenmeier, D., B. Schehl, T. Kuballa, W. Frank y T. Senn. 2005. Retrospective trends and current status of ethyl carbamate in German stone-fruit spirits. *Food Additives Contaminants*, 22(5): 397-405.
- Lagadic, L., T. Caquet, J. Amiard y F. Ramade. 2000. Use of biomarkers for environmental quality assessment. 1ª ed. Science Publishers, Inc. USA. 324pp.
- Lajovic, A., L. Nagy, P. Guengerich y U. Bren. 2015. Carcinogenesis of Urethane: simulation versus Experiment. *Chemical Research Toxicology*, 28(4): 691-701.
- Langie, S., S. Achterfeldt, J. Gorniak, K. Halley-Hogg, D. Oxley, F. van Schooten, R. Godschalk, J. McKay y J. Mathers. 2013. Maternal folate depletion and high-fat feeding from weaning affects DNA

- methylation and DNA repair in brain of adult offspring. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 27(8): 3323–3334.
- Langie, S., K. Gudrun, D. Desaulniers, F. Al-Mulla, R. Al-Temaimi, A. Amedei, A. Azqueta, W. Bisson, D. Brown, G. Brunborg, A.K. Charles, T. Chen, A. Colacci, F. Darroudi, S. Forte, L. González, R. Hamid, L.E. Knudsen, L. Leyns, A.L. Salsamendi, L. Memeo, C. Mondello, C. Mothersill, A. Olsen, S. Pavanello, J. Raju, E. Rojas, R. Roy, E. Ryan, P. Ostrosky-Wegman, H. Salem, A. Scovassi, N. Singh, M. Vaccari, F. Van Schooten, M. Valverde, J. Woodrick, L. Zhang, N. van Larebeke, M. Kirsch-Volders y A. Collin. 2015. Causes of genome instability: the effect of low dose chemical exposures in modern society. *Carcinogenesis*, 36(supl1): S61–S88.
- Laver, J., A. Marsolais, C. Smibert y H. Lipshitz. 2015. Regulation and function of maternal gene products during the Maternal to Zygotic Transition in *Drosophila*. En H. Lipshitz, *The Maternal to Zygotic Transition*. Elsevier Inc, (113):43-84.
- Lawrence, P.. 1992. *The Making of a Fly: The Genetics of Animal Design*. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 228p.
- Lee, L., T. Orr-Weaver. 2003. Regulation of cell cycles in *Drosophila* development: intrinsic and extrinsic cues. *Annual Review of Genetics*, 37: 545–578.
- Lee, W., D. Sandler, A. Blair, C. Samanic, A. Cross y M. Alavanja. 2007. Pesticide use and colorectal cancer risk in the Agricultural Health Study. *International Journal of Cancer*, 121(2): 339-346.
- Lee, A., D. Endesfelder, A. Rowan, A. Walther, N. Birnbak y P. Futreal. 2011. Chromosomal instability confers intrinsic multidrug resistance. *Cancer Research*, 71(5):1858–1870.
- Levine, R., I. Yang, M. Hossain, G. Pandya, A. Grollman y M. Moriya. 2000. Mutagenesis induced by a single 1,N6-ethenodeoxyadenosine adduct in human cells. *Cancer Research*, 60 (15): 4098-4104.
- Leyns, L. y L. Gonzalez. 2012. Genomic integrity of mouse embryonic stem cells. En "Embryogenesis". Capítulo 15 eds. Sato K. InTech. 333-358.
- Lindsley, D. y E. Grell. 1972. *Genetic variations of Drosophila melanogaster* 2° edition. Carnegie Institution of Washington Publication. Washington D.C. 471pp.
- Loeb, L. 2011. Human cancers express mutator phenotypes: origin, consequences and targeting. *Nature Reviews Cancer*. 11(6):450–457.
- Lodola, A. y J. Stadler. 2011. *Pharmaceutical toxicology in practice: a guide for non-clinical development*. John Wiley & Sons Inc. New Jersey. 258 pp.
- Lovell, D. 2000. Dose-response and threshold-mediated mechanisms in mutagenesis: statistical models and study design. *Mutation Research*, 464(1): 87-95.

- MacArthur, A., M. McBride, J. Spinelli, S. Tamaro, R. Gallagher y G. Theriault. 2008. Risk of childhood leukemia associated with parental smoking and alcohol consumption prior to conception and during pregnancy: the cross-Canada childhood leukemia study. *Cancer Causes and Control*, 19(3): 283–295.
- Marchetti, F., J. Essers, R. Kanaar y A. Wyrobek. 2007. Disruption of maternal DNA repair increases sperm-derived chromosomal aberrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(45): 17725–17729.
- Marchetti, F. y A. Wyrobek. 2008. DNA repair decline during mouse spermiogenesis results in the accumulation of heritable DNA damage. *DNA Repair*, 7(4): 572–581.
- Martincorena, I., R. Gerstung, M. Dawson, K. Haase, K. Van Loo, P. Davies, H. Stratton y P. Campbell. 2017. Universal patterns of selection in cancer and somatic tissues. *Cell*, 171: 1029–1041.e21
- Mattson, M. 2008. Hormesis defined. *Ageing Research Reviews* 7(1): 1-7.
- Medinsky, M. y J. Valentine. 2001. Toxicokinetics. En: C.D. Klaassen (ed.): *Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons*. McGraw-Hill, New York, 225–237.
- Menezó, Y., B. Dale y M. Cohen. 2010. DNA damage and repair in human oocytes and embryos: a review. *Zygote*, 18(4): 357-65.
- Merlo, L. y C. Maley. 2010. The role of genetic diversity in cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 120(2):401–403.
- Metcalf, R. 2000. Carbamate Insecticides. En “Insect Control”. Capítulo 7 eds. Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry. 299-303.
- Meza-González, N. 2015. Caracterización de la fecundidad como un marcador de resistencia en la respuesta genotóxica inducida por el uretano en *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 85p.
- Monaghan, P. y M. Haussmann. 2015. The positive and negative consequences of stressors during early life. *Early Human Development*, 91: 643-647.
- Morris, I., S. Ilott, L. Dixon y D. Brison. 2002. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Human Reproduction*, 17(4): 990–998.
- Muñoz-Hernández, A., P. Ramos-Morales y J. Muñoz. 2008. Exploring the mutagenic activity of colchicine in *Drosophila*. *Drosophila Information Service*, 91: 127-133.
- Myers, P. y W. Hesler. 2007. Does ‘the dose make the poison? Extensive results challenge a core assumption in toxicology. *Environmental Health News*. 6pp.

- National Toxicology Program. 2004. Toxicology and carcinogenesis: studies of urethane, ethanol, and urethane/ethanol in B6C3F1 mice (drinking water studies). Technical Report Series. Research Triangle Park. 346p.
- Negrini, S., V. Gorgoulis y T. Halazonetis. 2010. Genomic instability-an evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(3): 220-228.
- Nomura, T. 1975. Transmission of tumors and malformations to the next generation of mice subsequent to urethan treatment. *Cancer Research*, 35(1): 264-266.
- Nomura, T. 1977. Similarity of the mechanism of chemical carcinogen-initiated teratogenesis and carcinogenesis in mice. *Cancer Research*, 37(4): 969-973.
- Nöthinger, R. 1970. Sucrose density separation- a method for collecting large number of *Drosophila* larvae. *Drosophila Information Service*, 45:177.
- Olsen, A., B. Lindeman, R. Wiger, N. Duale y G. Brunborg. 2005. How do male germ cells handle DNA damage? *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207(2): 521-531.
- Oster, I. 1958. Interactions between ionizing radiation and chemical mutagens. *Zeitschrift fur Indukt Abstammungs und Vererbungslehre*, 89(1): 1-6.
- Ough, C., E. Crowell y B. Gutlove. 1988. Carbamyl compound reactions with ethanol. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39: 239-242.
- Páez-Serna, Y. 1998. Interacción entre la temperatura y la genotoxicidad de algunos xenobióticos en células somáticas de las alas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 135p.
- Pant, N., R. Shankar y S. Srivastava. 1996. Spermatotoxic effects of carbaryl in rats. *Human & Experimental Toxicology*, 15(9): 736-738.
- Park, K., A. Liem, B.C. Stewart y J. Miller. 1993. Vinyl carbamate epoxide, a major strong electrophilic, mutagenic and carcinogenic metabolite of vinyl carbamate and ethyl carbamate (urethane). *Carcinogenesis*, 14(3): 441-450.
- Paterson, E., A. Haddow, I. Thomas, J. Watkinson. 1946. Leukemia treated with urethane compared with deep X-ray therapy. *Lancet*, 1(6402): 677-683.
- Petzold, G. y J. Swenberg. 1978. Detection of DNA damage induced in vivo following exposure of rats to carcinogens. *Cancer Research*, 38(6): 1589-1594.
- Phillips, D. y V. Arlt. 2009. Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. En: *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. Vol. 1: Molecular Toxicology. Alemania, 87-110.
- Pikor, L., K. Thu, E. Vucic y W. Lam. 2013. The detection and implication of genome instability in cancer. *Cancer Metastasis Review*, 32(3-4): 341-352.

- Plese, L., L. Paraiba, L. Foloni y L. Trevizan. 2005. Kinetics of carbosulfan hydrolysis to carbofuran and the subsequent degradation of this last compound in irrigated rice fields. *Chemosphere*, 60, 149–156.
- Ramírez-Flores, M. 2015. Uso de *Drosophila mojavensis* para el estudio del daño reprotóxico y transgeneracional. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 68p.
- Ramos-Morales, P., M. Abundis, O. Gaytán, T. Ordáz, S. Orozco, L. Maldonado, A. Hernández, C. González, M. Reyes, M. Galicia y M. Muñoz. 1993. Manual de Laboratorio de Genética para *Drosophila melanogaster*. Mc Graw-Hill, México. 131pp.
- Ramos-Morales, P., M. Ordaz, A. Dorantes, H. Rivas, P. Campos, M. Martínez y B. Hernández. 2000. *Drosophila* is a reliable biomonitor of water pollution. En “Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change 2”, eds. F Butterworth, A Gunatilaka y ME Gonsebatt. Springer Science. New York, EUA. 257-299.
- Rathke, C., B. Barckmann, S. Burkhard, S. Jayaramaiah-Raja, J. Roote y R. Renkawitz-Pohl. 2010. Distinct functions of Mst77F and protamines in nuclear shaping and chromatin condensation during *Drosophila* spermiogenesis. *European Journal of Cell Biology*, 89 (4):326–338.
- Rathke, C., W. Baarends, S. Awe y R. Renkawitz-Pohl. 2014. Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1839(3): 155-168.
- Rendic, S. y F. Di Carlo. 1997. Human cytochrome P450 enzymes: A status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metabolism Reviews*, 29:413–580.
- Robin, M., A. Issa, C. Santos, F. Napoletano, C. Petitgas, G. Chatelain y B. Mollereau. 2019. *Drosophila* p53 integrates the antagonism between autophagy and apoptosis in response to stress. *Autophagy*, 15(5): 771-784
- Sapolsky, R. 2000. Stress hormones: good and bad. *Neurobiology of disease*, 7: 540-542.
- Sharp, D. y J. Parry. 1981. Induction of mitotic gene conversion by 41 coded compounds using the yeast culture JD1. En “Progress in Mutation Research” Vol. I: eds. de Serres F.J. y J. Ashby. Elsevier Science, 491–501.
- Shen, Z. 2011. Genomic instability and cancer: an introduction. *Journal of Molecular Cell Biology*, 3(1): 1-3.
- Skinner, M. 2008. What is an epigenetic transgenerational phenotype? F3 or F2. *Reproductive Toxicology*. 25: 2-6.
- Smulevich, V., L. Solionova y S. Beyakova. 1999. Parental occupation and others factors and cancer risk in children: II. Study methodology and non-occupational factors. *International Journal of Cancer* 83(6): 718-722.

- Sotomayor, R. y G. Segá. 2000. Unscheduled DNA synthesis assay in mammalian spermatogenic cells: an update. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 36(4): 255–265.
- Spycher, B., J. Lupatsch, A. Huss, J. Rischewski, C. Schindera, A. Spoerri, R. Vermeulen y C. Kuehni. 2017. Parental occupational exposure to benzene and the risk of childhood cancer: A census-based cohort study. *Environment International*, 108: 84-91.
- Subsistema Epidemiológico y Estadístico de Defunciones. 2016. Dirección General de Información en Salud Recuperado de:
http://www.dgis.salud.gob.mx/contenidos/basesdedatos/std_defunciones.html. Fecha de consulta: 22 agosto 2018.
- Sugawara, T., A. Nakajima, y E. Nomura. 2002. Development of a simple screening system for endocrine disruptors. *Medical Science Monitor*, 8(11):BR431-438.
- Suzuki, K., H. Kamimura, A. Ibe, S. Tabata, K. Yasuda y M. Nishijima. 2001. Formation of ethyl carbamate in umeshu (plum liqueur). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 42(6): 354–358.
- Thomson, A., A. Campbell, D. Irvine, R. Anderson, C. Kelnar y W. Wallace. 2002. Semen quality and spermatozoa DNA integrity in survivors of childhood cancer: a case-control study. *Lancet*, 360(9330): 361–367.
- Tijet, N., C. Helvig y R. Feyereisen. 2001. The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: annotation intron-exon organization and phylogeny. *Gene*, 262(1-2): 189-198.
- Tomasini, R., K. Tsuchihara, M. Wilhelm, T. Mak. 2008. TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes & Development*, 22(19): 2677-2691.
- Tyler, M. 2000. *Developmental Biology, A Guide for Experimental Study* 2º edition. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts. 206pp.
- Uthurry, C., F. Varela, B. Colomo, J. Suárez-Lepe, J. Lombardero y J. García del Hierro. 2004. Ethyl carbamate concentrations of typical Spanish red wines. *Food Chemistry*, 88(3): 329–336.
- Van Maele-Fabry, G., A. Lantin, P. Hoet y D. Lison. 2010. Childhood leukaemia and parental occupational exposure to pesticides: a systematic review and meta-analysis. *Cancer causes & control*, 21(6): 787-809.
- Vogel, E. 1975. Some aspects of detection of potential mutagenic agents in *Drosophila*. *Mutation Research*, 29(2): 241-250.
- Vogel, S. y J. Roberts. 2011. Why substances control act needs an overhaul, and how to strengthen oversight of chemicals in the interim. *Health Affairs*, 30(5): 898-905.
- Vogelstein, B., N. Papadopoulos, V. Velculescu, S. Zhou, L. Diaz Jr y K. Kinzler. 2013. Cancer genome landscapes. *Science*, 339(6127):1546–1558.

- Wang, Y., A. Salmon y L. Harshman. 2001. A cost of reproduction: oxidative stress susceptibility is associated with increased egg production in *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology*, 36(8): 1349-1359.
- Wigle, D., M. Turner y D.A. Krewski. 2009. A systematic review and meta-analysis of childhood leukemia and parental occupational pesticide exposure. *Environmental Health Perspective*, 117: 1505-1513.
- Wittkopp, P., J. True y S. Carroll. 2002. Reciprocal functions of the *Drosophila* yellow and ebony proteins in the development and evolution of pigment patterns. *Development*, 129(8): 1849-1858.
- Worley, M., L. Setiawan y I. Hariharan. 2012. Regeneration and transdetermination in *Drosophila* imaginal discs. *Annual Review of Genetics*, 46:289-310.
- Xia, Y., S. Cheng, Q. Bian, L. Xu, M.D. Collins, H.C. Chang, L. Song, J. Liu, S. Wang y X. Wang. 2005. Genotoxic effects on spermatozoa of carbaryl-exposed workers. *Toxicological Sciences*, 85(1): 615-623.
- Zimmerli, B. y J. Schlatter. 1991. Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. *Mutation Research*, 259(3-4): 325-350.