



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE *DROSOPHILA* PARA
IDENTIFICAR LA ACTIVIDAD DEL DISRUPTOR ENDOCRINO DE
MAMÍFEROS *N-NITROSODIMETILAMINA*, NDMA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. OSCAR EDUARDO TABARES MOSQUERA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

Dra. PATRICIA RAMOS MORALES

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dr. RAFAEL CAMACHO CARRANZA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

Dr. LUIS HUMBERTO MOJICA VÁZQUEZ

CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA, UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE *DROSOPHILA* PARA
IDENTIFICAR LA ACTIVIDAD DEL DISRUPTOR ENDOCRINO DE
MAMÍFEROS *N-NITROSODIMETILAMINA*, NDMA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. OSCAR EDUARDO TABARES MOSQUERA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

Dra. PATRICIA RAMOS MORALES

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dr. RAFAEL CAMACHO CARRANZA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

Dr. LUIS HUMBERTO MOJICA VÁZQUEZ

CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA, UNAM

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

OFICIO FCIE/DAIP/211/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de marzo de 2022 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del estudiante **TABARES MOSQUERA OSCAR EDUARDO** con número de cuenta **520461648** con la tesis titulada **“DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DROSOPHILA PARA IDENTIFICAR LA ACTIVIDAD DEL DISRUPTOR ENDOCRINO DE MAMÍFEROS N-NITROSODIMETILAMINA, NDMA”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. PATRICIA RAMOS MORALES**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: **DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE**
Vocal: **DR. JAVIER ANDRÉS JUÁREZ DÍAZ**
Vocal: **DRA. REGINA DORINDA MONTERO MONTOYA**
Vocal: **DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO**
Secretario: **DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA**

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 30 de mayo de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por permitirme la formación como Maestro en Ciencias Biológicas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que fue de gran apoyo para culminar con éxito mis estudios de Maestría desde agosto 2019 a julio 2021. CVU: 1004148.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT). Registro de proyecto IN229719.

A la Dra. Patricia Ramos Morales, por hacer posible este trabajo, por su continuo apoyo durante las actividades académicas, por su guía, paciencia y confianza.

Al Comité Tutor: Dr. Rafael Camacho Carranza y Dr. Luis Humberto Mojica Vázquez por los aportes que realizaron para mejorar y fortalecer el trabajo de investigación.

Al Dr. Javier Andrés Juárez Díaz, miembro invitado del comité tutor, por sus valiosas aportaciones durante el desarrollo de este trabajo y el apoyo para llevar a cabo actividades experimentales.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de llegar a este país a estudiar una Maestría en Ciencias Biológicas de alta calidad.

A los miembros del jurado: Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, Dr. Javier Andrés Juárez Díaz, Dra. Regina Dorinda Montero Montoya, Dr. Juan José Rodríguez Mercado y Dr. Rafael Camacho Carranza por dedicar de su tiempo para la revisión del manuscrito, realizar comentarios, sugerencias y correcciones en pos de mejorar este trabajo.

A la Dra. Patricia Ramos Morales por ser la persona que hizo posible mi llegada a este bello país, que posee gran riqueza cultural y calidad académica. La Dra. Patricia es definitivamente un recinto de sabiduría, de conocimiento, lo complicado lo hace ver fácil, y lo que parece imposible lo vuelve tangible. Su elocuencia y brillantez son dignas de admiración, un ejemplo a seguir. Me siento orgulloso de haber tenido su tutoría durante mis estudios de Maestría. Gracias infinitas por creer en mis capacidades, por la confianza y la paciencia sin límites, así como darme ánimo cuando las cosas no estaban saliendo como yo quería y apoyarme siempre.

A la Dra. Adriana Muñoz Hernández por su asistencia para realizar los experimentos de reprotoxicidad. A la Maestra Estefania Arroyo Jilote por sus continuas asesorías en los protocolos de los experimentos. Al Biól. Hugo Rivas Martínez y a Rubi Evangelista Casimiro por su apoyo en actividades del laboratorio. A la Maestra Yaneli Trujillo Varela por sus consejos, su continuo apoyo y asesoría los cuales me permitieron adaptarme con mayor facilidad a la alta exigencia de esta casa de estudios y en particular a la del Posgrado en Ciencias Biológicas.

Al Dr. Javier Andrés Juárez Díaz por su guía y continuo apoyo para llevar a cabo con éxito los ensayos moleculares.

A los chicos del taller, siempre con historias interesantes para entretenernos y sonreír.

A mis padres Mireya y Angel Antonio por nunca dejar de creer en mis capacidades y que conseguiría llegar hasta aquí. Es imposible dejar solo en palabras todo el amor y agradecimiento que les tengo por los esfuerzos que han realizado por años para que alcanzara este objetivo. A mis hermanos Rafael Antonio, Edinson y Mauricio por padecer mis angustias, llorar mis tristezas, reír con mis chistes, gozar con mis triunfos, apoyarme cada día; siempre le agradeceré al Universo entero por tenerlos como hermanos y por la familia tan bella que poseo. A mi sobrina Dary por reír conmigo desde pequeña, mi cómplice de alegrías espontáneas. A Jaime por su incondicional apoyo y palabras de aliento para continuar este viaje. A Virginia, por ser esa mujer maravillosa que me ha llenado de fuerza para seguir adelante sin dejar nunca de creer en mí, mi compañera de vida, de viaje. Tu amor, cariño, comprensión, ánimo y respeto son todo lo que requiero para avanzar sin miedo y alcanzar lo que me propongo sorteando cada obstáculo que se ponga en el camino. Al pequeño Nicolás, hermoso ser que llegó para iluminarnos la vida a todos, cuando sonríes todo brilla; escucharte reír mientras me miras fijamente es la felicidad en todo su esplendor. Esto es por y para todos ustedes, mis bellos seres amados.

A mis amigas Aura, Laura B. y Laura M. por no dejar nunca de creer en mí, preocuparse por mis objetivos y darme ánimo cuando más lo he necesitado.

A los que me faltaron por mencionar y en su momento aportaron ese granito de arena que sumó a esta causa: ¡muchas gracias!

DEDICATORIA

A mi familia:

Mireya Mosquera Morales

Angel Antonio Tabares Guerrero

Rafael Antonio Tabares Mosquera

Edinson Tabares Mosquera

Mauricio Tabares Mosquera

Dariana Lissette Tabares Rey

Jaime Delgado Castro

Janely Virginia Tamayo Maas

Nicola Tabares Tamayo

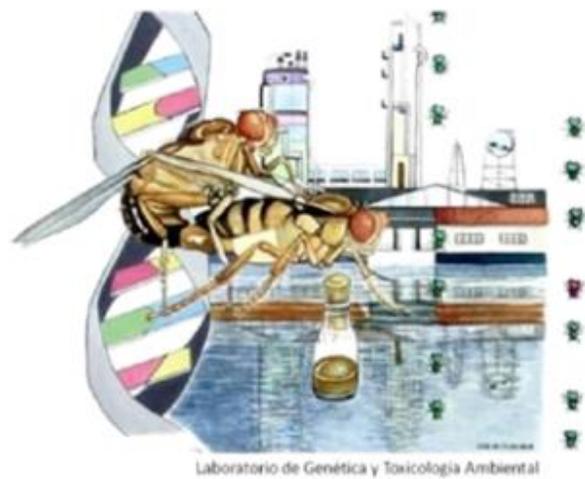
"(...) Existo como soy, con eso basta,
y si nadie lo sabe me doy por satisfecho,
lo mismo que si todos y uno a uno lo saben.

Hay un mundo al que tengo por el mayor de
todos, que soy yo y que lo sabe,
Si llego a mi destino, ya sea hoy o dentro
de millones de años,
Puedo aceptarlo ahora o seguir
aguardando, con igual alegría.

La base donde apoyo mis pies es de granito,
Me río cuando dicen que puede disolverse,
porque conozco lo que dura el tiempo (...)"

Walt Whitman

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental de la Facultad de Ciencias de la UNAM.



Con el apoyo del Banco de Moscas de la UNAM el cual otorgó el material biológico requerido.



Índice

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Alteraciones del desarrollo reproductivo.....	6
1.1.1 Efectos multi y transgeneracionales	7
1.1.2 Efectos generacionales mediados por mecanismos epigenéticos	8
1.2 <i>Drosophila</i> : un modelo para evaluar <i>in vivo</i> la toxicidad reproductiva.....	11
1.2.1 Discos imagales.....	13
1.2.1.1 Disco imagal genital.....	13
1.3 Citocromo P450 y aromataasa.....	16
1.3.1 Aromataasa y ecdisona 20-monooxigenasa: un punto de conexión entre mamíferos e insectos	17
1.4 Características de la <i>N</i> -nitrosodimetilamina (NDMA) y modo de acción.....	20
2. ANTECEDENTES	24
2.1 Planteamiento del problema	26
2.2 Justificación.....	29
3. HIPÓTESIS	29
4. OBJETIVOS.....	29
4.1 Objetivo general	29
4.2 Objetivos particulares.....	29
5. METODOLOGÍA	30
5.1 Tipos de experimentos: de reprotoxicidad y moleculares	30
5.2 Especies de <i>Drosophila</i>	30
5.2.1 <i>Drosophila melanogaster</i>	30
5.2.2 <i>Drosophila aldrichi</i>	30
5.3 Ensayo de reprotoxicidad	30
5.3.1 Obtención de larvas de tercer estadio.....	31
5.3.2 Administración del tratamiento	31
5.3.3 Sistemas de cruza	32
5.3.4 Biomarcadores.....	33
5.3.4.1 Toxicidad.....	33
5.3.4.1.1 Supervivencia.....	33
5.3.4.1.2 Proporción sexual.....	34

5.3.4.2	Reprotoxicidad	34
5.3.4.2.1	Fertilidad	34
5.3.4.2.2	Cantidad de progenie.....	34
5.3.5	Análisis estadísticos	35
5.3.6	Determinación del efecto de la NDMA en <i>Drosophila</i> por revisión morfológica externa e interna de las gónadas.....	35
5.4	Ensayo molecular	36
5.4.1	Análisis de la transcripción de <i>shade (shd)</i>	36
6.	RESULTADOS	39
6.1	Ensayo de reprotoxicidad	39
6.1.1	Toxicidad de la NDMA en <i>D. melanogaster</i> y <i>D. aldrichi</i>	39
6.1.1.1	Interrupción del ciclo de vida de las moscas en diferentes puntos por exposición a NDMA	42
6.1.2	Modificaciones en el tiempo de desarrollo de las moscas <i>D. melanogaster</i> y <i>D. aldrichi</i> ..	42
6.1.3	Malformaciones en la terminalia de <i>D. aldrichi</i>	46
6.1.3.1	Rotación de la genitalia en machos <i>D. aldrichi</i>	48
6.1.4	Capacidad reproductiva de las moscas progenitoras expuestas a NDMA.....	50
6.1.5	Capacidad reproductiva de los descendientes F ₁ y F ₂ no expuestos a NDMA.....	55
6.1.6	Revisión morfológica externa e interna de las gónadas de <i>Drosophila</i>	65
6.2	Ensayo molecular	66
6.2.1	Determinación del efecto de la NDMA en la expresión del gen <i>shade (shd, Cyp314a1)</i> en <i>D. melanogaster</i>	66
7.	DISCUSIÓN.....	68
7.1	Toxicidad de la NDMA.....	68
7.1.1	¿La variación del tiempo de desarrollo por exposición a NDMA estaría vinculada con la aparición de malformaciones en <i>D. aldrichi</i> ?.....	69
7.1.2	Posible especificidad de la NDMA sobre la terminalia.....	70
7.1.2.1	¿La activación metabólica de la NDMA puede interferir con la rotación de la terminalia en <i>D. aldrichi</i> ? Evidencia en machos.....	72
7.1.2.2	<i>Abdominal-B (Abd-B)</i> , <i>doublesex (dsx)</i> y <i>caudal (cad)</i> como posibles blancos de la NDMA	73
7.2	¿La NDMA modificó la capacidad reproductiva de los progenitores expuestos y la de su descendencia (F ₁ y F ₂) no tratada?	75
7.2.1	¿Interfirió la NDMA con la capacidad reproductiva de los organismos expuestos durante el último estadio larval?	76
7.2.1.1	¿La exposición directa de los organismos a NDMA no afectó diferencialmente las células germinales de hembras y machos?	77

7.2.1.2	¿El efecto adverso de la exposición a NDMA sobre la capacidad reproductiva pudo atenuarse en la generación progenitora?.....	79
7.2.2	Evidencia de modificaciones en la capacidad reproductiva de las generaciones F ₁ y F ₂ no expuestas a NDMA	81
7.2.3	¿Podría la exposición a NDMA inducir modificaciones epigenéticas en <i>Drosophila</i> ?.....	86
7.2.3.1	Metilación del DNA en <i>Drosophila</i> por exposición a la NDMA: ¿una posibilidad?.....	86
7.2.4	Efectos de la NDMA sobre la sobrevivencia y la reproducción: repercusiones a nivel poblacional	88
7.3	La exposición a NDMA y su efecto en la expresión de <i>shade (shd)</i>	91
8.	CONCLUSIONES.....	99
9.	REFERENCIAS	101

Lista de Figuras

Fig. 1.1 Efecto multigeneracional vs. Transgeneracional	7
Fig. 1.2 Hembra y macho de <i>D. melanogaster</i> y <i>D. aldrichi</i>	13
Fig. 1.3 Esquema general del desarrollo de los discos genitales femenino y masculino	15
Fig. 1.4 Contrapartes de la testosterona, el estradiol y la aromatasa en los insectos.....	19
Fig. 1.5 Perfil del ecdisteroide 20-hidroxiecdisona (20E) durante las etapas del desarrollo de <i>D. melanogaster</i>	20
Fig. 1.6 Estructura química de la NDMA.....	21
Fig. 1.7 Activación metabólica de compuestos <i>N</i> -nitrosos.	22
Fig. 1.8 Diseño general de la formación de aductos y metabolismo de la NDMA.	23
Fig. 5.1 Resumen de la metodología empleada en el ensayo de reprotoxicidad	33
Fig. 5.2 Resumen de la metodología empleada en la obtención de muestras para el ensayo molecular.	38
Fig. 6.1 Supervivencia promedio de las moscas Canton-S y <i>D. aldrichi</i> expuestas a NDMA.....	41
Fig. 6.2 Proporción sexual promedio de las moscas recobradas Canton-S y <i>D. aldrichi</i> expuestas a NDMA.....	41
Fig. 6.3 Interrupción del ciclo de vida de <i>Drosophila</i> en diferentes momentos por la exposición a NDMA. 42	
Fig. 6.4 Ojiva de frecuencias relativas que muestra el retraso en el desarrollo de <i>D. melanogaster</i> por la exposición a NDMA.....	45
Fig. 6.5 Ojiva de frecuencias relativas que muestra tanto la aceleración como el retraso en el desarrollo de <i>D. aldrichi</i> por la exposición a NDMA.....	46
Fig. 6.6 Malformaciones en la terminalia externa de las moscas <i>D. aldrichi</i> tratadas	47
Fig. 6.7 Proporción promedio de moscas <i>D. aldrichi</i> expuestas a NDMA con malformaciones en las placas genital y anal.	48
Fig. 6.8 Terminalia externa de un macho <i>D. aldrichi</i>	49
Fig. 6.9 Rotaciones de la terminalia externa encontradas en machos de <i>D. aldrichi</i> expuestos a NDMA .	49
Fig. 6.10 Índices de fertilidad de las moscas <i>D. aldrichi</i> progenitoras expuestas a NDMA de los tres sistemas de cruce	52
Fig. 6.11 Progenie promedio por familia de los parentales <i>D. aldrichi</i> expuestos a NDMA de los tres sistemas de cruce	54
Fig. 6.12 Comparación de los biomarcadores para capacidad reproductiva de los progenitores <i>D. aldrichi</i> expuestos a NDMA.	55
Fig. 6.13 Índices de fertilidad de la progenie F ₁ procedente de parentales <i>D. aldrichi</i> expuestos a NDMA de los tres sistemas de cruce.....	58
Fig. 6.14 Progenie promedio por familia de la descendencia F ₁ (F ₂) de parentales <i>D. aldrichi</i> expuestos a NDMA de los tres sistemas de cruce.....	59

Fig. 6.15 Comparación de los biomarcadores para capacidad reproductiva de la descendencia F ₁ de parentales <i>D. aldrichi</i> tratados con NDMA.....	60
Fig. 6.16 Índices de fertilidad de la progenie F ₂ proveniente de parentales <i>D. aldrichi</i> expuestos a NDMA de los tres sistemas de cruce.....	62
Fig. 6.17 Progenie promedio por familia de las moscas F ₂ (F ₃) derivadas de progenitores <i>D. aldrichi</i> expuestos a NDMA de los tres sistemas de cruce.....	64
Fig. 6.18 Comparación de los biomarcadores para capacidad reproductiva de las moscas F ₂ provenientes de progenitores <i>D. aldrichi</i> expuestos a NDMA.....	65
Fig. 6.19 Análisis por electroforesis en gel de agarosa del gDNA purificado a partir de larvas de <i>D. melanogaster</i> de 72 h de edad y amplificación por PCR usándolo como molde y a los oligonucleótidos diseñados para <i>shd</i> y <i>RpL23</i>	66
Fig. 6.20 Integridad del RNA total extraído de larvas y pupas de <i>D. melanogaster</i> , RT-PCR para las siete muestras con el gen de referencia <i>RpL23</i> y el experimental <i>shd</i>	67
Fig. 7.1 Combinaciones genéticas que no eliminan el segmento A7 en los machos también impiden la rotación completa de la terminalia tanto dextral como sinistral.....	75
Fig. 7.2 El retraso en el desarrollo observado en <i>Drosophila</i> cuando se aplica el tratamiento con NDMA, parece estar ligado a la cantidad de 20E que requiere el organismo en cada estadio para continuar su ciclo de vida.	95
Fig. 7.3 Modelo que explicaría la inhibición del desarrollo de <i>D. melanogaster</i> a 5 mM de NDMA.	97
Fig. 7.4 Modelo que explicaría el bloqueo en el desarrollo de <i>D. aldrichi</i> a 5 mM de NDMA.....	97
Fig. 7.5 Modelo que explicaría la interrupción en el desarrollo de <i>D. aldrichi</i> a 1.5 mM de NDMA.	98

Índice de Tablas

Tabla 1. Concentraciones de NDMA.	31
Tabla 2. Supervivencia y proporción sexual de las moscas <i>D. aldrichi</i> expuestas a NDMA.	40
Tabla 3. Frecuencias relativas y acumuladas de la cantidad de moscas <i>D. aldrichi</i> por conteo.	44
Tabla 4. Proporción promedio de moscas <i>D. aldrichi</i> con malformaciones.	47
Tabla 5. Capacidad reproductiva de los progenitores <i>D. aldrichi</i> expuestos a NDMA.	51
Tabla 6. Capacidad reproductiva de las moscas F ₁ no expuestas procedentes de parentales <i>D. aldrichi</i> tratados con NDMA.	56
Tabla 7. Capacidad reproductiva de las moscas F ₂ no expuestas provenientes de progenitores <i>D. aldrichi</i> tratados con NDMA.	61

RESUMEN

Los disruptores hormonales son sustancias que alteran la homeostasis de los organismos y, en consecuencia, ocasionan efectos adversos a su salud y probablemente a la de su progenie o (sub)poblaciones. Algunos funcionan como inhibidores de la aromatasa, por lo que se utilizan para frenar el desarrollo de algunos cánceres mamarios que requieren estrógeno para crecer. Otros, como la testolactona, se usan para tratar la infertilidad masculina, y el letrozol durante la adolescencia de niños con talla baja. Además, los seres humanos suelen estar expuestos a contaminantes ambientales con actividad disruptora a través de la inhalación, el contacto dérmico o la ingestión. También, puede que en algunos componentes de la dieta los humanos consuman sustancias o mezclas con potencial disruptor en cantidades desconocidas.

Independiente de la fuente de exposición a disruptores hormonales, los efectos a largo plazo que tienen sobre los organismos o su descendencia han sido poco explorados, o se desconocen debido, en gran parte, al seguimiento prolongado que se requiere. Considerando la alta similitud que existe entre mamíferos e insectos en los genes que codifican los citocromos P que metabolizan estas sustancias, añadido a un ciclo de vida corto y la alta progenie por generación que suelen caracterizar a los insectos, se propuso el uso de *Drosophila* como modelo experimental.

El objetivo general de este trabajo fue identificar biomarcadores en *Drosophila* que respondieran a la actividad del promutágeno alquilante, y disruptor endocrino de mamíferos, *N*-nitrosodimetilamina (NDMA). Para ello se evaluó *in vivo* el daño multigeneracional y transgeneracional, de una exposición única a la NDMA en *Drosophila*. Se utilizaron dos especies, *D. melanogaster* y *D. aldrichi*, 16 concentraciones de NDMA (4.77 E-06 a 5 mM) administradas a través de la alimentación y se realizaron tres sistemas de cruce en donde se trató con el disruptor a uno o ambos de los parentales *D. aldrichi* durante el tercer estadio larvario. La toxicidad de la NDMA en ambas especies se determinó mediante los biomarcadores de sobrevivencia y proporción sexual. Para evaluar si el disruptor modificó la capacidad reproductiva en *D. aldrichi*, se utilizaron los biomarcadores de fertilidad y cantidad de progenie. Además, se realizaron disecciones para determinar si la NDMA afectó la morfología de las gónadas tanto de los organismos tratados de ambas especies como de los descendientes F₁ y F₂ no expuestos de *D. aldrichi*, y se evaluó el efecto de la NDMA en la expresión de *shade* (*Cyp314a1*) en *D. melanogaster*.

Los resultados indican que la toxicidad de la NDMA fue letal para ambas especies en las concentraciones más altas probadas; además, el compuesto modificó el tiempo de desarrollo también en las dos especies, afectó la fertilidad y la cantidad de progenie tanto de las moscas progenitoras *D. aldrichi* expuestas como las de su descendencia F₁ y F₂ no tratada, siendo la NDMA más agresiva para las moscas *D. aldrichi* expuestas, en las que alteró la diferenciación de la terminalia (genitalia externa y analia), en las concentraciones subletales, evidenciada a través de malformaciones y rotaciones de la genitalia en los machos; lo anterior implica la aparición de efectos tanto multi como transgeneracionales por exposición a NDMA.

La ausencia de malformaciones evidentes en las gónadas, sumado a la infertilidad encontrada desde la generación parental con *D. aldrichi*, indica que el efecto adverso sobre la capacidad reproductiva puede encontrarse a nivel de las células germinales. Adicionalmente, los resultados sugieren que la NDMA también interfiere con la ruta de ecdisteroides de *D. melanogaster*, siendo la expresión del gen *shade* (*shd*), que codifica la enzima ecdisona 20-monooxigenasa, que cataliza la activación de la ecdisona (E) a 20-hidroxiecdisona (20E), inhibida o retrasada entre las 115 y 146 ± 4 h. Debido a la importancia de la 20E en el ciclo de vida de la mosca, lo anterior podría asociarse con la interrupción del ciclo de vida de los organismos en diferentes puntos por exposición a concentraciones letales de NDMA; ya que con el incremento en la concentración, la muerte de las moscas ocurrió en un punto más temprano de su ciclo. Asimismo, al ser *shd* un posible blanco de la NDMA, el cambio en la expresión de este gen podría ser un biomarcador útil en la identificación de sustancias con actividad de disrupción endocrina.

Finalmente, la evidencia recopilada con este trabajo, similar a la reportada en mamíferos por actividad de disruptores endocrinos, muestra que pueden identificarse biomarcadores en *Drosophila* que respondan a la actividad de dichos compuestos por lo que puede ser un sistema viable y complementario a mamíferos para la detección de químicos disruptores endocrinos de mamíferos o de sustancias con potencial reprotóxico.

Palabras clave: disruptor endocrino, *Drosophila*, *N*-nitrosodimetilamina, efectos multi y transgeneracionales, toxicidad reproductiva.

ABSTRACT

Hormonal disruptors are substances that alter organisms' homeostasis and, consequently, cause adverse effects to their health and probably to that of their progeny or (sub)populations. Some of these have function as aromatase inhibitors, so they are used to slow the development of some breast cancers that require them to grow. Others, such as testolactone, are used to treat male infertility, and letrozole during adolescence in children with short height. In addition, humans are often exposed to disruptive environmental pollutants through inhalation, dermal contact, or ingestion. Also, it is possible that in some components of the diet, humans ingest substances or mixtures with disruptive potential in unknown amounts.

Regardless of the source of exposure to hormone disruptors, their long-term effects on organisms or their offspring have been poorly explored, or these are unknown, largely due to the long-term follow-up required. Considering the high similarity that exists between mammals and insects in the genes that encode the cytochromes P, which metabolize these types of substances, plus a short life cycle and the high progeny per generation that usually characterize insects, the use of *Drosophila* as an experimental model is proposed.

The general objective of this research was to identify biomarkers in *Drosophila* that respond to the activity of the alkylating promutagen, and mammalian endocrine disruptor, *N*-nitrosodimethylamine (NDMA). For this, the *in vivo* multigenerational and transgenerational damage of a single exposure to NDMA in *Drosophila* was evaluated. Two species were used, *D. melanogaster* and *D. aldrichi*, 16 concentrations of NDMA (4.77 E-06 at 5 mM) administered through feeding, and three mating systems were performed where one or both parents *D. aldrichi* were treated with the disruptor during the third larval instar. In both species, NDMA toxicity was determined through survival and sex ratio biomarkers. To evaluate whether the disruptor modified the reproductive capacity of *D. aldrichi*, the biomarkers of fertility and number of offspring were used. In addition, dissections were performed to determine whether NDMA affected the morphology of the gonads on both the treated organisms of both species, and those from the unexposed F₁ and F₂ *D. aldrichi* offspring. In addition, the effect of NDMA on the *shade* (*Cyp314a1*) in *D. melanogaster* was evaluated.

The results indicate that the NDMA toxicity was lethal to both species at the highest concentrations tested. In addition, the compound modified the development time also in the two species, affected the fertility and the number of offspring on both of *D. aldrichi* parent flies exposed and those from their untreated F₁ and F₂ offspring. The stronger effect appears in the *D. aldrichi* flies, in which, sublethal concentrations altered the differentiation of the terminalia (external genitalia and analia), evidenced through malformations and rotations of the genitalia in males. All those changes involve the appearance of both multi- and transgenerational effects due to NDMA exposure.

The absence of obvious malformations on the gonads, added to the infertility found from the parental generation using *D. aldrichi*, indicates that the adverse effect on reproductive capacity can be found at the level of germ cells. In addition, the results suggest that NDMA also interferes with the *D. melanogaster* ecdysteroid pathway, being the *shade* (*shd*) gene expression, which encodes the enzyme ecdysone 20-monooxygenase, which catalyzes the activation of ecdysone (E) to 20-hydroxyecdysone (20E), inhibited or delayed between 115 and 146 ± 4 h. Due to the 20E relevance in the fly life cycle, this could be associated with the interruption of the organisms life cycle at different points due to exposure to NDMA lethal concentrations; since the increase in concentration took with it the death of the flies at an earlier point in their cycle. Likewise, since *shd* is a possible NDMA target, modification in this gene expression could be a useful biomarker in the identification of substances with endocrine disrupting activity.

Finally, the evidence compiled with this research, similar to that reported with mammals for endocrine disruptors activity, shows that biomarkers can be identified on *Drosophila* that respond to the activity of endocrine disruptors, so this experimental model can be a viable, reliable and complementary system to mammals for detecting mammalian endocrine disrupting chemicals or substances with reprotoxic potential.

Key words: endocrine disruptor, *Drosophila*, *N*-nitrosodimethylamine, multi- and transgenerational effects, reproductive toxicity.

1. INTRODUCCIÓN

Los disruptores hormonales son sustancias que alteran la homeostasis de los organismos y, en consecuencia, ocasionan efectos adversos a su salud y probablemente también a la de su progenie o (sub)poblaciones (Miyagawa *et al.*, 2016). Los disruptores endocrinos pueden modificar la biosíntesis, el transporte y el metabolismo de los esteroides sexuales como agonistas o antagonistas androgénicos o estrogénicos por interacción con sus respectivos receptores, y como resultado pueden alterar el equilibrio fisiológico hormonal e inducir fenómenos patológicos en el eje reproductivo tanto de hembras como de machos (Scaglia *et al.*, 2009).

Las alteraciones en la diferenciación y el desarrollo reproductivo, incluidas las producidas por la disrupción del sistema endocrino, pueden provocar infertilidad, modificaciones funcionales y morfológicas del sistema reproductivo y cáncer (Steinberger & Lloyd, 1985; Gray, 1991). La exposición prenatal y posnatal a sustancias tóxicas puede producir cambios que podrían no predecirse a partir de los efectos observados en adultos, los cuales suelen ser irreversibles. Los efectos adversos del desarrollo en ambos sexos pueden derivar de la exposición a agentes tóxicos en el útero, a través del contacto con madres expuestas o en la leche. La dosificación de las madres durante la lactancia también puede ocasionar efectos en el desarrollo a través de una capacidad deficiente para amamantar (EPA, 1996).

En mamíferos, los efectos pueden abarcar cambios en el comportamiento sexual o la capacidad de producir gametos regularmente que no se presentan hasta después de la pubertad. Los sistemas de enzimas hepáticas para el metabolismo de los esteroides requeridos durante el desarrollo pueden estar modificados en los machos. El descenso de los testículos desde la cavidad abdominal hacia el escroto puede retrasarse o no ocurrir. En general, el tipo de efecto detectado puede diferir según la etapa de desarrollo en la que se produjo la exposición (EPA, 1996).

Muchos de estos efectos se han detectado en mujeres y hombres expuestos prenatalmente a dietilestilbestrol (DES), otros estrógenos, progestinas, andrógenos y antiandrógenos (Giusti *et al.*, 1995; Harrison *et al.*, 1995). Se ha reportado tanto envejecimiento reproductivo acelerado como tumores del tracto reproductivo en mujeres y animales de laboratorio después de la exposición pre- o perinatal a disruptores hormonales. Sin embargo, la capacidad de alterar la diferenciación sexual no se limita a agentes con actividad hormonal directa conocida. Otros disruptores, para los cuales

se desconoce el modo de acción o que afectan indirectamente al sistema endocrino (por ejemplo, policlorobifenilos y dioxinas), pueden actuar a través de diferentes mecanismos durante períodos críticos del desarrollo para modificar la diferenciación sexual y el desarrollo del sistema reproductivo (EPA, 1996).

Algunos disruptores endocrinos se utilizan para frenar el desarrollo de cánceres mamarios que requieren estrógeno para crecer, como algunos inhibidores de la enzima aromatasa (Goss & Strasser, 2001; Smith & Dowsett, 2003; Brueggemeier *et al.*, 2005); también se han empleado inhibidores de esta enzima para tratar infertilidad masculina, como la testolactona (Raman & Schlegel, 2002); o disruptores como el letrozol como tratamiento durante la adolescencia en niños con talla baja (Hero *et al.*, 2006). Sin embargo, los posibles efectos a largo plazo que estos disruptores tendrán sobre los organismos o su descendencia han sido poco explorados, o se desconocen en gran medida, en parte debido al seguimiento prolongado que se requiere para estos estudios.

1.1 Alteraciones del desarrollo reproductivo

Los agentes tanto químicos como físicos pueden afectar los sistemas reproductivos femenino y masculino en cualquier momento del ciclo de vida, incluidos los períodos susceptibles del desarrollo. Además, la exposición a sustancias tóxicas en las primeras etapas del desarrollo puede producir alteraciones que afecten la función reproductiva o su correcto desempeño después de la exposición inicial; esto puede, inclusive, abarcar las generaciones subsiguientes (EPA, 1996).

La necesidad de distinguir la genotoxicidad en las células germinales frente a las células somáticas es de suma importancia. Dado que las líneas germinales masculinas y femeninas están especializadas para transferir material genético de una generación a la siguiente, cualquier especificidad de un mutágeno en la línea germinal (suponiendo que el tóxico llegue a la gónada en concentración suficiente) es motivo de preocupación, independientemente de si muestra potencial mutagénico en células somáticas (Ferreira & Allard, 2015).

Por otro lado, se considera que un estudio sobre los efectos reproductivos de solamente una generación es insuficiente para identificar todos los tóxicos reproductivos potenciales, porque excluiría la detección de los efectos causados por exposiciones prenatales y posnatales, así como los efectos sobre las células germinales que podrían transmitirse y expresarse en la próxima generación. Por ejemplo, se pasarían por alto los efectos transgeneracionales adversos sobre el

desarrollo del sistema reproductivo por agentes que alteran el control endocrino de la diferenciación sexual (EPA, 1996).

1.1.1 Efectos multi y transgeneracionales

Estudios previos muestran que la exposición a diferentes tipos de factores ambientales y nutricionales, como productos químicos, dieta rica en grasas, restricción calórica y estrés a edades tempranas, puede provocar efectos tóxicos al inicio de la edad adulta o estados patológicos por varias generaciones. Estos efectos se denominan multigeneracionales cuando existe una exposición directa de la generación al factor ambiental (Fig. 1.1); en cambio, si los efectos se transmiten en la línea germinal sin una implicación continuada de la exposición directa, son transgeneracionales (también denominada exposición ancestral; Fig. 1.1) (Viluksela & Pohjanvirta, 2019).

La exposición ambiental directa de los parentales, considerados la generación P, puede afectar la línea germinal (espermatozoides u ovocitos) de cualquiera de los progenitores. Por lo tanto, la próxima generación (F₁) derivada de esta línea germinal todavía se considera expuesta y, por ende, no es verdaderamente transgeneracional. Para las exposiciones de los parentales antes de la reproducción, la descendencia F₂ se considera la primera generación transgeneracional no expuesta (Fig. 1.1) (Nilsson, 2018).

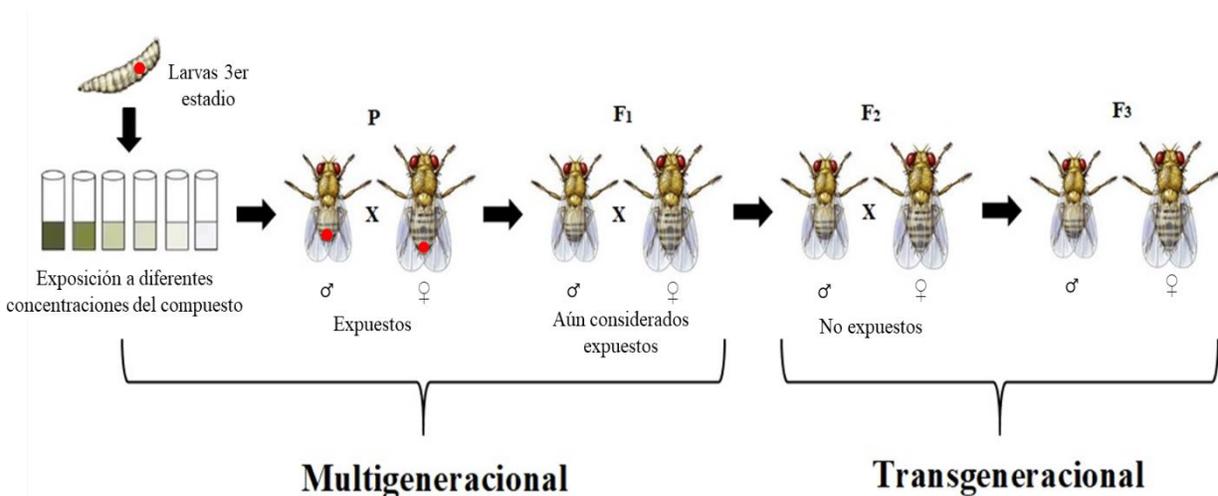


Fig. 1.1 Efecto multigeneracional (hasta la F₁) vs. Transgeneracional (a partir de la F₂). En el multigeneracional la larva es expuesta directamente al compuesto (por tanto, sus gónadas y células germinales indirectamente, puntos rojos), lo que también afecta a su progenie F₁. A partir de la F₂ los organismos ya no se consideran expuestos y los efectos son considerados transgeneracionales.

1.1.2 Efectos generacionales mediados por mecanismos epigenéticos

La epigenética se refiere a los factores y procesos moleculares alrededor del DNA que regulan la actividad del genoma independientemente de su secuencia, y que son mitóticamente estables (Skinner, 2011). Estos factores moleculares incluyen la metilación del DNA, las modificaciones de las histonas, los RNA no codificantes, la estructura de la cromatina y la metilación del RNA (Nilsson *et al.*, 2018).

Las modificaciones epigenéticas juegan un papel importante para que el desarrollo se lleve a cabo de manera regular y también permiten que los organismos se adapten a un entorno cambiante (Viluksela & Pohjanvirta, 2019).

Estudios previos documentan la capacidad de los compuestos ambientales, tratamientos terapéuticos y estrés fisiológico durante la embriogénesis, en la etapa postnatal temprana o ambas para promover la aparición del efecto adverso en la edad adulta durante varias generaciones (Skinner, 2008). Las exposiciones directas a factores ambientales incluyen nutrición, estrés, temperatura, productos farmacéuticos, químicos sintéticos y tóxicos ambientales (Skinner, 2014). Los tipos de compuestos ambientales involucrados en las exposiciones van desde plásticos hasta pesticidas agrícolas y a menudo son disruptores endocrinos (Skinner, 2008).

Además de los efectos directos de la exposición en un individuo, las alteraciones moleculares de la línea germinal pueden promover efectos en generaciones subsecuentes, es decir, efectos transgeneracionales (Skinner, 2015; Brehm & Flaws, 2019). Como la mayoría de los disruptores endocrinos no tienen la capacidad de alterar la secuencia del DNA o promover mutaciones genéticas, estos efectos generacionales están mediados por mecanismos epigenéticos. Cuando los efectos de un disruptor endocrino alteran la programación epigenética de la línea germinal, estos cambios se transmiten entre generaciones en ausencia de exposición directa, un efecto denominado herencia epigenética transgeneracional (Skinner, 2014, 2015). Por tanto, la epigenética proporciona un mecanismo molecular mediante el cual el ambiente altera directamente la biología de un organismo (Skinner, 2014). Los estudios experimentales han demostrado que las modificaciones epigenéticas de los gametos inducidas por el medio ambiente pueden provocar alteraciones en la fertilidad, el desarrollo embrionario y la salud de las próximas generaciones (Viluksela & Pohjanvirta, 2019).

Así, hay una variedad de factores epigenéticos que actúan alrededor del DNA en una célula para regular la expresión génica y la actividad del genoma (Nilsson *et al.*, 2018). Durante la metilación del DNA, las DNA metiltransferasas catalizan la adición de un grupo metilo a la citosina cuando está adyacente a un residuo de guanina para producir 5-metilcitosina (5mC) (Nilsson *et al.*, 2018; Brehm & Flaws, 2019). La presencia de 5mC a menudo reprime la transcripción (Nilsson *et al.*, 2018).

La modificación de las histonas implica alterar la estructura de la cromatina al cambiar la interacción del DNA con otras histonas, por lo tanto, se aumenta o disminuye la posibilidad de transcripción (Brehm & Flaws, 2019). La acetilación de las histonas puede incrementar la transcripción, mientras que la metilación puede reprimirla (Nilsson *et al.*, 2018).

Los RNA no codificantes pueden actuar como factores epigenéticos. Estas son moléculas de RNA no codificantes, pequeñas o largas, que están involucradas en la función de la cromatina y modulan la expresión génica a través del silenciamiento y activación de genes influenciando los mecanismos de metilación del DNA y las modificaciones de las histonas (Nilsson *et al.*, 2018; Brehm & Flaws, 2019).

Las propias moléculas de RNA pueden modificarse epigenéticamente y, por tanto, se afecta la traducción y la expresión génica. La alteración reversible más predominante de la secuencia interna del mRNA es la metilación de la adenosina para formar *N*(6)-metiladenosina (m(6)A). La metilación m(6)A del mRNA está asociada con la regulación postranscripcional. También ocurre la metilación de la citosina (m3C) tanto en el mRNA como en el tRNA (Nilsson *et al.*, 2018).

El enrollamiento, las asas (bucles) y la estructura general del DNA se denominan estructura de la cromatina y también es un factor epigenético. La estructura tridimensional del DNA puede hacer que ciertas regiones del genoma sean accesibles a la maquinaria de transcripción, así como acercar regiones potenciadoras a los promotores de los genes para afectar la expresión génica (Nilsson *et al.*, 2018).

Por otro lado, al considerar el desarrollo de la célula germinal (espermatozoide y ovocito), existen varias etapas críticas de desarrollo en las que ocurre una programación epigenética importante. La primera es cuando las células madre (precursoras) de las germinales, llamadas células germinales primordiales, se desarrollan durante el desarrollo embrionario, antes y durante

el tiempo de formación de los testículos y los ovarios. La metilación del DNA de estas células se elimina y luego se produce la remetilación durante la maduración de dichas estructuras. El segundo es cuando el espermatozoide y el ovocito se fusionan en la fecundación y el DNA aportado por cada gameto nuevamente se desmetila para crear las células madre embrionarias. Esta programación epigenética permite que una célula desarrolle pluripotencia (Skinner, 2014).

Cuando la exposición a sustancias tóxicas ocurre durante el desarrollo embrionario de los testículos o de los ovarios, la programación epigenética o la metilación del DNA de la célula germinal puede reprogramarse y transmitir la información epigenética alterada a la siguiente generación. Si se modifican los eventos regulares de programación epigenética de los espermatozoides y los ovocitos, estas células germinales tienen la capacidad de transmitir esta información epigenética transgeneracionalmente. Cuando esto ocurre, entonces se observan marcas epigenéticas (epimutaciones) alteradas (Skinner, 2014).

Ahora bien, la herencia epigenética transgeneracional ha sido identificada en *Drosophila*. Conrad Waddington, quien acuñó el término "epigenética", demostró que un cambio en la estructura del ala inducido por un choque térmico en *D. melanogaster* persistió durante más de siete generaciones (Nilsson *et al.*, 2018). En ejemplos más recientes, se ha encontrado que una dieta rica en sacarosa en la hembra puede alterar la composición corporal de las larvas durante las próximas dos generaciones (Buescher *et al.*, 2013). De manera similar, una dieta alta en grasas en larvas *D. melanogaster* puede causar alteraciones transgeneracionales en el tamaño de la pupa y el huevo de la generación F₂ (Dew-Budd *et al.*, 2016). Igualmente, las modificaciones de las histonas se han correlacionado con la herencia epigenética transgeneracional de fenotipos alterados en *Drosophila* (Ruden & Lu, 2008). Las manipulaciones de los niveles de proteínas en la dieta de las moscas pueden afectar la longevidad y la reproducción durante tres generaciones subsecuentes, y este efecto se asocia con las modificaciones de las histonas (Xia & de Belle, 2016; Xia *et al.*, 2016).

Del mismo modo, la condensación y descondensación de la cromatina está controlada o acompañada en gran medida por modificaciones postraduccionales de las histonas nucleosómicas y, en ocasiones, por la metilación del DNA. Las modificaciones de histonas son características esenciales de la cromatina de *Drosophila*; estas incluyen metilación, acetilación y fosforilación, preferencialmente en las regiones N-terminales de las histonas H3 y H4, pero también en las histonas H2A y H2B. El estado funcional de la cromatina también depende de la sustitución de las

histonas por variantes específicas como la histona H3.3 o la variante H3 específica del centrómero CENP-A (Hennig & Weyrich, 2013).

Por una parte, la línea germinal masculina de *Drosophila* muestra un patrón característico de modificaciones de las histonas. Se ha reportado una metilación preferencial de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9) en la cromatina del cromosoma Y, mientras que la metilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27) es más prominente en la cromatina del X y autosómica. Además, ciertas modificaciones de histonas son específicas de los núcleos espermáticos (Hennig & Weyrich, 2013). Por su parte, en las hembras de *Drosophila*, la trimetilación de H3K9 (H3K9me3) ocurre tanto en las células germinales como somáticas del ovario y es necesaria para la ovogénesis (Clough *et al.*, 2007, 2014).

Las trimetilaciones de H3K9 y de H3K27 (H3K27me3) son las modificaciones de las histonas más conocidas asociadas con la represión génica. Estas marcas son establecidas y reconocidas por distintos complejos y generalmente se localizan en diferentes regiones del genoma, lo que sugiere que se asocian con distintos tipos de cromatina (Ninova *et al.*, 2019). En *D. melanogaster*, la administración de una dieta baja en proteína conlleva a un incremento en el nivel de trimetilación de H3K27, lo que repercute en la disminución de la longevidad de las moscas parentales, así como la de su progenie F₂ (Xia *et al.*, 2016).

1.2 *Drosophila*: un modelo para evaluar *in vivo* la toxicidad reproductiva

Los insectos son los animales más abundantes del planeta y representan las tres cuartas partes de todas las especies animales. La mayoría de los insectos se desarrollan rápidamente, tienen altas tasas de reproducción y ciclos de vida cortos. Múltiples estrategias y comportamientos de supervivencia aseguran su sobrevivencia (Zhang *et al.*, 2021). *D. melanogaster* es el insecto terrestre más ampliamente distribuido y abundante como modelo animal experimental. Desempeña un papel importante en los campos de la biología reproductiva, la biología del desarrollo, la genética, la bioquímica y la biología molecular, por mencionar algunas (Chifiriuc *et al.*, 2016). Se cuenta con el genoma de *D. melanogaster* completamente secuenciado y comparte homología con el 75% de los genes asociados con enfermedades en humanos (Nichols *et al.*, 2012). Además, *D. melanogaster* y humanos conservan vías comunes, tanto metabólicas como de señalización (Xia *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta las ventajas anteriores, durante muchos años *Drosophila* se ha utilizado como organismo modelo para la investigación toxicológica (Zhang *et al.*, 2018).

Asimismo, los estudios toxicológicos en *Drosophila* proporcionan una base de referencia para analizar exhaustivamente los efectos tóxicos y los mecanismos de los contaminantes en otros organismos incluyendo a los seres humanos (Zhang *et al.*, 2021).

D. melanogaster es un insecto holometábolo, por lo que pasa por metamorfosis completa, lo que significa que su forma adulta es diferente a la configuración embrionaria o larvaria (Olivera, 2017). A su temperatura óptima de crecimiento, 25 °C, *D. melanogaster* completa las cuatro fases diferentes de su ciclo de vida en diez días. Las primeras 24 h abarcan el desarrollo embrionario; a esto le siguen tres estadios larvales a lo largo de los siguientes 3-4 días y, por último, se produce el estadio de pupa que dura 5 días (Olivera, 2017; Prieto, 2018). Es en este último estadio durante el cual se produce la metamorfosis y el reemplazamiento de los tejidos larvarios por estructuras del adulto (Prieto, 2018). Luego de esos nueve a diez días, los adultos emergen de las pupas, alcanzan la madurez sexual dentro de las próximas 10-12 h y, entre uno o dos días después, las hembras ponen huevos fecundados para reiniciar el ciclo (Olivera, 2017).

Como ya se mencionó, la exposición a disruptores endocrinos podría tener efectos secundarios que le dificulten al organismo dejar descendencia o que su progenie se vea alterada, aun sin haber sido expuesta directamente. El estudio de los efectos que los disruptores hormonales tienen sobre los individuos tratados, su progenie y las generaciones subsiguientes serían más fácilmente realizados con un organismo modelo de ciclo de vida corto, fácil manejo y bajo costo de manutención como lo es *Drosophila*; cabe resaltar que en este género también se puede contar con organismos que permiten observar por inspección visual directa si hay daño en sus órganos reproductivos, en particular en las gónadas masculinas o testículos, gracias a que éstos pueden presentar pigmentos característicos, como sucede con los machos de la especie *D. aldrichi* (Fig. 1.2). La ventaja entonces al utilizar a organismos de esta especie es que se puede dar seguimiento *in vivo* de individuos con dos, una o ninguna gónada y estudiar el impacto en su descendencia. Una vez garantizada la progenie, se puede proceder a la disección de los parentales para confirmar el diagnóstico acerca del estado de las gónadas, de manera que se valide la información preliminar obtenida por inspección visual.

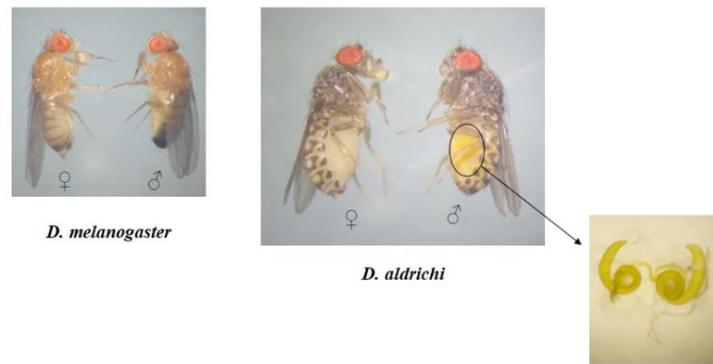


Fig. 1.2 Hembra y macho de *D. melanogaster* (izquierda) y *D. aldrichi* (derecha). El macho de *D. aldrichi* tiene los testículos pigmentados (color amarillo).

1.2.1 Discos imaginales

Los discos imaginales son estructuras epiteliales características de los insectos que experimentan una metamorfosis completa (holometábolos). Estos epitelios se originan durante el desarrollo embrionario a partir de grupos de células ectodérmicas y crecen por proliferación celular durante los estadios larvales para formar el disco maduro (Bryant, 1990; De Celis & García-Bellido, 2013; Beira & Paro, 2016). En los embriones de *D. melanogaster*, cada primordio de disco imagal contiene de 10 a 40 células, que se dividen durante los tres estadios larvares para formar hasta 50,000 células al final del tercer estadio (Bayer *et al.*, 1996; Blair, 2009).

Los discos imaginales comienzan a diferenciarse al final del tercer estadio (Cranna & Quinn, 2009). Una vez que la larva forma el puparium, casi todos los tejidos larvares degeneran y los discos imaginales se diferencian en la mayoría de las estructuras del insecto adulto, como la cabeza, las patas, las alas y la genitalia (De Celis & García-Bellido, 2013; Beira & Paro, 2016). El resto de las estructuras externas del adulto (abdomen) se originan a partir de nidos de histoblastos que también están formados en la larva (Aldaz & Escudero, 2010).

1.2.1.1 Disco imagal genital

El disco imagal genital forma la terminalia (genitalia, a excepción de las gónadas, y la analia, estructuras anales e intestino grueso) de la mosca adulta (Gorfinkiel *et al.*, 1999), que son las estructuras con mayor dimorfismo sexual de la mosca. Tanto las hembras como los machos de *Drosophila* tienen un solo disco genital formado por la fusión de primordios provenientes de tres segmentos abdominales embrionarios: A8, A9 y A10 (Sánchez & Guerrero, 2001; Estrada *et al.*, 2003).

El primordio genital femenino se deriva del segmento A8 y se encuentra en la parte anterior, el primordio anal (A10) se ubica en la parte posterior y el primordio genital masculino que procede del A9 se encuentra entre ellos. En ambos sexos, solo dos de estos tres primordios se desarrollan para formar la terminalia del adulto. El primordio anal se desarrolla en ambos sexos, pero dependiendo del sexo, formará analia masculina o femenina (Fig. 1.3). Además, solamente se desarrolla uno de los primordios genitales en cada sexo, formando la genitalia masculina o femenina; esto también depende del sexo de la mosca (Sánchez & Guerrero, 2001).

Las diferencias sexuales somáticas en la genitalia de *Drosophila* están determinadas por una cascada genética que depende inicialmente de la proporción de cromosomas X a autosomas (A): si la proporción es 1 (2X: 2A), la mosca es una hembra y si es 0.5 (1X: 2A), un macho. Esta señal activa en las hembras el gen clave *Sex lethal* (*Sxl*), en la parte superior de la jerarquía de determinación del sexo; en los machos, por el contrario, la actividad de *Sxl* está reprimida (Estrada *et al.*, 2003).

En la hembra, *Sxl* dirige la formación de la forma específica del gen *transformer* (*tra*). Este gen, forma un dímero con el gen *transformer-2* (*tra-2*) el cual hace que el gen *doublesex* (*dsx*) se corte y empalme en la forma femenina específica, traducida en la proteína Dsx^F. En los machos, la proteína *Sxl* no activa la síntesis de *tra* y no se forma el dímero con *tra2*, por lo que *dsx*, en consecuencia, sigue el corte y empalme específico del macho, formando así la proteína Dsx^M (Estrada *et al.*, 2003).

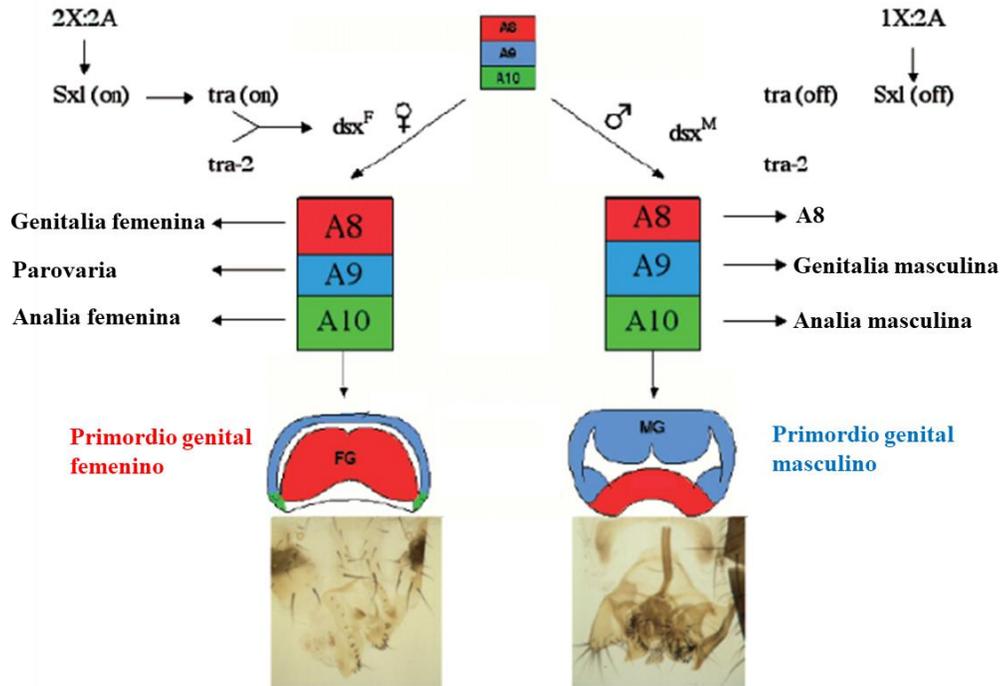


Fig. 1.3 Esquema general del desarrollo de los discos genitales femenino (izquierda) y masculino (derecha). En las partes superiores izquierda y derecha se muestra una versión simplificada de la vía de determinación del sexo somático para los genitales: el resultado final es la producción de proteínas Dsx^F y Dsx^M en hembras y machos, respectivamente. La diferenciación genital femenina requiere, además de Dsx^F , la actividad de las proteínas Intersex y Hermafrodita (no incluidas en el esquema) (modificado de Estrada *et al.*, 2003).

Los productos Dsx^F y Dsx^M comparten el dominio N-terminal, incluido un dominio de dedos de zinc de unión al DNA (el dominio DM), y difieren en la región C-terminal. En ausencia de las proteínas Dsx^F y Dsx^M , las moscas (1X:2A o 2X:2A) se desarrollan como intersexuales, con estructuras genitales masculinas y femeninas (Sánchez & Guerrero, 2001; Estrada *et al.*, 2003).

Los genes homeóticos (Hox) especifican estructuras a lo largo del eje anteroposterior en la mayoría de los metazoos. Codifican proteínas que contienen un dominio de unión al DNA, el homeodominio, y definen posiciones en este eje controlando la expresión específica de la región de los genes aguas abajo. Los segmentos que contribuyen al disco genital contienen información homeótica específica proporcionada por los genes Hox *abdominal-A* (*abd-A*) y *Abdominal-B* (*Abd-B*), así como por el gen *caudal* (*cad*) que contiene homeobox. Este último, que es similar en muchos aspectos a los genes Hox, especifica la analia y el intestino grueso. De manera consistente, *cad* se expresa específicamente en el primordio anal (A10); *abd-A* se transcribe en una región de A8 que corresponde, en las hembras, principalmente a los genitales internos. Por consiguiente, *abd-A* no

es necesario para la formación de genitales femeninos externos, genitales masculinos o analia (Estrada *et al.*, 2003).

El gen Hox que define el desarrollo de la genitalia es *Abd-B*. Hay varios transcritos de *Abd-B*, todos compartiendo el homeobox y las secuencias adyacentes, con patrones de expresión y codificación particulares para dos proteínas diferentes. En la genitalia, la transcripción *m* (o A) se expresa en A8, tanto en machos como en hembras, mientras que los transcritos *r* (B y C) se expresan en A9, también en ambos sexos. El transcrito *m* codifica para la proteína M (o I) y los transcritos *r* para la proteína R (o II). Ambos productos son idénticos en su parte C-terminal (incluido el homeodominio) pero difieren en la región N-terminal. La ausencia de ambas proteínas M y R transforma parte de la genitalia en pata o antena distal. Por el contrario, la mutación *Abd-B^{tuH-3}*, que expresa *Abd-B* ectópicamente, convierte parte de la cabeza en genitalia (masculina o femenina) y abdomen posterior. Por lo tanto, *Abd-B* es necesario y suficiente para hacer la genitalia (Estrada *et al.*, 2003).

Al igual que en otros discos imagales, las vías de señalización *decapentaplegic* (*dpp*), *hedgehog* (*hh*) and *wingless* (*wg*) confieren información posicional a las células del disco genital. Los genes Hox determinan la diferencia entre la terminalia y los segmentos más anteriores. La vía de determinación del sexo tiene un papel importante en la formación de la genitalia y la analia. Mientras el disco genital crece, estas tres entradas controlan la transcripción de genes que especifican derivados masculinos y femeninos (Estrada *et al.*, 2003).

1.3 Citocromo P450 y aromatasa

La aromatasa, codificada por el gen *Cyp19*, forma parte del citocromo P450 (CYP) (Smith & Dowsett, 2003). Los CYP forman parte de una superfamilia de enzimas con función desintoxicante que participan en el metabolismo de diversos metabolitos celulares endógenos y compuestos xenobióticos. La importancia de los CYP radica en el hecho de que existen en todos los grupos taxonómicos, incluyendo bacterias (Keller, 2006). En casi todos los organismos, estas enzimas están presentes en más de una forma, formando así una de las familias más grandes de enzimas. Sin embargo, el número de familias y enzimas varía entre los diferentes organismos (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000).

Los CYP desempeñan un papel en diversos procesos tales como el metabolismo de los ácidos grasos y las sales biliares; son fundamentales en la formación de esteroides, colesterol y metabolitos del ácido araquidónico (Keller, 2006). La enzima fue nombrada por primera vez en 1961 como P450 porque su pigmento (P) presenta un pico espectral a los 450 nm cuando se reduce y se une al monóxido de carbono. En un principio se consideró que el citocromo P450 era solo una enzima. Sin embargo, ahora se sabe que es una familia de enzimas (Keller, 2006). Diferentes estudios en las últimas décadas han demostrado que los organismos generalmente tienen múltiples CYP. Los humanos tienen 55 genes *CYP* (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000; Keller, 2006), *Drosophila* 90 (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000; Tijet *et al.*, 2001; Keller, 2006) y el arroz 453 (Keller, 2006).

Se sugiere que la superfamilia se originó a partir de un gen ancestral común hace aproximadamente 3 mil millones de años. Las proteínas del citocromo P450 se agrupan en familias y subfamilias en función de las similitudes en sus estructuras primarias. Los que comparten más del 40% de identidad a nivel de aminoácidos se asignan a una familia especificada por un número arábigo, mientras que los que comparten más del 55% de identidad tienen asignada una subfamilia especificada por una letra (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000; Keller, 2006).

En el ser humano, la CYP19 corresponde a la aromatasa, enzima responsable del paso final en la síntesis de estrógenos, es decir, la conversión de andrógenos androstenediona y testosterona (C19 esteroides) a los estrógenos estrona (E1) y estradiol (E2) (C18 esteroides), respectivamente (Goss & Strasser, 2001; Brueggemeier *et al.*, 2005).

1.3.1 Aromatasa y ecdisona 20-monooxigenasa: un punto de conexión entre mamíferos e insectos

De Loof (2006) propone que los ecdisteroides son los mejores candidatos para funcionar como esteroides sexuales en insectos, y específicamente la ecdisona, que al estar presente en altas concentraciones podría funcionar como un esteroide sexual androgénico (De Loof & Huybrechts, 1998; De Loof, 2006). Las hormonas esteroides controlan estrictamente el momento de la maduración sexual y el tamaño corporal final tanto en vertebrados como en invertebrados (Koyama & Mirth, 2021).

En insectos, las P450 están involucradas en las rutas biosintéticas de la hormona juvenil y la ecdisona. Estas son las dos hormonas más importantes que se requieren para el crecimiento, desarrollo y reproducción en insectos (Riddiford *et al.*, 2003; Gilbert, 2008; Iga & Kataoka, 2012). En *Drosophila*, se ha identificado a un grupo de genes denominados *Halloween* cuyos productos participan en la biosíntesis de ecdisteroides, o sea, en la sucesión de reacciones que transforman el colesterol en la 20-hidroxiectdisona, la forma biológicamente activa de la ecdisona, y cuya mutación resulta en letalidad embrionaria (Gilbert, 2008; Lafont *et al.*, 2017). Los genes que pertenecen a la familia *Halloween* son: *spook* (*spo*, *Cyp307a1*) (Nakimi *et al.*, 2005; Ono *et al.*, 2006), *spookier* (*spok*, *Cyp307a2*) (Ono *et al.*, 2006), *phantom* (*phm*, *Cyp306a1*) (Warren *et al.*, 2004), *disembodied* (*dib*, *Cyp302a1*) (Chávez *et al.*, 2000), *shadow* (*sad*, *Cyp315a1*) (Warren *et al.*, 2002) y *shade* (*shd*, *Cyp314a1*) (Petryk *et al.*, 2003).

Aún no se han identificado los sustratos de CYP307A1 ni de CYP307A2, pero se ha reportado que forman parte de la llamada “caja negra” en la ruta biosintética anteriormente mencionada (Ono *et al.*, 2006). En lo que respecta al gen *phm*, éste codifica la 25-hidroxilasa microsomal, CYP306A1, que está involucrada en la conversión de 2,22,25-tridesoxiectdisona (ketodiol) a 2,22-didesoxiectdisona (ketotriol) (Warren *et al.*, 2004). A partir de ketotriol, otros dos de los genes *Halloween*, *dib* y *sad*, participan en la síntesis de ecdisona, un esteroide polihidroxilado, que es el precursor de la hormona de muda principal, la 20-hidroxiectdisona (20E) (Warren *et al.*, 2002; Gilbert, 2004; Nakagawa & Sonobe, 2016). A través de la expresión transitoria en células S2 con un plásmido con el cDNA de *dib* o de *sad* se reveló que CYP302A1 es una C22 hidroxilasa ecdisteroide que participa en el paso de ketotriol a 2-desoxiectdisona, mientras que el CYP315A1 es una C2 hidroxilasa involucrada en la conversión de esta última en ecdisona (Warren *et al.*, 2002; Gilbert, 2004). Finalmente, la ecdisona 20-monooxigenasa (E20MO; ecdisona 20-hidroxilasa; CYP314A1; EC 1.14.99.22) codificada por el gen *shd*, es necesaria en el paso de ecdisona a 20-hidroxiectdisona (Petryk *et al.*, 2003; Gilbert, 2004; Nakagawa & Sonobe, 2016).

De esta manera la enzima CYP314A1 (ecdisona 20-hidroxilasa) en insectos cataliza la conversión de ecdisona (E) —candidato más probable para actuar como contraparte de la testosterona en vertebrados (De Loof, 2006), de hecho sus estructuras son muy similares (Fig. 1.4)— en 20E, la contraparte de estrógenos en vertebrados; por tanto, podría decirse que la CYP314A1 ecdisona 20-hidroxilasa de los insectos sería la contraparte del CYP19 aromatasas de

mamíferos, es más, sus estructuras también son similares. Con base en esto, podría suponerse que, si el sustrato y la enzima son estructuralmente similares, un compuesto que inhiba la aromatasa en humanos podría también actuar sobre el CYP314A1 de insectos.

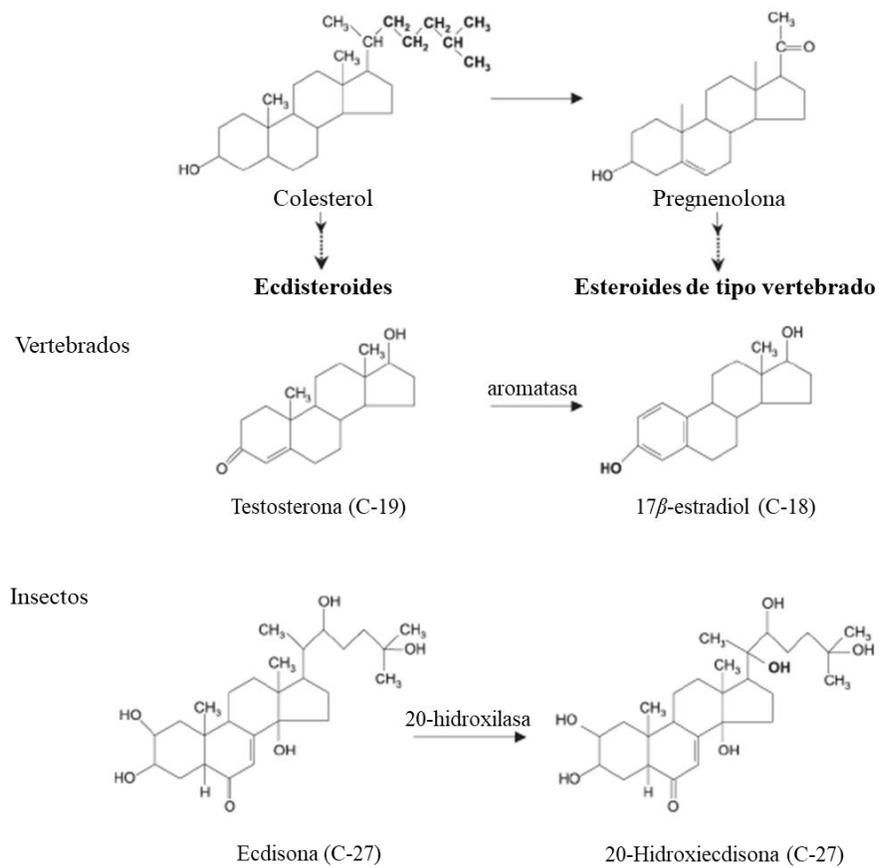


Fig. 1.4 El colesterol es el precursor de las hormonas esteroides. En los ecdisteroides, la cadena lateral del colesterol se mantiene mientras que se pierde en los denominados "esteroides de tipo vertebrado". La aromatasa cataliza el último paso en la biosíntesis del estradiol-17β. La 20-hidroxilasa (*shade*) cataliza la conversión de ecdisona (E) en 20-hidroiecdisona (20E). C-18, C-19, C-27: número de átomos de carbono. Adaptado de De Loof (2006).

Para comprobar lo dicho anteriormente, es necesario conocer en qué etapa del desarrollo de *Drosophila* hay incremento de CYP314A1. En los insectos, la hormona esteroide ecdisona, en su forma biológicamente activa, 20-hidroiecdisona (20E), controla el tiempo de las mudas entre los estadios larvarios, así como la transición a la metamorfosis e inclusive el instante de las mudas metamórficas. El crecimiento durante el último estadio representa más del 80% del aumento de la masa final en los insectos, y la duración de este período de crecimiento es dirigida por una secuencia de pequeños pulsos de ecdisona que inducen la metamorfosis. Así pues, las pequeñas fluctuaciones en las concentraciones de 20E desencadenan eventos clave del desarrollo (Koyama & Mirth, 2021).

La figura 1.5 muestra que al acercarse el día cinco (120 h, considerando a *D. melanogaster*), justo antes de que la larva de tercer estadio entre en la etapa de prepupa, hay incremento de la 20E, por tanto, es un punto donde CYP314A1 debería estar más activa catalizando la conversión de ecdisona (E) en 20-hidroxiecdisona (20E). Por consiguiente, al exponer a *Drosophila* a un disruptor endocrino en ese momento de su ciclo, podría disminuir la producción de 20E, lo que indicaría el bloqueo en la biosíntesis de ese ecdisteroide.

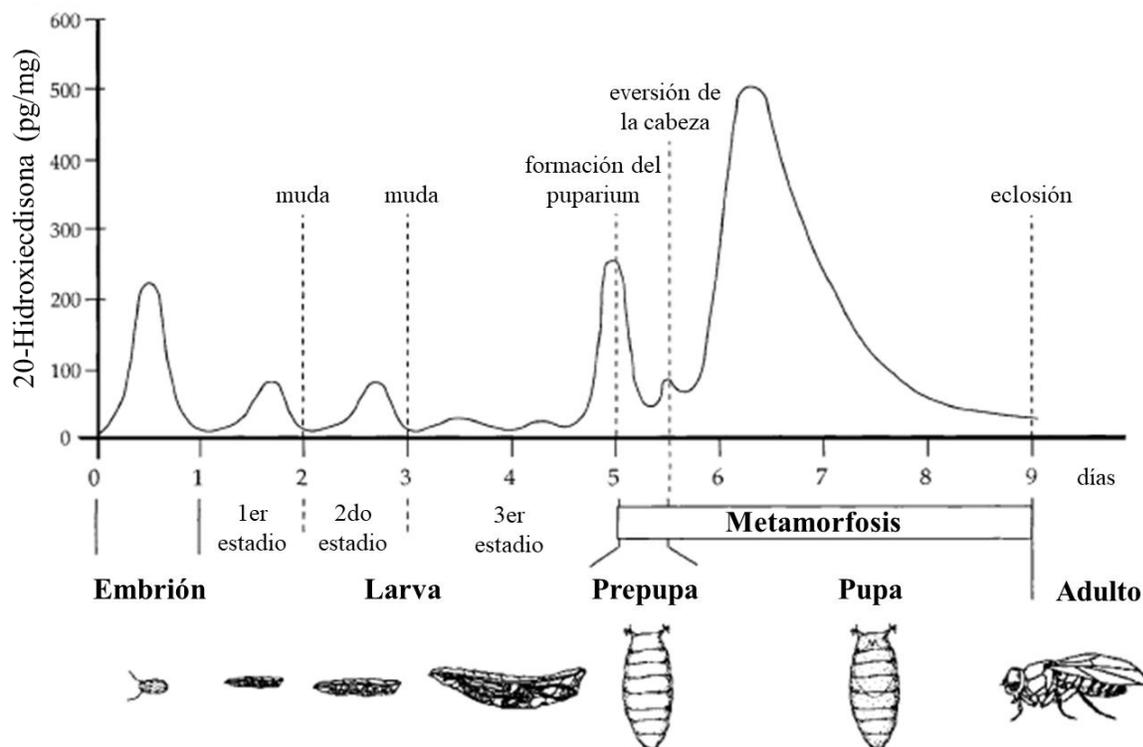


Fig. 1.5 Perfil del ecdisteroide 20-hidroxiecdisona (20E) durante las etapas del desarrollo de *D. melanogaster*. Modificado de Thummel (2001).

1.4 Características de la *N*-nitrosodimetilamina (NDMA) y modo de acción

A temperatura ambiente, la NDMA es un líquido amarillo con un ligero olor característico. Es muy soluble en agua, alcohol y éter, miscible con cloruro de metileno y aceites vegetales, soluble en lípidos, cloroformo y la mayoría de los demás solventes orgánicos. Es estable en la oscuridad en solución neutra o alcalina durante al menos 14 días, pero es menos estable en soluciones más ácidas o expuesta a la luz, especialmente luz ultravioleta (NTP, 2021).

Actualmente, la NDMA (Fig. 1.6) se fabrica en pequeñas cantidades para uso exclusivo en investigación (NTP, 2021; ATDSR, 2022). La NDMA se usó hasta 1976 en la fabricación de

combustible para cohetes, pero este uso se detuvo después de que se encontraron altos niveles en el ambiente alrededor de una planta productora (ATSDR, 2022).

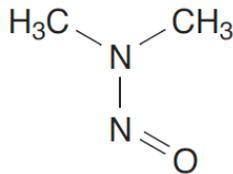


Fig. 1.6 Estructura química de la NDMA.

La NDMA se forma como residuo en varios procesos de fabricación, pero también se produce por reacciones de nitrosación que ocurren entre sustancias denominadas alquilaminas y bacterias nitrificantes (EPA, 2017). Las rutas de posible exposición humana a la NDMA son la ingestión, la inhalación y el contacto dérmico (NTP, 2021). La población general puede estar expuesta a cantidades desconocidas de este compuesto presentes en alimentos y bebidas, humo de tabaco, herbicidas, pesticidas, agua potable y contaminación industrial (ATSDR, 1989). La NDMA puede moverse a través del suelo e ingresar al agua subterránea (ATSDR, 2022). Se ha encontrado este compuesto en altas concentraciones en pozos de agua para consumo humano (hasta 20,000 ng/L) (Mitch *et al.*, 2003). Además, la NDMA puede formarse en el cuerpo humano a partir de aminas que reaccionan con los nitritos como resultado de la incorporación de estos precursores por separado en los alimentos, el agua o el aire (NTP, 2021).

El ingreso de NDMA al organismo por exposición a través del aire, la dieta y el humo de tabaco se ha estimado en unos pocos microgramos por día. La NDMA está presente en una variedad de alimentos incluidos el queso, el aceite de soya, varios productos cárnicos, tocino, diversas carnes curadas, salchichas tipo Frankfurt, jamón cocido, pescado y sus derivados, especias utilizadas para curar carne, brandy de manzana, otras bebidas alcohólicas y cerveza. Se han medido concentraciones en estos alimentos de hasta 850 µg/kg (NTP, 2021). Asimismo, la NDMA se encuentra en algunos productos cosméticos y de tocador, como champús y limpiadores, derivados del caucho y en pesticidas. También en ciertas industrias como curtidurías, plantas que producen tintes y fundidoras (ATSDR, 2022).

La NDMA pertenece a un grupo de compuestos químicos denominados nitrosaminas. Las *N*-nitrosaminas, una clase importante de carcinógenos (Veena & Rashmi, 2014), son derivados *N*-nitrosos alifáticos o aromáticos de aminas secundarias que tienen un grupo nitroso ($-N=O$) unido a nitrógeno (Crews, 2014). La estructura general de estos compuestos es $R^1N(R^2)-N=O$ (Veena &

Rashmi, 2014). En la NDMA los grupos R¹ y R² unidos al nitrógeno de la amina equivalen cada uno a un metil (-CH₃) (Fig. 1.6).

Las *N*-nitrosaminas son estables bajo condiciones fisiológicas (Tricker & Preussmann, 1991), y requieren activación metabólica por hidroxilación dependiente de enzimas de fase I del metabolismo (citocromos P450, CYPs) en el carbono adyacente al grupo *N*-nitroso para producir una α -hidroxinitrosamina (Tricker & Preussmann, 1991; Fernández-Alba & Agüera, 2005). La eliminación espontánea de un aldehído por escisión del enlace carbono-nitrógeno produce un alquildiazohidróxido como paso intermedio en la producción de un ion alquildiazonio electrofílico, que puede reaccionar en los sitios nucleofílicos de varios constituyentes celulares, incluyendo el DNA, formando aductos (Fig. 1.7) (Tricker & Preussmann, 1991).

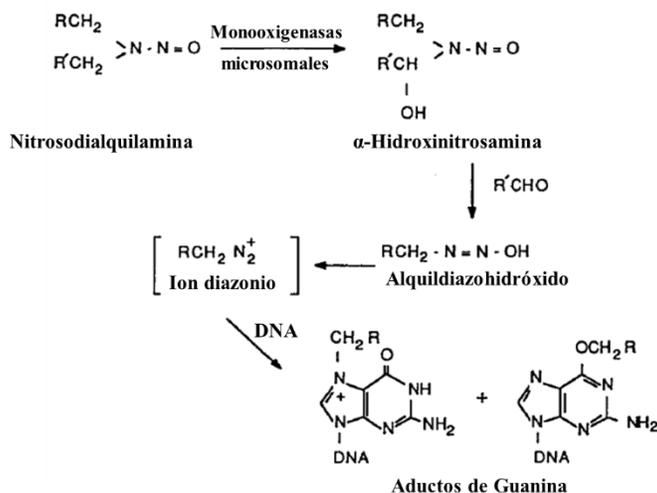


Fig. 1.7 Activación metabólica de compuestos *N*-nitrosos. En la NDMA, tanto R como R' corresponden a un hidrógeno (H), R'CHO es formaldehído (CH₂O) y RCH₂N₂⁺ es el ion metildiazonio. Adaptado de Tricker & Preussmann (1991).

En lo que respecta específicamente a la NDMA, después de su activación metabólica, el formaldehído (CH₂O) puede actuar como agente alquilante y producir aductos de DNA (Fig. 1.8) (Veena & Rashmi, 2014). El formaldehído reacciona con el grupo amino exocíclico de la guanina, para producir *N*²-metilguanina o *N*², *N*²-dimetilguanina (Liu *et al.*, 2016). Además, el hidróxido de metildiazonio intermediario puede perder espontáneamente el ion hidróxido en forma de agua para producir el ion metildiazonio. Este último puede perder nitrógeno espontáneamente generando el carbocatión reactivo (ion metilcarbonio, electrofílico) que puede reaccionar con las bases nucleofílicas del DNA (por ejemplo, las posiciones N² y N⁷ de la guanina), o también es posible que el carbono del ion metildiazonio pueda servir como un centro electrofílico sin carga que

reacción con nucleófilos, con nitrógeno como grupo saliente; en ambos casos se producen aductos de DNA (Fig. 1.8) (Obach & Kalgutkar, 2018). Debido a que la NDMA debe someterse a bioactivación para ejercer sus propiedades tóxicas (Ray *et al.*, 2014), se considera un promutágeno alquilante.

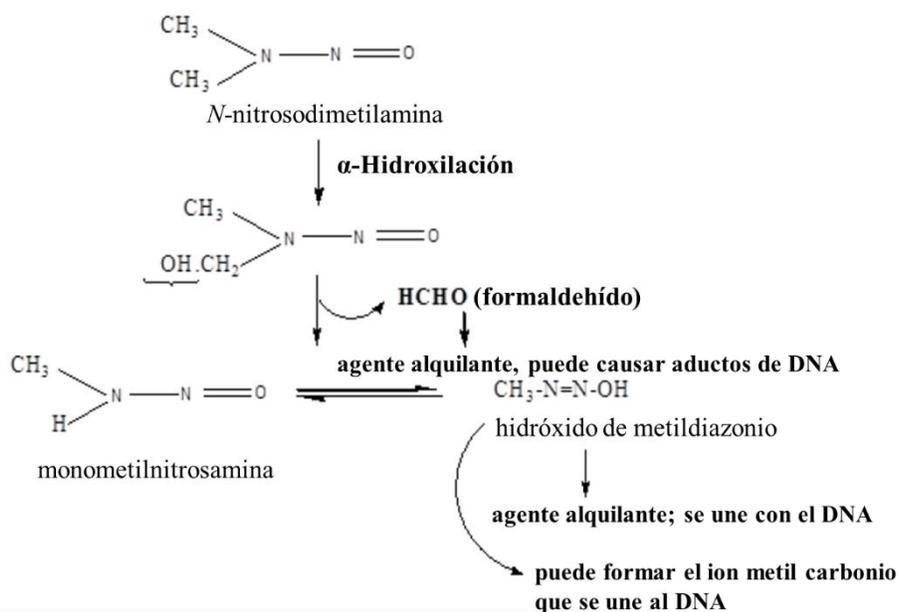


Fig. 1.8 Diseño general de la formación de aductos y metabolismo de la NDMA. Modificado de Veena & Rashmi (2014).

El principal aducto de DNA formado tras la exposición a NDMA es la N^7 -metilguanina; la O^6 -metilguanina es un aducto secundario. Otros aductos de DNA generados en cantidades más pequeñas comprenden la N^3 -metiladenina y la O^4 -metiltimina (Souliotis *et al.*, 1998; WHO, 2002). La lesión cuantitativamente mayor en el DNA, N^7 -metilguanina, no es directamente mutagénica, pero puede experimentar una depuración enzimática o espontánea para formar sitios apurínicos mutagénicos (Souliotis *et al.*, 1998), ya que, si dichos sitios no se reparan antes de la replicación del DNA, pueden dar lugar a transversiones de guanina a timina (WHO, 2002).

Por su parte, los aductos de metilación de bases centrados en oxígeno son fuertemente mutagénicos al inducir emparejamiento erróneo directo: la O^6 -metilguanina da lugar a transiciones de G:C a A:T, mientras que la O^4 -metiltimina provoca transiciones de A:T a G:C. Asimismo, la evidencia reportada en la literatura sugiere que el más abundante de estos, O^6 -metilguanina, juega un papel importante en la mutagénesis y la carcinogénesis por NDMA y otros agentes de metilación (Souliotis *et al.*, 1998; WHO, 2002).

2. ANTECEDENTES

Los agentes tóxicos pueden alterar la función del sistema endocrino al afectar cualquier parte del eje hipotalámico-pituitario-gonadal-reproductivo. Los efectos pueden ser inducidos tanto en hembras como en machos al modificarse la síntesis, el almacenamiento, la liberación, el transporte o la remoción de las hormonas, así como al alterar el reconocimiento del receptor hormonal o respuestas posteriores (EPA, 1996).

El sistema reproductivo masculino puede verse adversamente afectado por la disrupción del equilibrio endocrino regular. En adultos, los efectos que interfieren con la concentración o la acción de la hormona luteinizante (LH), la hormona folículo estimulante (FSH) o ambas pueden disminuir o anular la espermatogénesis, afectar órganos sexuales secundarios (como el epidídimo), la función de las glándulas sexuales accesorias (la próstata y la vesícula seminal) y deteriorar el comportamiento sexual (Sharpe, 1994). En los mamíferos se desarrolla un aparato reproductor femenino a menos que los andrógenos sean producidos y utilizados regularmente por el feto (Byskov & Hoyer, 1994; George & Wilson, 1994).

Debido a lo anterior, las consecuencias de la interrupción del patrón endocrino regular durante el desarrollo del sistema reproductivo masculino antes y después del nacimiento son de particular interés. La diferenciación y el desarrollo del aparato reproductor masculino son especialmente sensibles a las sustancias que interfieren con la producción o acción de los andrógenos (testosterona y dihidrotestosterona). La diferenciación sexual del sistema nervioso central (CNS) también puede verse afectada. Por ende, la interferencia con la producción regular o la respuesta a los andrógenos puede provocar diversos efectos irregulares en los machos genotípicos que van desde la condición pseudohermafrodita hasta la reducción en la producción de esperma o la expresión de una conducta sexual alterada (EPA, 1996).

Existen sustancias químicas identificadas con actividad estrogénica o antiandrogénica que, con niveles de exposición suficientes, son capaces de provocar efectos de este tipo en machos (Gray *et al.*, 1994; Harrison *et al.*, 1995; Kelce *et al.*, 1995). Si bien la sensibilidad puede diferir, es posible que los mecanismos de acción de estos compuestos disruptores hormonales sean consistentes entre las especies de mamíferos. Los químicos con la capacidad de interactuar con el receptor de hidrocarburos de arilo (Ah), las dioxinas o los policlorobifenilos (PCB), también

podrían alterar el desarrollo o la función del sistema reproductivo (Brouwer *et al.*, 1995; Safe, 1995). Varios de los efectos observados en rata y hámster con la exposición de hembras y machos, difieren de los causados por los estrógenos, lo que indica un mecanismo de acción diferente (EPA, 1996).

El sistema nervioso en desarrollo puede ser un blanco de los disruptores endocrinos. En rata, la diferenciación sexual del CNS puede modificarse mediante tratamientos hormonales o exposición a contaminantes ambientales que imitan o interfieren con la acción de ciertas hormonas (EPA, 1996). Se ha demostrado que los químicos con actividad endocrina masculinizan el CNS de la rata hembra. Algunos de ellos son clordecona (Gellert, 1978), diclorodifeniltricloroetano (DDT) (Bulger & Kupfer, 1985) y metoxicloro (Gray *et al.*, 1989).

En las hembras de roedores y humano, la situación es más compleja que en los machos debido a los ciclos reproductivos (estral o menstrual), el proceso de fecundación, la gestación y la lactancia. Todas las funciones del sistema reproductivo femenino están bajo control endocrino y, por lo tanto, pueden ser susceptibles de disrupción por efectos sobre el sistema endocrino-reproductivo (EPA, 1996).

Al igual que con los machos, los cambios de los patrones endocrinos regulares durante el desarrollo pueden resultar en un aparato reproductor femenino anormal (Gellert, 1978; Brouwer *et al.*, 1995). La exposición de las hembras genóticas a andrógenos provoca la formación de tractos reproductivos pseudohermafroditas con diversos grados de severidad. Sin embargo, la exposición a sustancias estrogénicas durante el desarrollo también produce efectos adversos sobre la anatomía y la función de los órganos reproductivos que incluyen, en ratas, malformaciones de la genitalia. Se ha demostrado que la exposición de mujeres al dietilestilbestrol (DES) en el útero provoca una mayor incidencia de adenocarcinoma de células claras vaginal (Giusti *et al.*, 1995). La dioxina, que presumiblemente actúa a través del receptor Ah, también interrumpe el desarrollo del sistema reproductivo femenino (Gray & Ostby, 1995).

Los criterios de valoración para detectar los efectos inducidos por la disrupción del sistema endocrino durante el desarrollo comprenden la evaluación de la fertilidad, la anatomía de los órganos reproductivos (pesos e histopatología), el número de ovocitos, la regularidad de los ciclos, el comportamiento durante el apareamiento y la histopatología de las células de Leydig. En ausencia de datos endocrinos (niveles hormonales, por ejemplo), los efectos significativos en

cualquiera de estos biomarcadores sugieren una disrupción del sistema endocrino y se consideran adversos si los resultados son consistentes y biológicamente plausibles (EPA, 1996).

2.1 Planteamiento del problema

Con lo que se ha mencionado hasta el momento, es claro que se han utilizado disruptores hormonales para contrarrestar los efectos adversos de algunas anomalías y enfermedades en humanos; asimismo, que la humanidad ha sido y continúa siendo expuesta en diferentes formas a contaminantes ambientales, que también podrían tener actividad disruptora, siendo el sistema reproductivo uno de los principales blancos de dichos compuestos (Lu *et al.*, 2020).

La exposición a estas sustancias puede traer consigo efectos a largo plazo en los individuos expuestos que incluso pueden abarcar las generaciones subsiguientes. Sin embargo, el identificar y detectar las respuestas multi y transgeneracionales en mamíferos se hace complicado por el tiempo que se requiere para el seguimiento de varias generaciones, y para acumular evidencia suficiente acompañada de tamaños de muestra grandes que permitan análisis estadísticos robustos.

La problemática de humanos expuestos a disruptores endocrinos es de particular interés por los efectos adversos que se han documentado en individuos expuestos y las evidencias reportadas de modelos de mamíferos. No obstante, la mayoría de los estudios no contemplan varias generaciones en parte por las dificultades previamente mencionadas.

Este trabajo surge de la idea de proponer un modelo complementario a mamíferos para detectar disruptores hormonales de mamíferos y documentar los efectos tanto en los organismos tratados como en las generaciones subsiguientes no expuestas a sustancias o mezclas con potencial reprotóxico. Es así como, con la intención de aprovechar las múltiples ventajas que tiene el uso de *Drosophila*, se propone a este modelo. Además de que la utilización de un modelo *in vivo* contempla las interacciones sinérgicas o antagónicas solamente presentes en el animal completo (Beranek, 1990).

Lo primero que debe hacerse, antes de ensayar los diferentes disruptores hormonales o mezclas con potencial de alterar la función reproductiva (incluyendo inhibidores de aromataasa), es calibrar el modelo utilizando un control positivo e identificar biomarcadores en *Drosophila* asociados con la actividad de disruptores hormonales de mamíferos. Estos abarcan fertilidad, cantidad de progenie, morfología interna y externa de las gónadas, malformaciones en el desarrollo

del sistema reproductivo, entre otros. Como se mencionó en una sección anterior, en el caso particular de los insectos, se ha propuesto que las contrapartes de la testosterona y el estradiol de mamíferos son la ecdisona (E) y la 20-hidroxicdisona (20E), respectivamente. Por tanto, otro biomarcador que puede resultar relevante es la expresión de genes que codifiquen enzimas con roles preponderantes en la ruta de ecdisteroides de *Drosophila*. Para el caso particular de la aromataza de mamíferos, que se encarga de la conversión de la testosterona en estradiol, habría que determinar si puede afectarse la expresión de su contraparte en el insecto, cuyo candidato es CYP314A1 (De Loof, 2006).

El control positivo es una sustancia que ha probado inducir algún efecto específico de interés; en este caso corresponde a algún compuesto que presente actividad de disruptor hormonal en mamíferos y del que se conozca induzca respuestas en *Drosophila*, lo que permitirá identificar los biomarcadores; además que sea de interés para el humano. La *N*-nitrosodimetilamina (NDMA) es un compuesto que reúne las características descritas.

En la literatura hay reportes sobre la actividad como disruptor endocrino de la NDMA en mamíferos. El peso relativo de las glándulas suprarrenales y el recuento mitótico aumentan en ratas después de la administración por sonda en dosis única de 20 mg/kg de NDMA (Nishie, 1983). Asimismo, cuando a conejos machos variedad Nueva Zelanda se les administran dosis diarias por sonda de 0.5 mg/kg/día de NDMA durante 12 semanas, se observan marcadas reducciones en la testosterona sérica (81 y 96% menos que los controles a las ocho y 12 semanas, respectivamente) junto con incrementos variables en estradiol plasmático (152 y 27% a las ocho y 12 semanas). En el sacrificio de los especímenes al final de la exposición, los cambios histopatológicos testiculares en los conejos tratados incluyen túbulos seminíferos desorganizados, edema intersticial, degeneración del epitelio germinal en túbulos seminíferos y células de Sertoli, exfoliación de células en la luz de los túbulos, congestión de vasos sanguíneos y proliferación de células de Leydig (Sheweita *et al.*, 2017; ATSDR, 2022).

La NDMA es un promutágeno alquilante del que también existe amplia evidencia de su actividad genotóxica tanto *in vivo* como *in vitro* en diversidad de grupos (WHO, 2008), incluyendo efectos adversos en ratas (Peto *et al.*, 1991; Brendler *et al.*, 1992) y en *Drosophila*. Se ha reportado que la exposición *in vivo* a la NDMA produce en *D. melanogaster* mutaciones somáticas (Negishi

et al., 1991; Goto *et al.*, 1999; Ramos-Morales *et al.*, 2001), aneuploidías (Woodruff & Seeger 1991), recombinación mitótica (Ramos-Morales *et al.*, 2001) y daño al DNA (Negishi *et al.*, 1991).

Agregado a esto, se prevé razonablemente que la NDMA sea un carcinógeno humano con base a evidencia suficiente de carcinogenicidad de estudios en animales experimentales (NTP, 2021). La NDMA genera tumores en numerosas especies, en varios sitios de tejidos diferentes y por diversas vías de exposición. Se observan tumores en todas las especies analizadas, incluidos ratones, ratas, hámsteres, cuyos, ratas comunes africanas (género *Mastomys*), conejos, ranas, tritones y varias especies de peces. La NDMA produce tumores principalmente en el hígado, las vías respiratorias, los riñones y los vasos sanguíneos. Se observan tumores benignos y malignos del hígado (adenoma hepatocelular y carcinoma) o del conducto biliar (colangioma o tumores colangiocelulares) luego de (i) la administración oral en ratones, ratas, hámsteres, conejos, cuyos y peces, (ii) exposición por inhalación en ratones, (iii) exposición prenatal en ratones, (iv) administración subcutánea en hámsters, *Mastomys* y ratones y ratas (recién nacidos y lactantes), (v) inyección intraperitoneal en ratones (adultos y recién nacidos) y en tritones, (vi) inyección intramuscular en ratas y (vii) exposición a través del agua del tanque en ranas y peces (NTP, 2021).

En cuanto a la toxicidad reproductiva, la NDMA actúa como carcinógeno transplacentario en hembras preñadas de rata, ratón y hámster; independiente a la ruta de administración. Además, ratones alimentados con NDMA producen descendientes muertos o que mueren poco después del nacimiento (Ray *et al.*, 2014).

Con lo que se ha descrito anteriormente es claro que la información de los efectos *in vivo* de la exposición a disruptores hormonales de mamíferos que abarquen varias generaciones es escasa o desconocida. Debido a la relevancia que esta problemática tiene para el humano, se requieren respuestas a preguntas como:

- ¿Se podrá detectar en *Drosophila* la actividad de disruptores hormonales de mamíferos?
- ¿Pueden los efectos adversos esperados por la acción de disruptores hormonales identificarse con el modelo experimentado de *Drosophila*? ¿Cuáles de los efectos reportados en mamíferos se comparten con *Drosophila*?
- ¿Qué biomarcadores pueden ser sensibles en *Drosophila* a la presencia de disruptores endocrinos de mamíferos?

- ¿Los disruptores hormonales de mamíferos pueden modificar la expresión génica del citocromo *Cyp314a1* de la ruta de ecdisteroides de *Drosophila*?

2.2 Justificación

En la actualidad no se cuenta con modelos biológicos que permitan detectar la genotoxicidad de químicos disruptores hormonales de mamíferos en un tiempo relativamente corto, y en los que se tenga un tamaño de muestra elevado. Por la importancia que esto tiene, en particular para el ser humano, es de sumo interés implementar un modelo complementario al de mamíferos, calibrado, que sea más rápido y que conlleve un incremento importante en el número de muestra que le dé mayor confiabilidad a los resultados. Por las ventajas que están ampliamente documentadas en *Drosophila*, se propone a este modelo para construir una metodología que permita identificar compuestos o mezclas con potencial reprotóxico.

3. HIPÓTESIS

Si la NDMA actúa como disruptor endocrino en *Drosophila*, los biomarcadores de efecto como la sobrevivencia, la proporción sexual, la fertilidad, la cantidad de progenie y la expresión de citocromos asociados en su biotransformación (*Cyp314a1*), se modificarán en los organismos expuestos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Identificar biomarcadores en *Drosophila* que respondan a la actividad del disruptor endocrino de mamíferos *N*-nitrosodimetilamina (NDMA).

4.2 Objetivos particulares

- Determinar el efecto *in vivo* de la exposición de moscas *Drosophila melanogaster* y *Drosophila aldrichi* a la NDMA.
- Evaluar *in vivo* el efecto de la NDMA sobre la capacidad reproductiva de *D. aldrichi* en tres generaciones subsecuentes.
- Establecer el efecto *in vivo* de la exposición a la NDMA en uno de los progenitores (hembra o macho) y en ambos.

- Correlacionar la actividad de la NDMA en *Drosophila* por revisión morfológica externa e interna de las gónadas.
- Determinar el efecto de la NDMA en la expresión de *Cyp314a1* en *D. melanogaster*.

5. METODOLOGÍA

5.1 Tipos de experimentos: de reprotoxicidad y moleculares

Con el ensayo de reprotoxicidad se buscó determinar *in vivo* el efecto de la exposición a la NDMA en los organismos tratados (toxicidad), su capacidad reproductiva y la de dos generaciones subsecuentes (reprotoxicidad), a partir de los biomarcadores sobrevivencia, proporción sexual, fertilidad y progenie por familia. A nivel molecular se evaluó si la NDMA afectó la expresión del gen *shade (shd)*, responsable de codificar CYP314A1 (ecdisona 20-hidroxilasa) en *Drosophila*.

5.2 Especies de *Drosophila*

5.2.1 *Drosophila melanogaster*

Se utilizó la cepa silvestre (Canton-S) en ambos tipos de experimentos; sin embargo, en el ensayo de reprotoxicidad solo se utilizó como línea de referencia (control).

5.2.2 *Drosophila aldrichi*

La especie *D. aldrichi* solo se usó como cepa experimental en el ensayo de reprotoxicidad. Esta especie tiene la particularidad de que los machos poseen los testículos pigmentados respecto a los hialinos que se encuentran en *D. melanogaster*. Otra diferencia respecto a la especie control radica en el ciclo de desarrollo: mientras que el de *D. melanogaster* es de aproximadamente 10 días a 25 °C, el de *D. aldrichi* es de 15 días. Por su parte, el tercer estadio larvario, de particular interés en este trabajo, se alcanza a las 72 h y a las 144 h en *D. melanogaster* y *D. aldrichi*, respectivamente.

5.3 Ensayo de reprotoxicidad

El tratamiento se administró a larvas de tercer estadio. Durante esta etapa en particular existe una intensa actividad metabólica concentrada predominantemente en los cuerpos grasos (Clark, 1982; Petryk *et al.*, 2003).

5.3.1 Obtención de larvas de tercer estadio

Organismos de la línea de referencia, *D. melanogaster*, y experimental, *D. aldrichi*, fueron colocados en frascos con medio de cultivo fresco por un periodo de 8 y 12 h, respectivamente, retirándolos posteriormente. A partir de los huevos recolectados se obtuvieron larvas de 72 ± 4 h de *D. melanogaster* y 144 ± 6 h para *D. aldrichi* que se extrajeron por el método de Nöthiger (1970). Este método consiste en separar las larvas del medio a través de un gradiente de densidad generado por una disolución de sacarosa al 20% para *D. melanogaster* y al 30% para *D. aldrichi*. Posteriormente, se asignaron al azar larvas para los tratamientos subsecuentes (combinaciones de los niveles de los factores concentración de NDMA y especie).

5.3.2 Administración del tratamiento

Se analizaron, por especie, 16 concentraciones de NDMA disuelta en agua destilada en un rango de $4.77 \text{ E-}06$ a 5 mM (tratamientos experimentales) (Tabla 1), preparadas por diluciones sucesivas; más el testigo negativo (H_2O). Las concentraciones se seleccionaron con base en la actividad de toxicidad y genotoxicidad de la NDMA trabajada previamente en *D. melanogaster* en el grupo de investigación de genética y toxicología ambiental-banco de moscas de la UNAM.

Tabla 1. Concentraciones de NDMA.

NDMA [mM]
4.77E-06
9.54E-06
1.91E-05
3.81E-05
7.63E-05
1.53E-04
6.10E-04
2.44E-03
9.77E-03
3.91E-02
1.56E-01
3.13E-01
6.25E-01
1.04
1.5
5

De cada concentración de NDMA se tomaron 4.5 mL para mezclarlos con 1 g de medio instantáneo (*Carolina Biological Supply*) y fueron puestos en tubos previamente esterilizados. En cada tubo se depositaron aproximadamente 100 larvas de tercer estadio y se sometió cada unidad experimental a un tratamiento subcrónico a través de la alimentación (72 x 48 h para *D. melanogaster* y 144 x 72 h para *D. aldrichi*). Los organismos permanecieron en los tubos hasta atravesar el periodo de pupación (donde ya no ingieren alimento y se llevó a cabo la metamorfosis), para posteriormente emerger como adultos. Cada tratamiento se realizó por duplicado; el experimento se realizó dos veces, dando un total de cuatro réplicas. Después de que los individuos emergieron, se recobraron, contaron (tres lecturas para *D. melanogaster* y seis para *D. aldrichi*), separaron y clasificaron por sexo, para obtener la sobrevivencia y la proporción sexual de las series testigo y experimentales.

5.3.3 Sistemas de cruce

Una vez recuperadas las moscas *D. aldrichi* de los tratamientos con el compuesto, se realizaron tres esquemas de cruce con la finalidad de evaluar el efecto *in vivo* de la NDMA en la capacidad reproductiva cuando uno o ambos progenitores estuvieron tratados: hembra tratada con macho tratado (H t x M t), hembra no tratada con macho tratado (H nt x M t) y hembra tratada con macho no tratado (H t x M nt) (Fig. 5.1).

Para las cruces, de los organismos recobrados se seleccionaron al azar 10 hembras (♀♀) vírgenes tratadas para cruzarse con machos tratados (♂♂) (H t x M t), 10 ♀♀ vírgenes no tratadas para cruzarse con ♂♂ tratados (H nt x M t) y 10 ♀♀ vírgenes tratadas para cruzarse con 10 ♂♂ no tratados (H t x M nt). Con ello se estimó la fertilidad de la generación de parentales, su progenie por familia F₁ y la proporción sexual en cada tratamiento de los tres esquemas de cruce (Fig. 5.1).

Posteriormente, con el objetivo de determinar si se afectó la capacidad reproductiva de las moscas F₁ y F₂ no expuestas a NDMA, pero cuyos parentales (uno o ambos) fueron tratados en la etapa larvaria, primero se cruzó la F₁ derivada de cada sistema y se siguieron a 10 parejas (tomando dos parejas por tubo de los cinco primeros tubos con progenie) para obtener la fertilidad de la F₁, cantidad de progenie F₂ y proporción sexual en cada concentración; luego se realizó lo mismo con la F₂ (Fig. 5.1). De esta manera se estableció el efecto del tratamiento de los progenitores en la capacidad reproductiva de su descendencia no expuesta por dos generaciones. Este experimento completo se repitió dos veces.

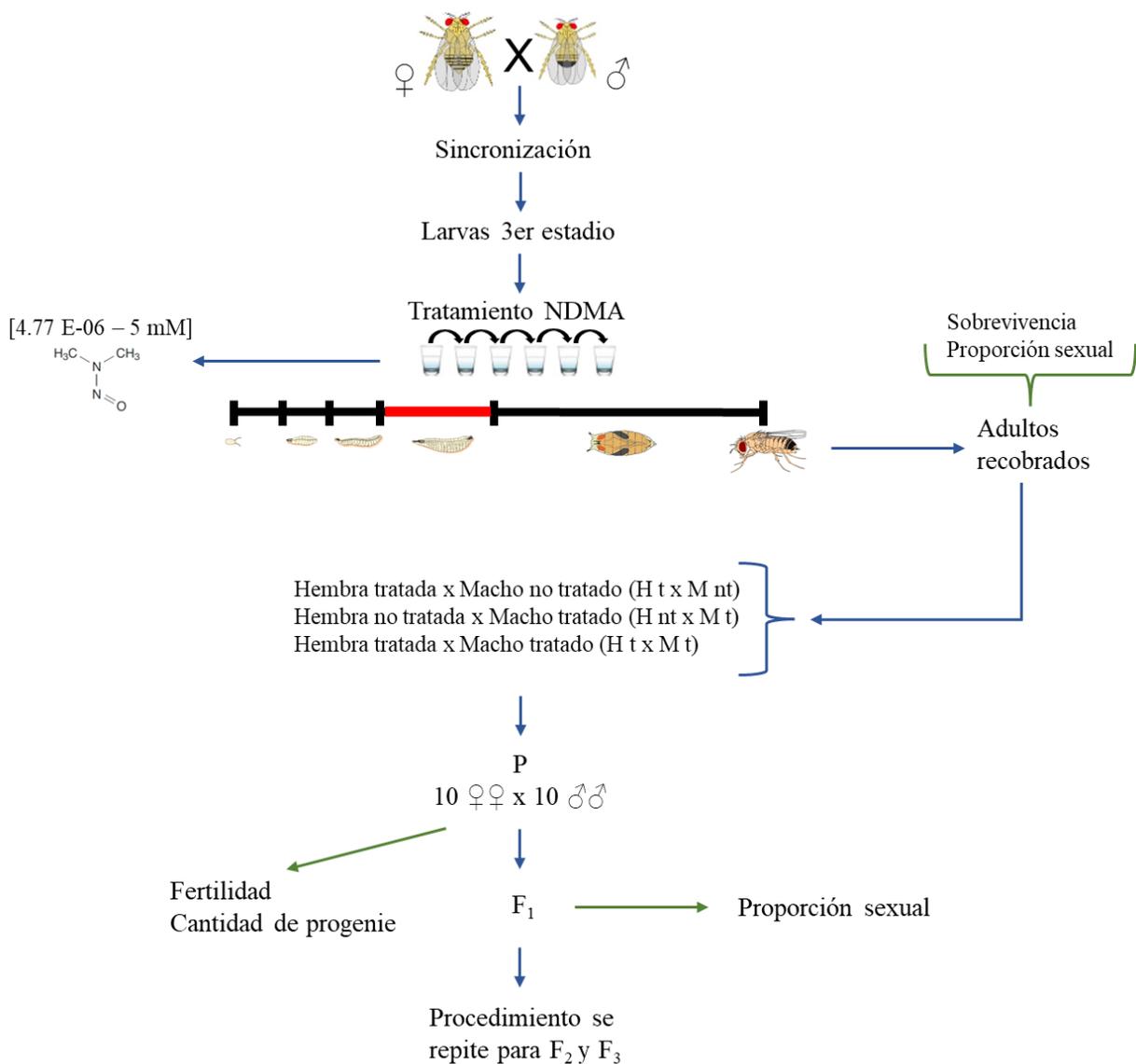


Fig. 5.1 Resumen de la metodología empleada en el ensayo de reprotoxicidad.

5.3.4 Biomarcadores

5.3.4.1 Toxicidad

5.3.4.1.1 Sobrevivencia

Para establecer la toxicidad del tratamiento se calculó el promedio de los organismos adultos recuperados. Para cada concentración de NDMA y el testigo, la sobrevivencia promedio se calculó dividiendo el total de moscas recobradas entre el total de réplicas:

$$\text{Sobrevivencia promedio} = \frac{\sum_{i=1}^n \text{Total de moscas}}{n}, n = \text{número de réplicas}$$

5.3.4.1.2 Proporción sexual

Se calculó la proporción sexual para medir si el tratamiento afectó el número de hembras y machos recobrados. Los organismos recuperados por concentración y el testigo se clasificaron en machos y hembras. La proporción sexual para hembras se calculó dividiendo el total de hembras entre el total de organismos y la de machos dividiendo el total de machos entre el total de individuos:

$$\text{Proporción sexual} = \frac{\text{Total de moscas hembra o macho}}{\text{Total de moscas}}$$

Con los valores de proporción sexual, tanto para hembras como para machos, se obtuvo la proporción sexual promedio como sigue:

$$\text{Proporción sexual promedio} = \frac{\sum_{i=1}^n \text{Proporción sexual}}{n}, n = \text{número de réplicas}$$

5.3.4.2 Reprotoxicidad

5.3.4.2.1 Fertilidad

Para determinar el efecto de la NDMA en las células germinales se utilizaron los biomarcadores de toxicidad reproductiva de fertilidad y cantidad de progenie. El primero se obtuvo dividiendo la cantidad de parejas que tuvieron progenie entre el total de parejas cruzadas:

$$\text{Fertilidad} = \frac{\text{Número de parejas con progenie}}{\text{Número de parejas cruzadas}}$$

Los índices de fertilidad se calcularon de la siguiente manera: la fertilidad de las series testigo y experimentales se dividió entre la de su testigo correspondiente, de manera que los testigos adquirieron un valor de 1 y las series experimentales valores de fertilidad alrededor de 1 (frecuencia corregida).

5.3.4.2.2 Cantidad de progenie

La progenie promedio por familia se estimó dividiendo la progenie total recuperada por pareja en cada concentración y el testigo entre el número de parejas:

$$\text{Progenie promedio} = \frac{\sum_{i=1}^n \text{Total de progenie por pareja}}{n}, n = \text{total de parejas}$$

Los índices de progenie promedio por familia se obtuvieron de la misma manera que los índices de fertilidad: dividiendo la fecundidad promedio de cada concentración y el testigo entre la del testigo.

5.3.5 Análisis estadísticos

Para determinar diferencias significativas en la sobrevivencia y proporción sexual promedio entre las distintas concentraciones de NDMA y el testigo se llevaron a cabo ANOVAs de una vía y, cuando estos arrojaron diferencias significativas, se realizaron pruebas *post-hoc* de Dunnett para evaluar específicamente si las diferencias fueron respecto a los testigos.

Por otro lado, con el propósito de valorar si hubo retraso en el desarrollo de los organismos expuestos a NDMA, aceleración o ambos, tanto de *D. melanogaster* como de *D. aldrichi*, se graficaron por concentración las frecuencias relativas acumuladas (proporción acumulada del total de organismos recuperados) en función del número de lecturas.

En cuanto a la fertilidad, se estimaron las diferencias entre los distintos tratamientos experimentales y el testigo, así como entre los tres esquemas de cruce en cada concentración, mediante una prueba de Z para proporciones. En lo que concierne a la cantidad de progenie, además de realizarse ANOVA de una vía y pruebas *post-hoc* de Dunnett, se determinó si existían diferencias significativas entre los tres sistemas en cada tratamiento experimental con un ANOVA de dos vías; en los casos donde hubo diferencias se realizó la prueba *post-hoc* de Tukey para precisar cuáles esquemas se diferenciaron entre sí y en qué concentración. En todas las pruebas el nivel de significancia fue de 5% ($\alpha = 0.05$).

5.3.6 Determinación del efecto de la NDMA en *Drosophila* por revisión morfológica externa e interna de las gónadas

La presencia de testículos pigmentados en los machos de *D. aldrichi* permitió realizar inspecciones externas de sus gónadas al momento de realizar las cruces; información que se validó luego de diseccionarlos. Por su parte, en las hembras de *D. aldrichi* y en ambos sexos de *D. melanogaster*, debido a sus gónadas hialinas, únicamente se llevaron a cabo revisiones morfológicas internas.

Para *D. melanogaster* se diseccionaron 20 parejas por concentración escogidas al azar y en el caso de *D. aldrichi*, por cada sistema de cruce y tratamiento, se diseccionaron todos los parentales (P, F₁ x F₁ y F₂ x F₂) y 20 parejas de sus respectivas progenies (F₁, F₂ y F₃) también seleccionadas

aleatoriamente. Cabe destacar que en algunas concentraciones no se alcanzó esta cantidad de parejas porque la descendencia fue insuficiente o inexistente.

5.4 Ensayo molecular

5.4.1 Análisis de la transcripción de *shd* (*shd*)

Para analizar el perfil de expresión a nivel transcripcional del gen *shd* a lo largo de las primeras fases de desarrollo, se utilizó la técnica de la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa del producto de la transcripción reversa (RT-PCR). El RNA total se purificó a partir de 30 mg de larvas o pupas de *D. melanogaster* cuyo medio contenía 1.56 E-01 mM de NDMA o H₂O como control. Los tiempos de desarrollo a partir de los cuales se purificó el RNA fueron: 72 ± 4 h, 96 ± 4 h, 115 ± 4 h y 146 ± 4 h (Fig. 5.2). Esta concentración de NDMA se usó porque en estudios previos en *D. melanogaster* se observó una caída de la fertilidad a partir de esa concentración sin modificarse la sobrevivencia.

El RNA se purificó utilizando el kit de purificación de RNA total (Jena Bioscience) de acuerdo con el protocolo correspondiente. Posteriormente, se eliminó el posible DNA genómico (gDNA) residual tratando cada muestra con DNasa-I empleando el kit de eliminación de gDNA (Jena Bioscience). La integridad del RNA se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Para los ensayos de amplificación de *shd* se utilizaron los oligonucleótidos 5'-ATGGCCGTGATACTGTTGCTGGC-3' (sentido) y 5'-CCTCCAGCACTATGTCGCCATATTG-3' (antisentido). Como control interno se usó el gen *RpL23*, cuya amplificación se logró con el oligonucleótido sentido 5'-GTGATGAACTGTGCCGACAA-3' y el antisentido 5'-CCTTCATTTGCCCTTGTTG-3' (Petryk *et al.*, 2003).

La especificidad de los oligonucleótidos se probó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando como molde gDNA que se purificó a partir de 30 larvas de 72 h ± 4 h de *D. melanogaster* siguiendo el protocolo previamente descrito (Huang *et al.*, 2009). Este protocolo, junto con algunas modificaciones, consistió en lo siguiente:

- a) Se recolectaron las larvas en un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL puesto en hielo.
- b) Se trituraron las larvas con la ayuda de un pistilo en 200 µL de *Buffer A* (Tris-Cl 100 mM, pH 7.5, EDTA 100 mM, pH 8.0, NaCl 100 mM y SDS al 0.5%). Luego, se agregaron 200 µL adicionales de *Buffer A* y se continuó moliendo hasta que solo quedaron cutículas.
- c) El macerado se incubó a 65 °C por 30 min.

- d) Se adicionaron 800 μ L de *Buffer* B (200 mL de acetato de potasio 5 M y 500 mL de LiCl 6 M) a cada muestra, se mezcló bien invirtiendo el tubo múltiples veces y se incubó a temperatura ambiente por 60 min.
- e) Se centrifugó a 12000 rpm por 15 min a 4 °C.
- f) Se transfirió 1 mL del sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga (teniendo cuidado de no transferir ningún precipitado flotante) y se desechó el botón.
- g) Se agregaron 600 μ L de isopropanol a cada muestra y se mezcló invirtiendo el tubo varias veces.
- h) Se centrifugó a 12000 rpm por 15 min a 4 °C.
- i) Se descartó el sobrenadante, se lavó el botón con 1 mL de etanol al 70% y se centrifugó a 12000 rpm por 5 min. Se descartó el sobrenadante y el botón se dejó secar a 55 °C por 5 min.
- j) Cada botón se resuspendió en 150 μ L de *Buffer* TE (Tris-Cl 10 mM (pH 8.0) y EDTA 1 mM (pH 8.0)) y se almacenó a 20 °C hasta su uso.

La integridad del DNA genómico (gDNA) se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los productos de la amplificación usando como molde al gDNA se esperaban de 509 pb para *shd* y de 854 pb para *RpL23*.

Por otro lado, para los ensayos de RT-PCR se usó el kit de RT-PCR de alta fidelidad SCRIPT (Jena Bioscience). Este kit permite que a partir de RNA se sintetice el cDNA y se amplifique por PCR en una sola reacción porque contiene tanto a la transcriptasa reversa para la síntesis del cDNA (RT) como a la DNA polimerasa termoestable que amplifica al cDNA (PCR). Las condiciones de la reacción fueron las siguientes:

- a) Síntesis de cDNA: 50 °C por 45 min.
- b) Desnaturalización inicial y activación de la DNA polimerasa: 95°C por 5 min.
- c) Amplificación en cadena de la polimerasa (40 ciclos):
 - a. Desnaturalización: 95 °C por 10 s.
 - b. Alineamiento: 58 °C (oligonucleótidos para *shd*) o 55 °C (oligonucleótidos para *RpL23*) por 20 s.
 - c. Extensión: 72 °C por 30 s.
- d) Extensión final: 72 °C por 2 min.

Los productos de la amplificación por RT-PCR usando como molde el RNA total se esperaban de 319 pb para *shd* y 268 pb para *RpL23*. La diferencia en el tamaño de los productos provenientes de gDNA y mRNA se debe a los intrones presentes en cada uno de los genes analizados.

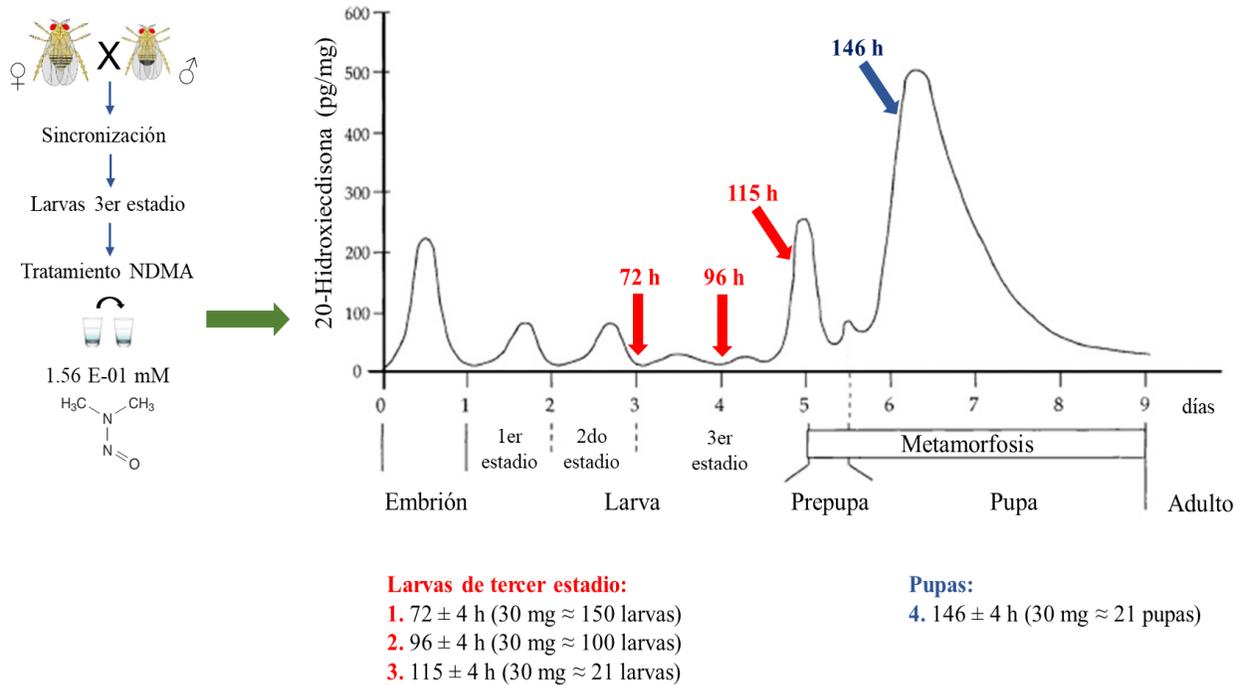


Fig. 5.2 Resumen de la metodología empleada en la obtención de muestras para el ensayo molecular. Perfil de la 20E modificado de Thummel (2001).

6. RESULTADOS

Primeramente, se presentan los resultados del ensayo de reprotoxicidad; en esta parte se determinó si existe un efecto tóxico del tratamiento con NDMA a partir los biomarcadores de sobrevivencia (S) y la proporción sexual (P_{sx}). Seguido a esto, se evaluó si la exposición a NDMA alteró el tiempo de desarrollo de las moscas y se presentan las malformaciones encontradas en los adultos. Luego, se muestra si la capacidad reproductiva de las moscas progenitoras expuestas a NDMA se modificó, al igual que la de su descendencia F₁ y F₂ no tratada, empleando los biomarcadores de toxicidad reproductiva de fertilidad (F) y promedio de progenie por familia (PF). Además, se describe la morfología de las gónadas de los organismos tanto expuestos como no tratados y se finaliza con los resultados del ensayo molecular, es decir, con la determinación del efecto de la NDMA en la expresión de *shd* (*Cyp314a1*) en *D. melanogaster*.

6.1 Ensayo de reprotoxicidad

6.1.1 Toxicidad de la NDMA en *D. melanogaster* y *D. aldrichi*

En la tabla 2 se presentan los resultados de la sobrevivencia y proporción sexual de las moscas expuestas a NDMA, recobradas de la línea de referencia *D. melanogaster* Canton-S y de la experimental *D. aldrichi*. En la línea de referencia, la sobrevivencia no siguió una relación lineal, encontrándose respuestas mayormente negativas. A partir de 1.53 E-04 mM de NDMA se recuperaron menos moscas con respecto al testigo, siendo la reducción estadísticamente significativa con 1.04 mM y 1.5 mM ($F_{15,48} = 5.763$, $p < 0.0001$; Dunnett, $p = 0.0073$, $p < 0.0001$); solo la última concentración (5 mM) fue letal (Fig. 6.1). En cuanto a la línea experimental, la sobrevivencia tampoco mostró un comportamiento lineal y se observaron respuestas tanto positivas como negativas; se recobraron menos moscas a partir de 3.91 E-02 mM detectándose una disminución significativa en comparación con el testigo en 3.91 E-02 mM, 1.56 E-01 mM y 3.13 E-01 mM ($F_{12,39} = 6.943$, $p < 0.0001$; Dunnett, $p = 0.0422$, $p = 0.0135$, $p = 0.0027$), siendo el tratamiento letal a partir de 6.25 E-01 mM (Tabla 2; Fig. 6.1).

En cuanto a la proporción sexual (Fig. 6.2), aunque en Canton-S hubo variaciones en relación con el testigo en cinco concentraciones (9.54 E-06 mM, 2.44 E-03 mM, 1.56 E-01 mM, 1.04 mM y 1.5 mM,) no se confirmaron diferencias significativas ($F_{15,48} = 1.844$, $p = 0.0554$). Por su parte, el sesgo en la proporción de sexos en *D. aldrichi* fue mayor respecto al testigo en 1.53 E-04 mM, 2.44 E-03 mM y 1.56 E-01 mM; sin embargo, tampoco se confirmaron diferencias

significativas ($F_{12,39} = 0.3539$, $p = 0.9719$). Cabe señalar que en la concentración 3.13 E-01 mM se presentó un valor alto en el error estándar en comparación con las demás concentraciones (Tabla 2; Fig. 6.2), debido a que en una réplica se recobró solo una hembra y en otra solamente un macho; estos valores extremos para la proporción sexual (1 y 0) incrementaron la varianza.

Tabla 2. Supervivencia y proporción sexual de las moscas expuestas a NDMA.

NDMA [mM]	Canton-S						<i>D. aldrichi</i>					
	N	S ± ee	d	Psx H ± ee	Psx M ± ee	d	N	S ± ee	d	Psx H ± ee	Psx M ± ee	d
Testigo	248	62.00 ± 6.62	-	0.50 ± 0.02	0.50 ± 0.02	-	283	70.75 ± 11.21	-	0.47 ± 0.06	0.53 ± 0.06	-
4.77E-06	278	69.50 ± 6.89	-	0.54 ± 0.03	0.46 ± 0.03	-	247	61.75 ± 10.57	-	0.52 ± 0.02	0.48 ± 0.02	-
9.54E-06	221	55.25 ± 4.61	-	0.41 ± 0.03	0.59 ± 0.03	-	230	57.50 ± 15.31	-	0.47 ± 0.07	0.53 ± 0.07	-
1.91E-05	177	44.25 ± 5.27	-	0.46 ± 0.06	0.54 ± 0.06	-	310	77.50 ± 9.84	-	0.49 ± 0.02	0.51 ± 0.02	-
3.81E-05	241	60.25 ± 5.56	-	0.55 ± 0.05	0.45 ± 0.05	-	175	43.75 ± 4.39	-	0.51 ± 0.02	0.49 ± 0.02	-
7.63E-05	259	64.75 ± 5.48	-	0.53 ± 0.02	0.47 ± 0.02	-	319	79.75 ± 15.53	-	0.51 ± 0.03	0.49 ± 0.03	-
1.53E-04	241	60.25 ± 4.75	-	0.54 ± 0.02	0.46 ± 0.02	-	358	89.50 ± 13.84	-	0.43 ± 0.02	0.57 ± 0.02	-
6.10E-04	199	49.75 ± 6.86	-	0.54 ± 0.04	0.46 ± 0.04	-	371	92.75 ± 13.28	-	0.52 ± 0.03	0.48 ± 0.03	-
2.44E-03	213	53.25 ± 3.35	-	0.59 ± 0.03	0.41 ± 0.03	-	361	90.25 ± 13.10	-	0.42 ± 0.03	0.58 ± 0.03	-
9.77E-03	246	61.50 ± 4.52	-	0.49 ± 0.04	0.51 ± 0.04	-	342	85.50 ± 16.98	-	0.47 ± 0.02	0.53 ± 0.02	-
3.91E-02	227	56.75 ± 7.12	-	0.53 ± 0.03	0.47 ± 0.03	-	91	22.75 ± 4.52	*	0.51 ± 0.03	0.49 ± 0.03	-
1.56E-01	235	58.75 ± 3.42	-	0.44 ± 0.04	0.56 ± 0.04	-	62	15.50 ± 2.10	*	0.56 ± 0.04	0.44 ± 0.04	-
3.13E-01	219	54.75 ± 5.82	-	0.49 ± 0.02	0.51 ± 0.02	-	25	6.25 ± 3.09	*	0.51 ± 0.20	0.49 ± 0.20	-
6.25E-01	218	54.50 ± 7.37	-	0.50 ± 0.02	0.50 ± 0.02	-	0					
1.04E+00	136	34.00 ± 2.04	*	0.59 ± 0.04	0.41 ± 0.04	-	0					
1.50E+00	65	16.25 ± 3.07	*	0.58 ± 0.06	0.42 ± 0.06	-	0					
5.00E+00	0						0					

N, total de moscas; S, supervivencia promedio; Psx H, proporción sexual promedio de hembras recobradas; Psx M, proporción sexual promedio de machos recuperados; ee, error estándar; d, diagnóstico estadístico: prueba de ANOVA de una vía; *, indica diferencias significativas respecto al testigo ($p < 0.05$); -, señala que no se encontraron diferencias. Tanto para la línea de referencia como para la experimental se realizaron cuatro réplicas.

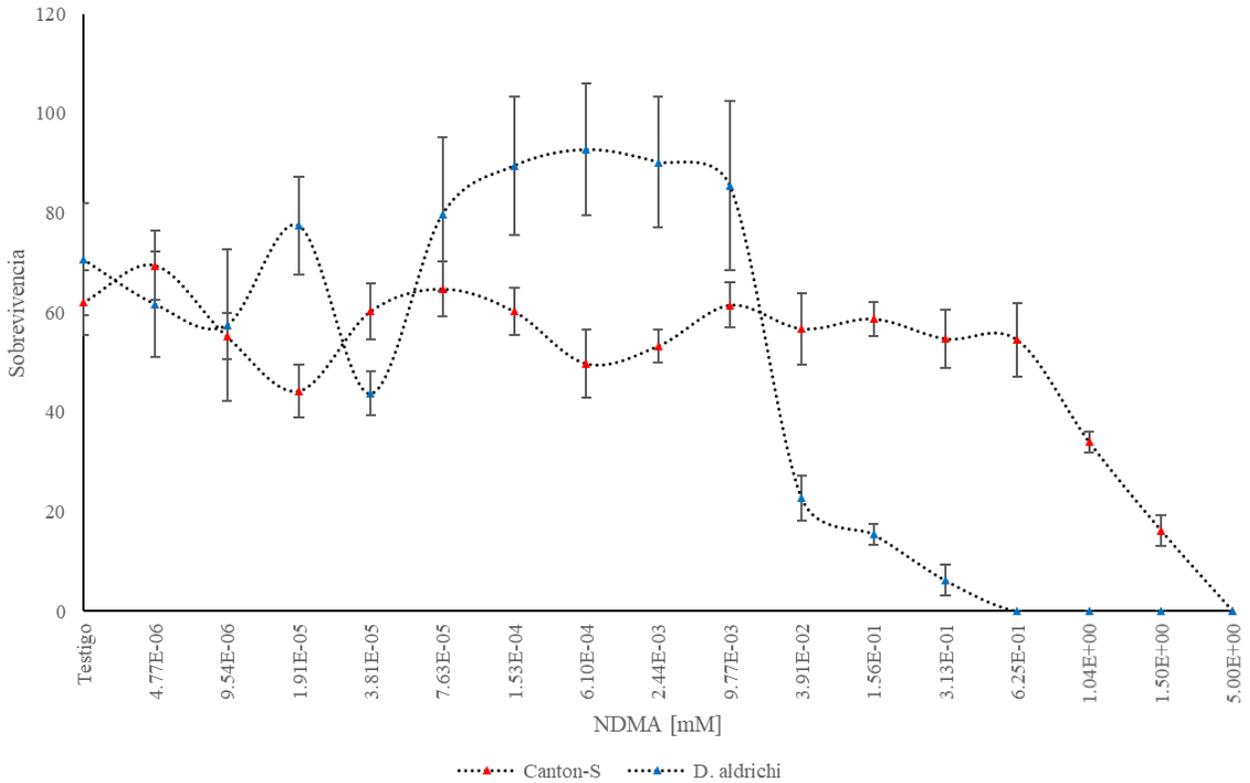


Fig. 6.1 Sobrevivencia promedio de las moscas Canton-S y *D. aldrichi* expuestas a NDMA.

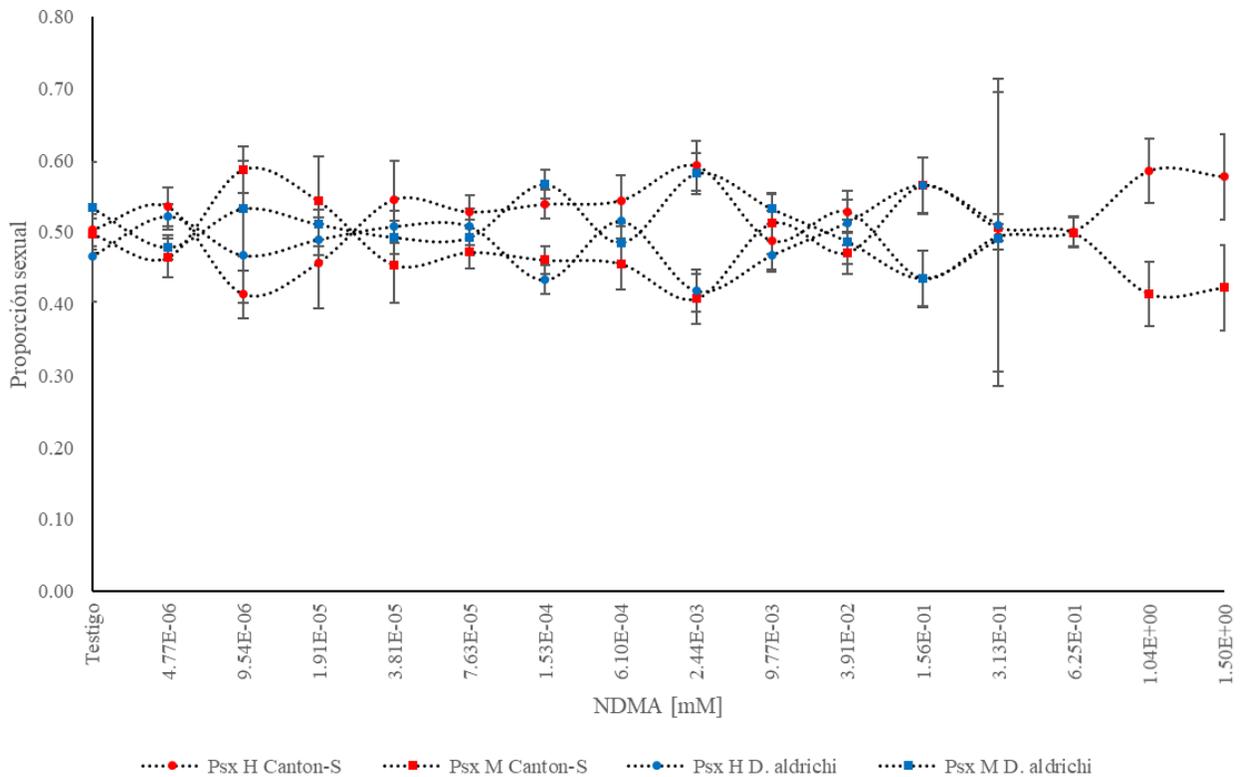


Fig. 6.2 Proporción sexual promedio de las moscas recobradas Canton-S y *D. aldrichi* expuestas a NDMA.

6.1.1.1 Interrupción del ciclo de vida de las moscas en diferentes puntos por exposición a NDMA

Al igual que en la única concentración letal para *D. melanogaster* (5 mM), en las tres concentraciones letales más bajas para *D. aldrichi* (6.25 E-01 mM, 1.04 mM y 1.5 mM) los organismos no emergieron de la pupa (Fig. 6.3, izquierda); mientras que en la concentración letal más alta (5 mM), las larvas de *D. aldrichi* ascendieron por las paredes de los tubos, pero no puparon (Fig. 6.3, derecha). Estos resultados sugieren que la exposición a una concentración letal de NDMA para los organismos detiene en distintos puntos el ciclo de vida en *Drosophila* y el momento en el que ocurrió la interrupción depende directamente de la concentración del compuesto (cantidad biológicamente activa), ya que con el incremento en la concentración de NDMA la muerte de las moscas ocurrió en un punto más temprano de su ciclo.

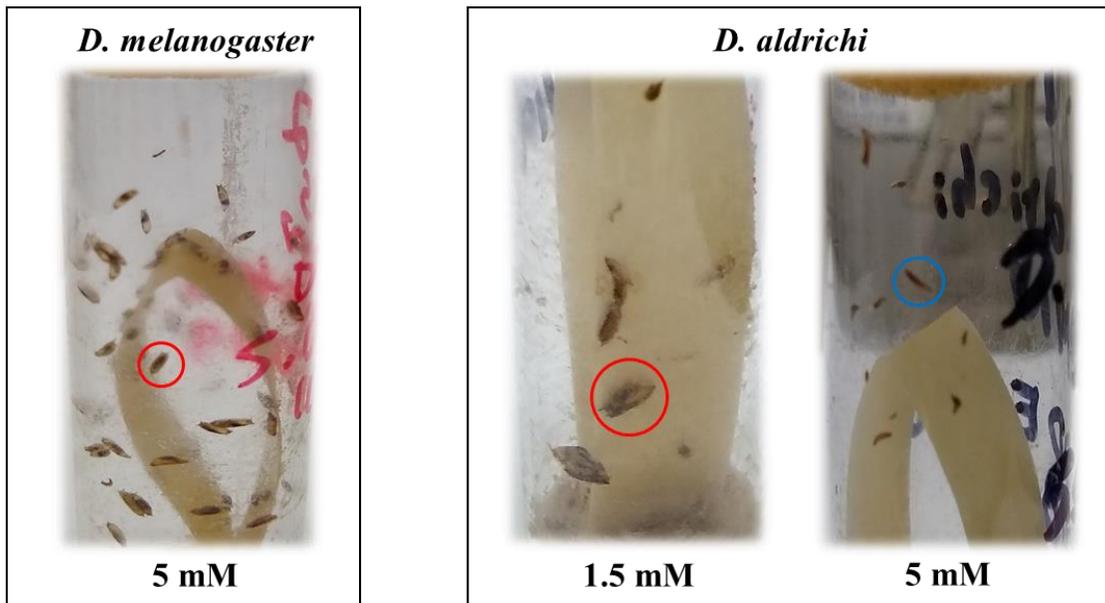


Fig. 6.3 Interrupción del ciclo de vida de *Drosophila* en diferentes momentos por la exposición a NDMA. Círculos rojos, pupas; círculo azul, larva.

6.1.2 Modificaciones en el tiempo de desarrollo de las moscas *D. melanogaster* y *D. aldrichi*

La tabla 3 recopila la distribución de frecuencias relativas y acumuladas para la cantidad de moscas del total que se recobraron por conteo. En las figuras 6.4 y 6.5 se muestran las gráficas de frecuencias relativas acumuladas (ojivas) para *D. melanogaster* y *D. aldrichi*, respectivamente; o sea, en cada concentración y el testigo cuánto del total de organismos recobrados (en proporción) se acumuló respecto al número de lecturas realizadas (conteo de moscas).

Para *D. melanogaster* se realizaron tres lecturas y únicamente en la concentración menor, 4.77 E-06 mM, se alcanzó el total de individuos en los días 16 y 17 postsincronización, tal como lo hizo el testigo. En las siguientes cuatro concentraciones se recuperaron entre el 22.39 y 33.48% del total de moscas en el conteo número dos, y de la concentración 1.53 E-04 mM en adelante la totalidad de organismos se recobraron en la última lectura (Tabla 3 y Fig. 6.4). Esto último implica que a partir de ese punto los individuos emergieron con un retraso de entre tres y cinco días, respecto al testigo y a las tres concentraciones más bajas. Con lo descrito anteriormente se evidencia que la NDMA tiende a retrasar el desarrollo en *D. melanogaster* y que este efecto se acentúa al incrementar la concentración.

Por otro lado, en *D. aldrichi* se realizaron seis lecturas y los resultados indican que la respuesta por la exposición a NDMA tiende a ser dual: por una parte se observó una aceleración en el desarrollo de los organismos en las tres concentraciones más altas (3.91 E-02 mM, 1.56 E-01 mM y 3.13 E-01 mM) y en 3.81 E-05 mM, y por otra parte pudo notarse un retraso en el desarrollo también en las concentraciones mayores, como sucedió con *D. melanogaster*, que se intensificó en las cinco últimas concentraciones (Tabla 3 y Fig. 6.5).

Cabe enfatizar que la aceleración del desarrollo ocurrió exactamente en las cuatro concentraciones sobre *D. aldrichi* donde la sobrevivencia promedio fue menor (Fig. 6.1) y que justo después de dicha aceleración, en las tres concentraciones más altas, hubo un periodo de al menos cinco días en los que no emergieron moscas. Por último, estos resultados señalan que la NDMA afecta el tiempo de desarrollo tanto de *D. melanogaster* como de *D. aldrichi*.

Tabla 3. Frecuencias relativas y acumuladas de la cantidad de moscas por conteo.

		Canton-S						<i>D. aldrichi</i>												
		hi			Hi			hi						Hi						
NDMA [mM]	N	L1	L2	L3	L1	L2	L3	N	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L1	L2	L3	L4	L5	L6
Testigo	248	0.56	0.44	0	0.56	1	1	283	0.16	0.06	0.10	0.38	0.29	0	0.16	0.22	0.33	0.71	1	1
4.77E-06	278	0.49	0.51	0	0.49	1	1	247	0.16	0.02	0.15	0.42	0.26	0	0.16	0.17	0.32	0.74	1	1
9.54E-06	221	0.19	0.33	0.47	0.19	0.53	1	230	0.12	0.01	0.11	0.43	0.32	0	0.12	0.13	0.25	0.68	1	1
1.91E-05	177	0.25	0.22	0.53	0.25	0.47	1	310	0.14	0.04	0.09	0.32	0.41	0	0.14	0.18	0.27	0.59	1	1
3.81E-05	241	0	0.29	0.71	0	0.29	1	175	0.21	0.07	0.20	0.38	0.14	0	0.21	0.28	0.48	0.86	1	1
7.63E-05	259	0	0.22	0.78	0	0.22	1	319	0.14	0.03	0.10	0.28	0.45	0	0.14	0.18	0.27	0.55	1	1
1.53E-04	241	0	0	1	0	0	1	358	0.13	0.05	0.11	0.29	0.41	0	0.13	0.18	0.29	0.59	1	1
6.10E-04	199	0	0	1	0	0	1	371	0.13	0.06	0.10	0.29	0.36	0.06	0.13	0.19	0.29	0.58	0.94	1
2.44E-03	213	0	0	1	0	0	1	361	0.08	0.07	0.09	0.35	0.21	0.20	0.08	0.15	0.24	0.59	0.80	1
9.77E-03	246	0	0	1	0	0	1	342	0.12	0.03	0.11	0.38	0	0.36	0.12	0.15	0.25	0.64	0.64	1
3.91E-02	227	0	0	1	0	0	1	91	0.12	0.18	0.44	0	0	0.26	0.12	0.30	0.74	0.74	0.74	1
1.56E-01	235	0	0	1	0	0	1	62	0.29	0.23	0.16	0	0	0.32	0.29	0.52	0.68	0.68	0.68	1
3.13E-01	219	0	0	1	0	0	1	25	0.28	0.28	0.24	0	0	0.20	0.28	0.56	0.80	0.80	0.80	1
6.25E-01	218	0	0	1	0	0	1	0												
1.04E+00	136	0	0	1	0	0	1	0												
1.50E+00	65	0	0	1	0	0	1	0												
5.00E+00	0							0												

N, total de moscas; hi, frecuencia relativa; Hi, frecuencia relativa acumulada; L1 – L6, número de lecturas (conteo de moscas).

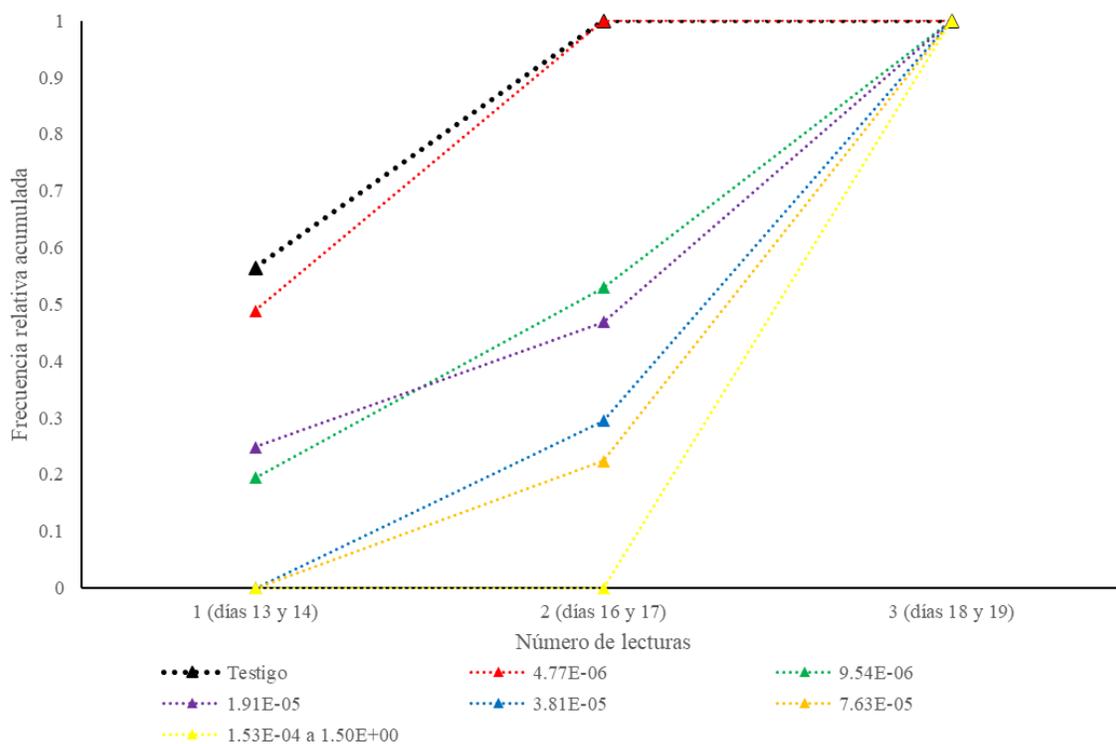


Fig. 6.4 Ojiva de frecuencias relativas que muestra el retraso en el desarrollo de *D. melanogaster* por la exposición a NDMA. En el eje de abscisas, entre paréntesis, se muestra el día en el que se realizaron los conteos en el experimento uno y dos, respectivamente.

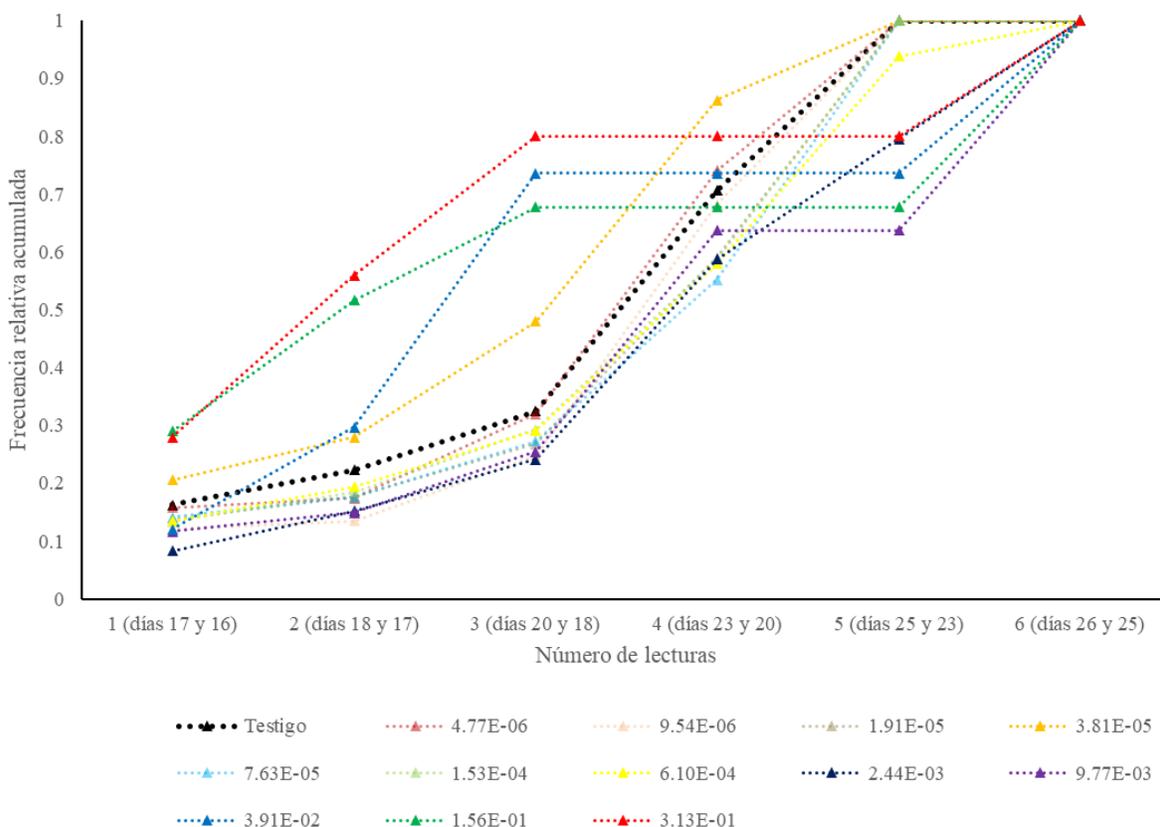


Fig. 6.5 Ojiva de frecuencias relativas que muestra tanto la aceleración como el retraso en el desarrollo de *D. aldrichi* por la exposición a NDMA. En el eje de abscisas, entre paréntesis, se muestra el día en el que se realizaron los conteos en el experimento uno y dos, respectivamente.

6.1.3 Malformaciones en la terminalia de *D. aldrichi*

En *Drosophila*, la terminalia comprende el conjunto completo de genitales internos y externos (genitalia), con la excepción de las gónadas, e incluyen el intestino grueso y las estructuras anales (analia) (Gorfinkiel *et al.*, 1999).

Ahora bien, durante los experimentos se observaron malformaciones externas en los adultos de *D. aldrichi* que fueron expuestos a la NDMA durante el tercer estadio larval. Estas se centraron en la terminalia e incluyeron placas giradas con respecto a la posición regular, evertidas, “tipo trompeta”, y protuberancias en general (Fig. 6.6). Estas malformaciones se encontraron únicamente en las cuatro concentraciones más altas previas a la letalidad (9.77 E-03 mM, 3.91 E-02 mM, 1.56 E-01 mM y 3.13 E-01 mM); sin embargo, fue en las tres últimas donde las moscas, sin importar su sexo, se vieron afectadas en mayor proporción (Tabla 4; Fig. 6.7). Además, se observó un cambio notable al pasar de la concentración 9.77 E-03 mM a 3.91 E-02 mM en el que los organismos con

terminalia externa afectada se incrementaron de 4.79 a 52.02%, siendo la concentración más alta en donde se recobró el mayor porcentaje de individuos malformados (75.38%) (Tabla 4). Estos resultados sugieren que la NDMA induce malformaciones en *D. aldrichi* específicamente sobre la terminalia.

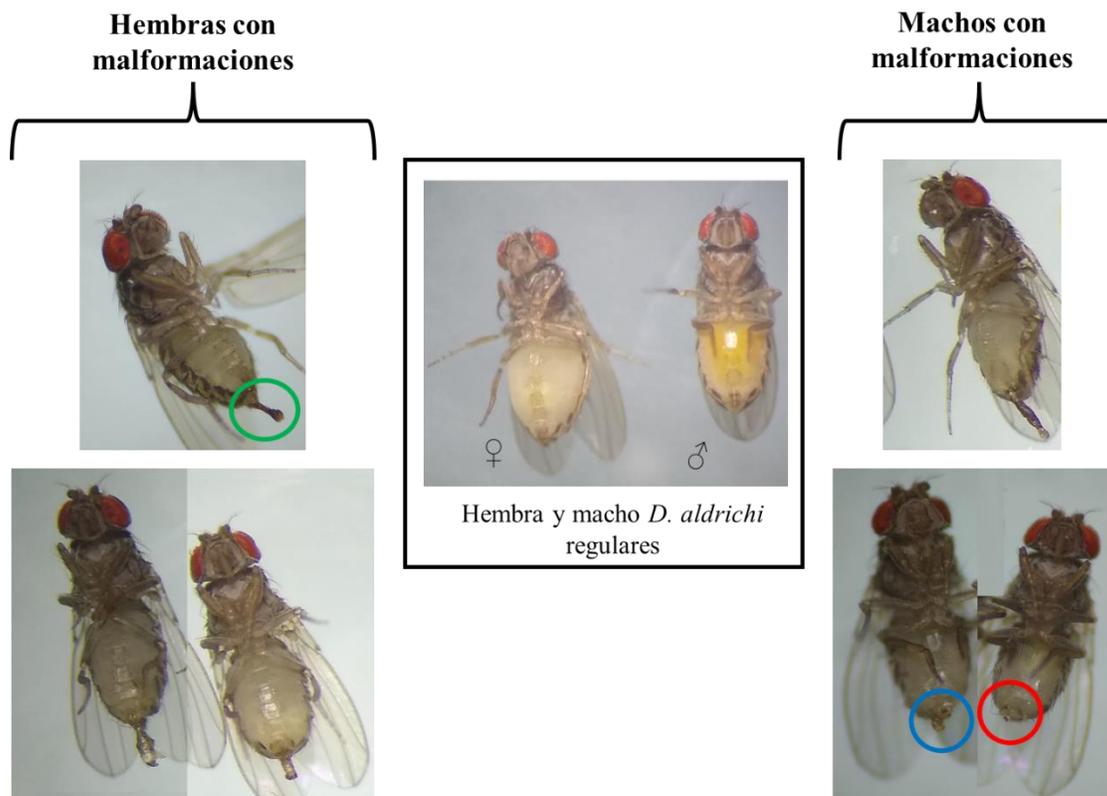


Fig. 6.6 Malformaciones en la terminalia externa de las moscas *D. aldrichi* tratadas (imágenes estereoscópicas ventrales). “Tipo trompeta” en hembra (círculo verde), placa evertida y girada (círculo azul) y solamente girada en machos (círculo rojo).

Tabla 4. Proporción promedio de moscas *D. aldrichi* con malformaciones.

NDMA [mM]	N	H ± ee	M ± ee	T ± ee
Testigo	283	0	0	0
9.77E-03	342	0.08 ± 0.05	0.02 ± 0.01	0.05 ± 0.03
3.91E-02	91	0.59 ± 0.03	0.44 ± 0.03	0.52 ± 0.03
1.56E-01	62	0.53 ± 0.09	0.71 ± 0.08	0.61 ± 0.08
3.13E-01	25	0.77 ± 0.12	0.57 ± 0.23	0.75 ± 0.15

N, número de individuos; H, hembras; M, machos; T, total; ee, error estándar.

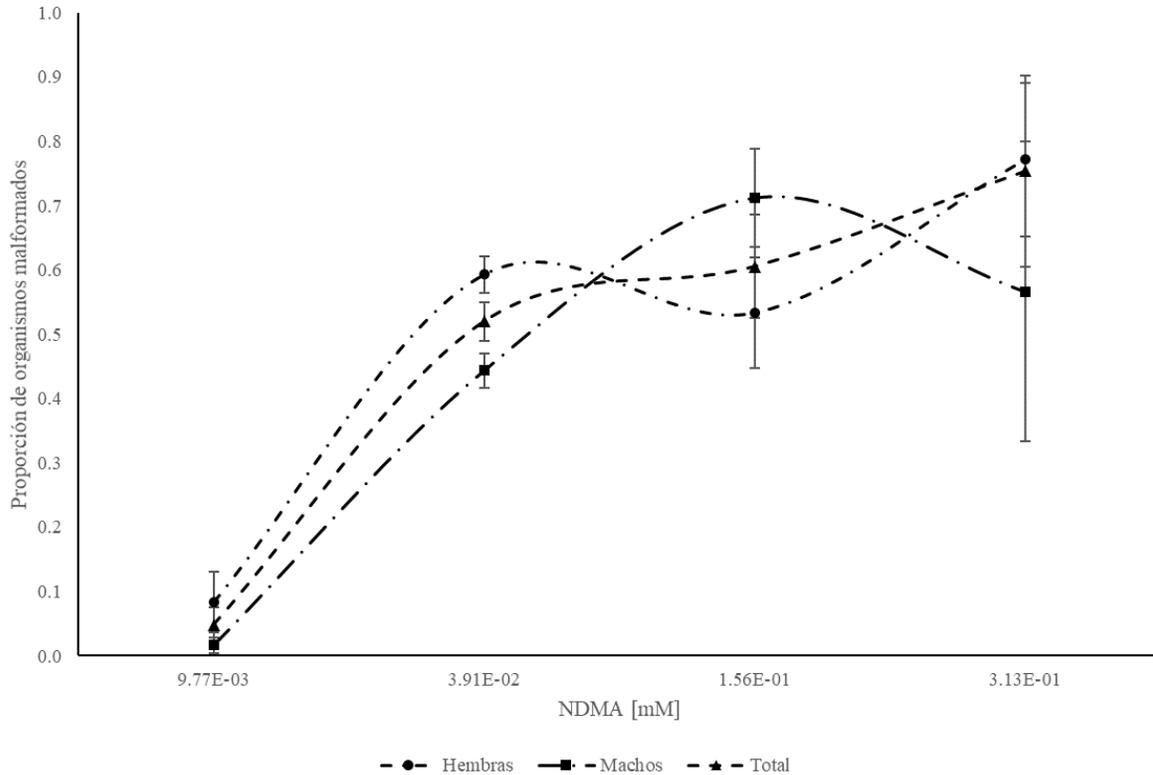


Fig. 6.7 Proporción promedio de moscas *D. aldrichi* expuestas a NDMA con malformaciones en las placas genital y anal.

6.1.3.1 Rotación de la genitalia en machos *D. aldrichi*

Debido a la presencia de *claspers* en los machos (par de apéndices que les sirven para sostener a la hembra durante la cópula) (Fig. 6.8), fue posible determinar que hubo rotación de la genitalia externa de algunos individuos. Además, en estos organismos malformados los giros de la placa genital abarcaron la placa anal, es decir, la terminalia externa rotó como conjunto y no separadamente (Fig. 6.9). Estos resultados indican que la NDMA interfiere con el posicionamiento regular de la genitalia y analia externas en *D. aldrichi*.



Fig. 6.8 Terminalia externa de un macho *D. aldrichi*. Placas genital (círculo azul) y anal (círculo rojo). Vista estereoscópica de la parte posterior del abdomen en posición ventral. En la genitalia se observan dos apéndices de color negro que corresponden a los *claspers*.

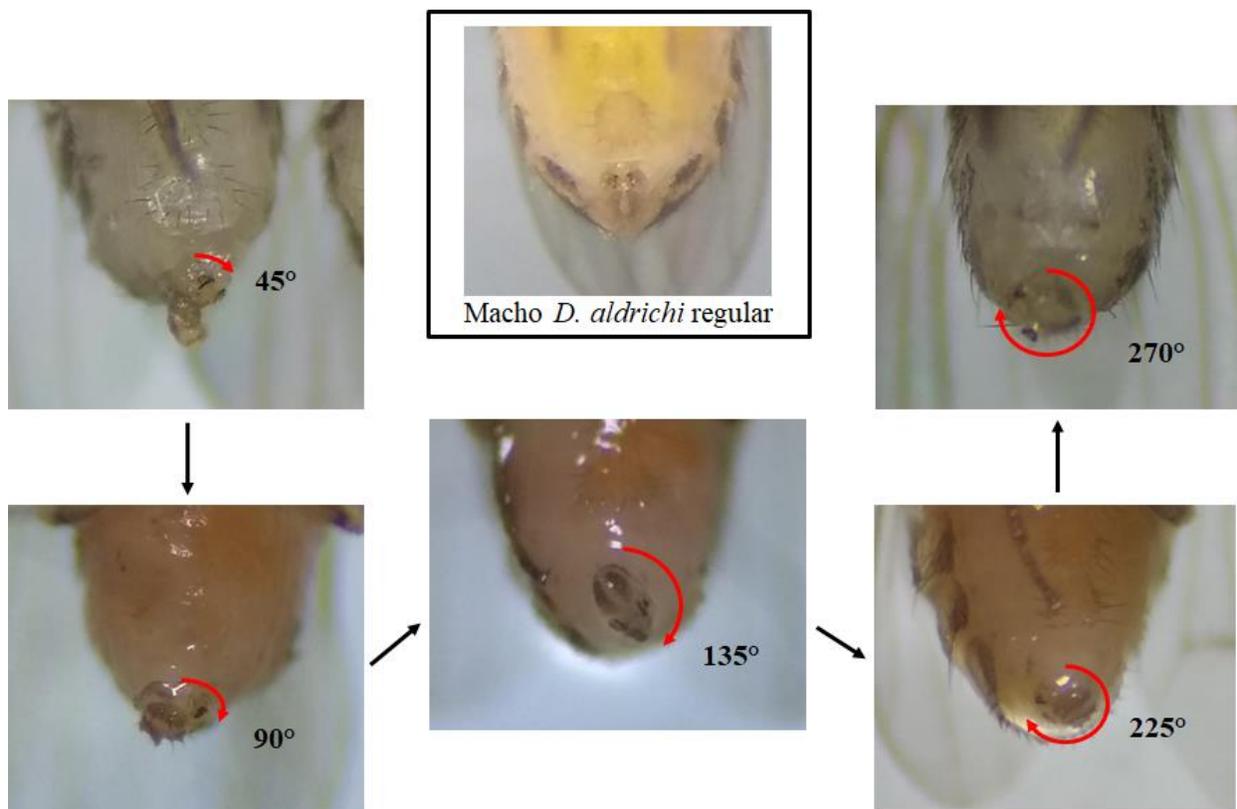


Fig. 6.9 Rotaciones de la terminalia externa encontradas en machos de *D. aldrichi* expuestos a NDMA (imágenes estereoscópicas del abdomen en posición ventral). Nótese que en la secuencia la diferencia de los ángulos entre un giro y el siguiente es de 45°. No se observaron rotaciones de 180°.

6.1.4 Capacidad reproductiva de las moscas progenitoras expuestas a NDMA

En la tabla 5 se muestran los biomarcadores de fertilidad y cantidad de progenie promedio que valoran si la capacidad reproductiva de las moscas progenitoras expuestas fue afectada por el tratamiento con NDMA, mediante los tres sistemas de cruce: únicamente hembras tratadas (H t x M nt), solo machos tratados (H nt x M t) y ambos progenitores tratados (H t x M t).

Como se muestra en la figura 6.10, en la generación de progenitores expuestos a NDMA se encontró infertilidad en los tres sistemas de cruce, esto es, cuando se trató solo a la hembra (H t x M nt), únicamente al macho (H nt x M t) o a ambos (H t x M t). De hecho, el comportamiento fue similar en cuanto a los tratamientos experimentales donde los parentales no dejaron descendencia: cuando se expuso al macho (H nt x M t y H t x M t) la fertilidad fue de cero en dos de las doce concentraciones en las que se sembraron moscas (16.67%), y en tres (25%) cuando solamente la hembra fue tratada.

Ahora bien, considerando solo los tratamientos experimentales con fertilidad distinta de cero, este biomarcador fue menor que el testigo en la mayoría de las concentraciones del sistema H t x M t, excepto en 1.91 E-05 mM, 3.81 E-05 mM y 7.63 E-05 mM (Fig. 6.10); además, esta disminución fue significativa en las concentraciones 9.54 E-06 mM ($z = 2.543, p = 0.0110$) y 9.77 E-03 mM ($z = 2.239, p = 0.0252$). En cambio, la fertilidad en las cruzas donde se expuso a uno de los parentales (H nt x M t y H t x M nt) mostró una tendencia a incrementar con respecto a sus testigos en la mayoría de las concentraciones de NDMA, con excepción de las concentraciones 4.77 E-06 mM y 9.54 E-06 mM en el esquema H nt x M t y las concentraciones 3.81 E-05 mM, 6.10 E-04 mM y 2.44 E-03 mM en el sistema H t x M nt (Fig. 6.10); sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas.

Al comparar los tres esquemas de cruce, la fertilidad del sistema H t x M t se diferenció significativamente de los otros dos desde la concentración 1.91 E-05 mM a 7.63 E-05 mM ($z, p < 0.05$), también, en relación con la cruce H nt x M t en la concentración 4.77 E-06 mM ($z = 3.486, p = 0.0005$) y con el sistema H t x M nt en 2.44 E-03 mM ($z = 2.278, p = 0.0227$). Por su parte, los esquemas de cruce H nt x M t y H t x M nt no se diferenciaron significativamente en ninguna concentración para dicho biomarcador.

Tabla 5. Capacidad reproductiva de los progenitores expuestos a NDMA.

Sistema de cruza	NDMA [mM]	n	F	d ^a	N	PF ± ee	d ^b	Psx H ± ee	Psx M ± ee	d ^b
H t x M t	Testigo	20	0.75	-	303	20.20 ± 2.18	-	0.56 ± 0.03	0.44 ± 0.03	-
	4.77E-06	20	0.65	-	173	13.31 ± 1.84	-	0.35 ± 0.03	0.65 ± 0.03	*
	9.54E-06	20	0.35	*	68	9.71 ± 2.04	-	0.60 ± 0.07	0.40 ± 0.07	-
	1.91E-05	15	0.80	-	263	21.92 ± 4.31	-	0.51 ± 0.04	0.49 ± 0.04	-
	3.81E-05	20	0.85	-	203	11.94 ± 1.12	-	0.40 ± 0.03	0.60 ± 0.03	*
	7.63E-05	15	0.80	-	171	14.25 ± 2.89	-	0.46 ± 0.04	0.54 ± 0.04	-
	1.53E-04	20	0.55	-	192	17.45 ± 4.33	-	0.40 ± 0.03	0.60 ± 0.03	*
	6.10E-04	14	0.57	-	190	23.75 ± 9.53	-	0.61 ± 0.04	0.39 ± 0.04	-
	2.44E-03	20	0.50	-	141	14.10 ± 2.88	-	0.74 ± 0.03	0.26 ± 0.03	*
	9.77E-03	20	0.40	*	122	15.25 ± 1.88	-	0.73 ± 0.03	0.27 ± 0.03	*
	3.91E-02	3	0.33	-	22	22.00		0.55	0.45	
	1.56E-01	2	0.00		0	0.00				
	3.13E-01	2	0.00		0	0.00				
H nt x M t	Testigo	20	0.15	-	56	18.67 ± 3.18	-	0.41 ± 0.01	0.59 ± 0.01	-
	4.77E-06	15	0.07	-	10	10.00		0.60	0.40	
	9.54E-06	15	0.13	-	21	10.50 ± 1.50	-	0.47 ± 0.03	0.53 ± 0.03	-
	1.91E-05	20	0.30	-	50	8.33 ± 1.86	-	0.47 ± 0.07	0.53 ± 0.07	-
	3.81E-05	15	0.33	-	116	23.20 ± 7.43	-	0.49 ± 0.05	0.51 ± 0.05	-
	7.63E-05	15	0.27	-	28	7.00 ± 0.91	-	0.58 ± 0.07	0.42 ± 0.07	-
	1.53E-04	15	0.40	-	59	9.83 ± 1.08	-	0.59 ± 0.06	0.41 ± 0.06	-
	6.10E-04	11	0.36	-	41	10.25 ± 1.70	-	0.64 ± 0.07	0.36 ± 0.07	-
	2.44E-03	11	0.36	-	39	9.75 ± 1.38	-	0.41 ± 0.02	0.59 ± 0.02	-
	9.77E-03	11	0.45	-	76	15.20 ± 1.50	-	0.47 ± 0.06	0.53 ± 0.06	-
	3.91E-02	3	0.33	-	17	17.00		0.53	0.47	
	1.56E-01	2	0.00		0	0.00				
	3.13E-01	2	0.00		0	0.00				
H t x M nt	Testigo	16	0.25	-	107	26.75 ± 6.50	-	0.53 ± 0.01	0.47 ± 0.01	-
	4.77E-06	6	0.00		0	0.00				
	9.54E-06	7	0.29	-	88	44.00 ± 3.00	-	0.47 ± 0.04	0.53 ± 0.04	-
	1.91E-05	14	0.43	-	251	41.83 ± 13.28	-	0.58 ± 0.03	0.42 ± 0.03	-
	3.81E-05	8	0.25	-	85	42.50 ± 0.50	-	0.59 ± 0.05	0.41 ± 0.05	-
	7.63E-05	13	0.38	-	41	8.20 ± 1.77	-	0.57 ± 0.08	0.43 ± 0.08	-
	1.53E-04	11	0.36	-	47	11.75 ± 2.25	-	0.48 ± 0.07	0.52 ± 0.07	-
	6.10E-04	4	0.25	-	51	51.00		0.45	0.55	
	2.44E-03	11	0.09	-	33	33.00		0.48	0.52	
	9.77E-03	2	0.50	-	24	24.00		0.54	0.46	
	3.91E-02	3	0.33	-	41	41.00		0.59	0.41	
	1.56E-01	2	0.00		0	0.00				
	3.13E-01	2	0.00		0	0.00				

H t x M t (ambos progenitores tratados), H nt x M t (machos tratados) y H t x M nt (hembras tratadas); n, número de parejas; F, fertilidad de los parentales (P); N, total de moscas recobradas (progenie de todas las parejas); PF, progenie promedio por familia de P (F₁); Psx H, proporción sexual promedio de hembras en la progenie F₁; Psx M, proporción sexual promedio de machos en la progenie F₁; ee, error estándar; d,

diagnóstico estadístico: a, prueba de Z para proporciones; b, prueba de ANOVA de una vía; *, indica diferencias significativas respecto al testigo ($p < 0.05$); -, señala que no se encontraron diferencias. Los valores de PF, Psx H y Psx M, distintos de cero, sin errores estándar indican que en esas concentraciones no se pudieron obtener promedios porque solo se recobró progenie adulta de una pareja.

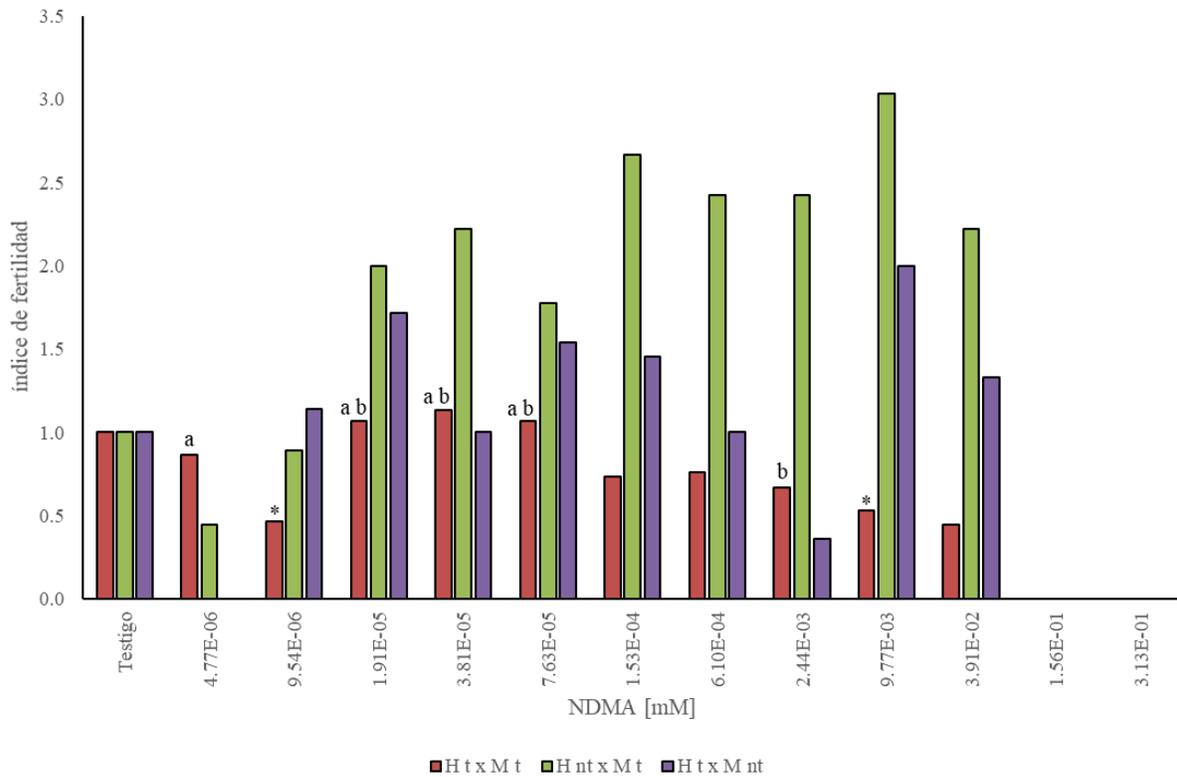


Fig. 6.10 Índices de fertilidad de las moscas *D. aldrichi* progenitoras expuestas a NDMA de los tres sistemas de cruce: H t x M t (ambos parentales tratados), H nt x M t (solo machos tratados) y H t x M nt (únicamente hembras tratadas). Z para proporciones: *, indica diferencias significativas con el testigo ($p < 0.05$); a, diferencias significativas entre las cruces H t x M t y H nt x M t; b, diferencias significativas entre los sistemas H t x M t y H t x M nt. No se detectaron diferencias significativas entre los esquemas H nt x M t y H t x M nt.

La cantidad de progenie de los parentales expuestos (generación F₁) no presentó diferencias significativas respecto a los testigos en ninguno de los tres esquemas de cruce: H t x M t ($F_{9,103} = 1.599$, $p = 0.1253$), H nt x M t ($F_{8,30} = 2.774$, $p = 0.0201$; Dunnett, $p \geq 0.1733$) y H t x M nt ($F_{5,17} = 2.906$, $p = 0.0449$; Dunnett, $p \geq 0.4607$); no obstante, en la mayoría de los tratamientos experimentales la cantidad de progenie adulta promedio de los sistemas donde se expuso al macho (H nt x M t y H t x M t) fue menor que en el testigo, salvo la concentración 3.81 E-05 mM en el sistema H nt x M t y las concentraciones 1.91 E-05 mM, 6.10 E-04 mM y 3.91 E-02 mM en el esquema H t x M t (Fig. 6.11). En cambio, la cantidad de progenie de la cruce donde se trató

únicamente a la hembra (H t x M nt) mostró una tendencia a ser mayor que el testigo, excepto en las concentraciones 7.63 E-05 mM, 1.53 E-04 mM y 9.77 E-03 mM (Fig. 6.11).

Por otra parte, al comparar la progenie promedio por familia F₁ de los tres sistemas, fue mayor en la cruce donde se expuso solamente a la hembra con excepción de las concentraciones 7.63 E-05 mM y 1.53 E-04 mM (Fig. 6.11). Las diferencias significativas solo se encontraron en las concentraciones menores de NDMA. Se recobró menos progenie de las cruces H t x M t y H nt x M t en relación con el sistema H t x M nt en las concentraciones 9.54 E-06 mM ($F_{10,105} = 3.782$, $p = 0.0002$; Tukey, $p = 0.0012$, $p = 0.0140$) y 1.91 E-05 mM ($F_{5,105} = 4.849$, $p = 0.0005$; Tukey, $p = 0.0027$, $p < 0.0001$). Además, el sistema H t x M t presentó menos cantidad de progenie que la cruce H t x M nt en la concentración 3.81 E-05 mM ($F_{2,105} = 11.9$, $p < 0.0001$; Tukey, $p = 0.0020$). No hubo diferencias significativas en la progenie por familia entre los sistemas de cruce donde se trató al macho (H nt x M t y H t x M t) en ninguna concentración.

En cuanto a la proporción sexual de la progenie F₁, mostró diferencias en comparación con su testigo únicamente en el sistema H t x M t (Tabla 5). En las concentraciones 2.44 E-03 mM y 9.77 E-03 mM se favorecieron las hembras ($F_{9,103} = 14.76$, $p < 0.0001$; Dunnett, $p = 0.0035$, $p = 0.0105$) y en las concentraciones 4.77 E-06 mM, 3.81 E-05 mM y 1.53 E-04 mM los machos ($F_{9,103} = 14.76$, $p < 0.0001$; Dunnett, $p < 0.05$).

Estos resultados sugieren que existe una respuesta en la capacidad reproductiva de *D. aldrichi* de los organismos expuestos a NDMA, pero no es diferencial entre hembras y machos. Esto último debido a que la aparición de tratamientos infértiles es similar sin importar cual parental fue tratado y a que las tendencias de los biomarcadores se contraponen: la fertilidad es mayor cuando los progenitores expuestos son los machos y menor cuando las hembras son tratadas, pero la cantidad de progenie es menor al exponer a los machos y mayor al tratar a las hembras (Fig. 6.12).

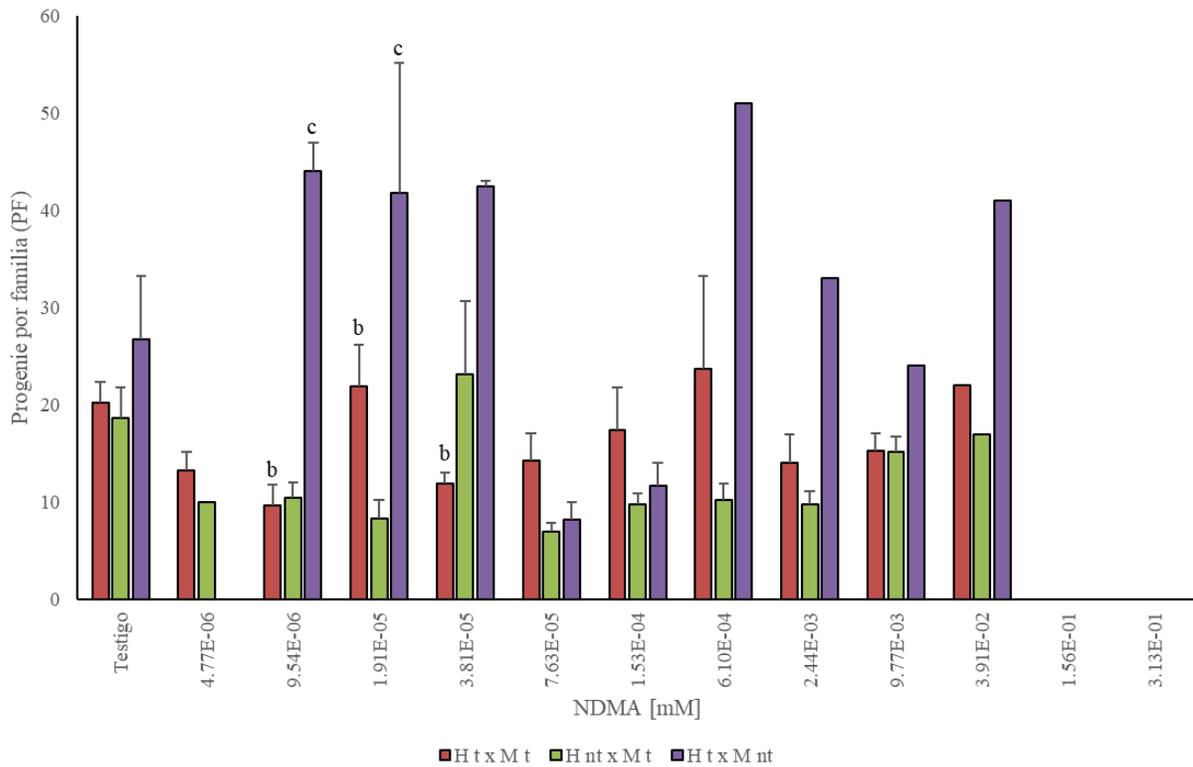


Fig. 6.11 Progenie promedio por familia de los parentales *D. aldrichi* expuestos a NDMA de los tres sistemas de cruce: H t x M t (ambos parentales tratados), H nt x M t (solo machos tratados) y H t x M nt (únicamente hembras tratadas). No se encontraron diferencias significativas en relación con los testigos. ANOVA de dos vías: no se detectaron diferencias significativas entre las cruces H t x M t y H nt x M t; b, indica diferencias significativas entre los sistemas H t x M t y H t x M nt; c, diferencias significativas entre los esquemas H nt x M t y H t x M nt.

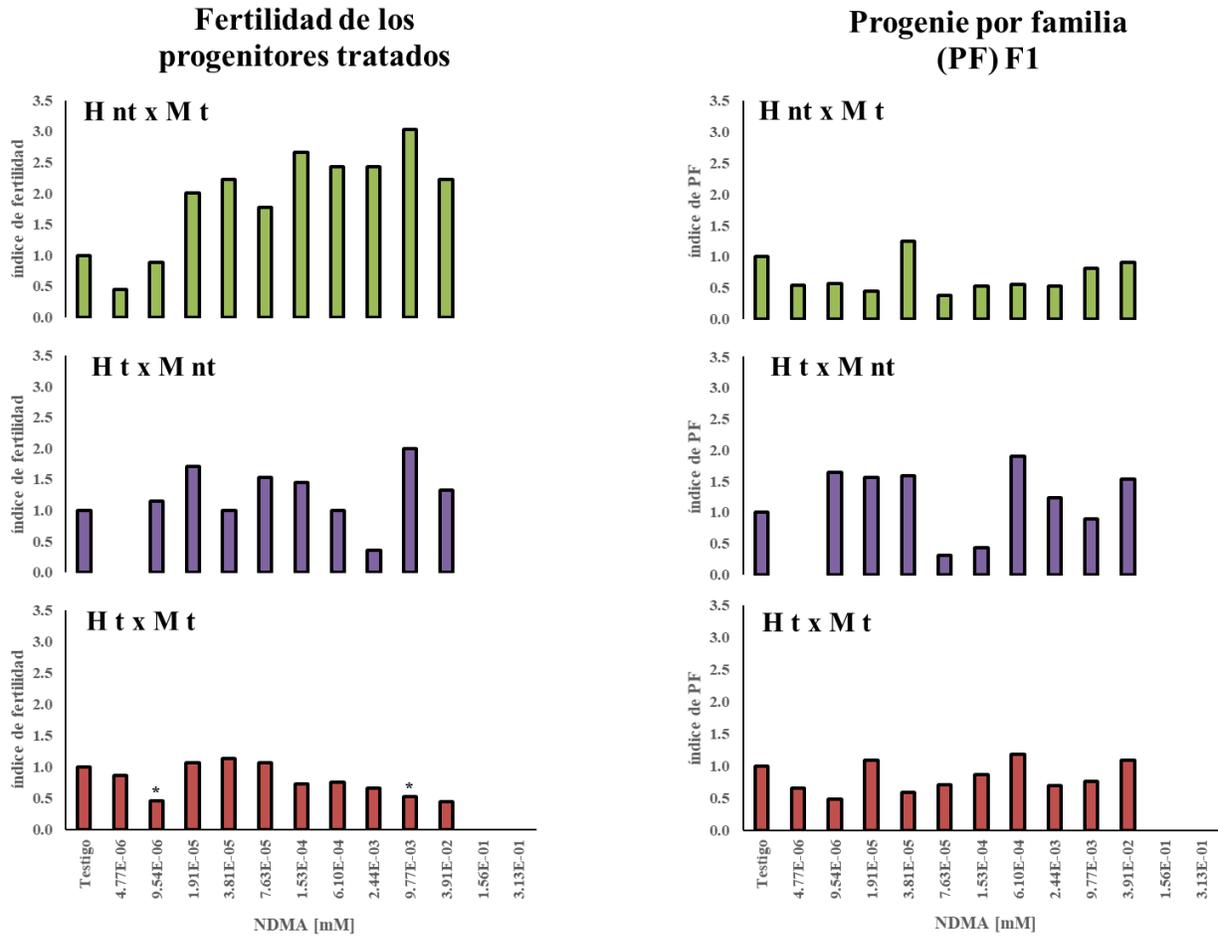


Fig. 6.12 Comparación de los biomarcadores para capacidad reproductiva de los progenitores *D. aldrichi* expuestos a NDMA. Fertilidad de P (izquierda) y progenie promedio por familia F₁ (derecha) de los tres sistemas de cruce: H nt x M t (solo machos tratados), H t x M nt (únicamente hembras tratadas) y H t x M t (ambos parentales tratados). *, indica diferencias significativas con el testigo ($p < 0.05$).

6.1.5 Capacidad reproductiva de los descendientes F₁ y F₂ no expuestos a NDMA

En la tabla 6 se presentan los biomarcadores de fertilidad y cantidad de progenie promedio que estiman si se afectó la capacidad reproductiva de las moscas F₁ no expuestas pero que proceden de uno o ambos progenitores tratados con NDMA.

Tabla 6. Capacidad reproductiva de las moscas F₁ no expuestas procedentes de parentales tratados con NDMA.

Sistema de cruza	NDMA [mM]	n	F	d ^a	N	PF ± ee	d ^b	Psx H ± ee	Psx M ± ee	d ^b
H t x M t	Testigo	20	0.30	-	107	17.83 ± 3.86	-	0.52 ± 0.13	0.48 ± 0.13	-
	4.77E-06	20	0.25	-	88	17.60 ± 6.71	-	0.55 ± 0.06	0.45 ± 0.06	-
	9.54E-06	20	0.55	-	302	27.45 ± 7.06	-	0.47 ± 0.06	0.53 ± 0.06	-
	1.91E-05	15	0.47	-	180	25.71 ± 7.20	-	0.47 ± 0.10	0.53 ± 0.10	-
	3.81E-05	20	0.75	*	271	18.07 ± 4.01	-	0.45 ± 0.05	0.55 ± 0.05	-
	7.63E-05	15	0.33	-	196	39.20 ± 11.98	-	0.46 ± 0.05	0.54 ± 0.05	-
	1.53E-04	20	0.60	-	399	33.25 ± 7.81	-	0.51 ± 0.03	0.49 ± 0.03	-
	6.10E-04	14	0.36	-	81	16.20 ± 3.89	-	0.30 ± 0.08	0.70 ± 0.08	-
	2.44E-03	20	0.00	-	0	0.00	-	-	-	-
	9.77E-03	20	0.40	-	231	28.88 ± 6.76	-	0.48 ± 0.04	0.52 ± 0.04	-
	3.91E-02	10	0.00	-	0	0.00	-	-	-	-
H nt x M t	Testigo	20	0.30	-	73	12.17 ± 3.94	-	0.55 ± 0.09	0.45 ± 0.09	-
	4.77E-06	2	0.00	-	0	0.00	-	-	-	-
	9.54E-06	5	0.80	*	101	25.25 ± 5.85	-	0.36 ± 0.09	0.64 ± 0.09	-
	1.91E-05	13	0.08	-	25	25.00	-	0.44	0.56	-
	3.81E-05	11	0.00	-	0	0.00	-	-	-	-
	7.63E-05	7	0.00	-	0	0.00	-	-	-	-
	1.53E-04	10	0.50	-	148	29.60 ± 11.67	-	0.51 ± 0.03	0.49 ± 0.03	-
	6.10E-04	7	0.71	-	168	33.60 ± 11.59	-	0.48 ± 0.03	0.52 ± 0.03	-
	2.44E-03	3	0.67	-	69	34.50 ± 30.50	-	0.61 ± 0.14	0.39 ± 0.14	-
	9.77E-03	5	0.00	-	0	0.00	-	-	-	-
	3.91E-02	7	0.00	-	0	0.00	-	-	-	-
H t x M nt	Testigo	20	0.45	-	166	18.44 ± 6.15	-	0.59 ± 0.07	0.41 ± 0.07	-
	9.54E-06	10	0.00	-	0	0.00	-	-	-	-
	1.91E-05	15	0.07	*	18	18.00	-	0.44	0.56	-
	3.81E-05	7	0.00	-	0	0.00	-	-	-	-
	7.63E-05	14	0.21	-	44	14.67 ± 6.12	-	0.51 ± 0.08	0.49 ± 0.08	-
	1.53E-04	10	0.20	-	24	12.00 ± 4.00	-	0.50 ± 0.00	0.50 ± 0.00	-
	6.10E-04	5	0.00	-	0	0.00	-	-	-	-
	2.44E-03	10	0.00	-	0	0.00	-	-	-	-
	9.77E-03	10	0.00	-	0	0.00	-	-	-	-
	3.91E-02	5	0.00	-	0	0.00	-	-	-	-

H t x M t (ambos progenitores tratados), H nt x M t (machos tratados) y H t x M nt (hembras tratadas); n, número de parejas; F, fertilidad de la F₁; N, total de moscas recobradas (progenie de todas las parejas); PF, progenie promedio por familia de la F₁ (F₂); Psx H, proporción sexual promedio de hembras en la progenie F₂; Psx M, proporción sexual promedio de machos en la progenie F₂; ee, error estándar; d, diagnóstico estadístico: a, prueba de Z para proporciones; b, prueba de ANOVA de una vía; *, indica diferencias significativas respecto al testigo ($p < 0.05$); -, señala que no se encontraron diferencias. Los valores de PF, Psx H y Psx M, distintos de cero, sin errores estándar indican que en esas concentraciones no se pudieron obtener promedios porque solo se recobró progenie adulta de una pareja.

De los doce tratamientos experimentales con los que se inició cada esquema de cruce en la generación parental, se obtuvieron cinco con fertilidad igual a cero en la progenie F_1 del sistema donde solamente se trató al macho (41.67%), y seis en la descendencia F_1 resultante de la cruce donde el parental expuesto fue hembra (50%); mientras que en la progenie F_1 de ambos progenitores tratados no se recuperaron moscas en dos concentraciones (16.67%) (Fig. 6.13).

La fertilidad de la progenie F_1 procedente de los machos tratados (H t x M t y H nt x M t), teniendo en cuenta solo los tratamientos experimentales que no presentaron infertilidad, fue mayor que el testigo en la mayoría de las concentraciones salvo en 4.77 E-06 mM de la descendencia F_1 del esquema H t x M t y en la concentración 1.91 E-05 mM de las moscas F_1 de la cruce H nt x M t (Fig. 6.13); además, este aumento fue significativo en la concentración 3.81 E-05 mM ($z = 2.85$, $p = 0.0044$) de los descendientes F_1 del sistema H t x M t y en la concentración 9.54 E-06 mM ($z = 2.041$, $p = 0.0412$) de la progenie F_1 de la cruce H nt x M t. La fertilidad de la descendencia F_1 derivada del esquema donde únicamente las hembras fueron expuestas (H t x M nt), se redujo en relación con el testigo en todas las concentraciones de NDMA (Fig. 6.13); sin embargo, solamente se detectó una disminución estadísticamente significativa en la concentración 1.91 E-05 mM ($z = 2.484$, $p = 0.0130$).

Al comparar los tres sistemas de cruce, la fertilidad de las moscas F_1 provenientes de ambos progenitores tratados, fue significativamente mayor que la fertilidad de los descendientes F_1 de las cruces en las que la hembra o el macho fueron expuestos en la concentración 1.91 E-05 mM ($z = 2.277$, $p = 0.0228$; $z = 2.477$, $p = 0.0132$), y que la fertilidad de la progenie F_1 procedente de hembras tratadas en la concentración 1.53 E-04 mM ($z = 2.07$, $p = 0.0384$). Además, en ninguna de las concentraciones de NDMA hubo diferencias significativas en la fertilidad de la descendencia F_1 entre los sistemas de cruce en los que se expuso a uno de los parentales (H nt x M t y H t x M nt).

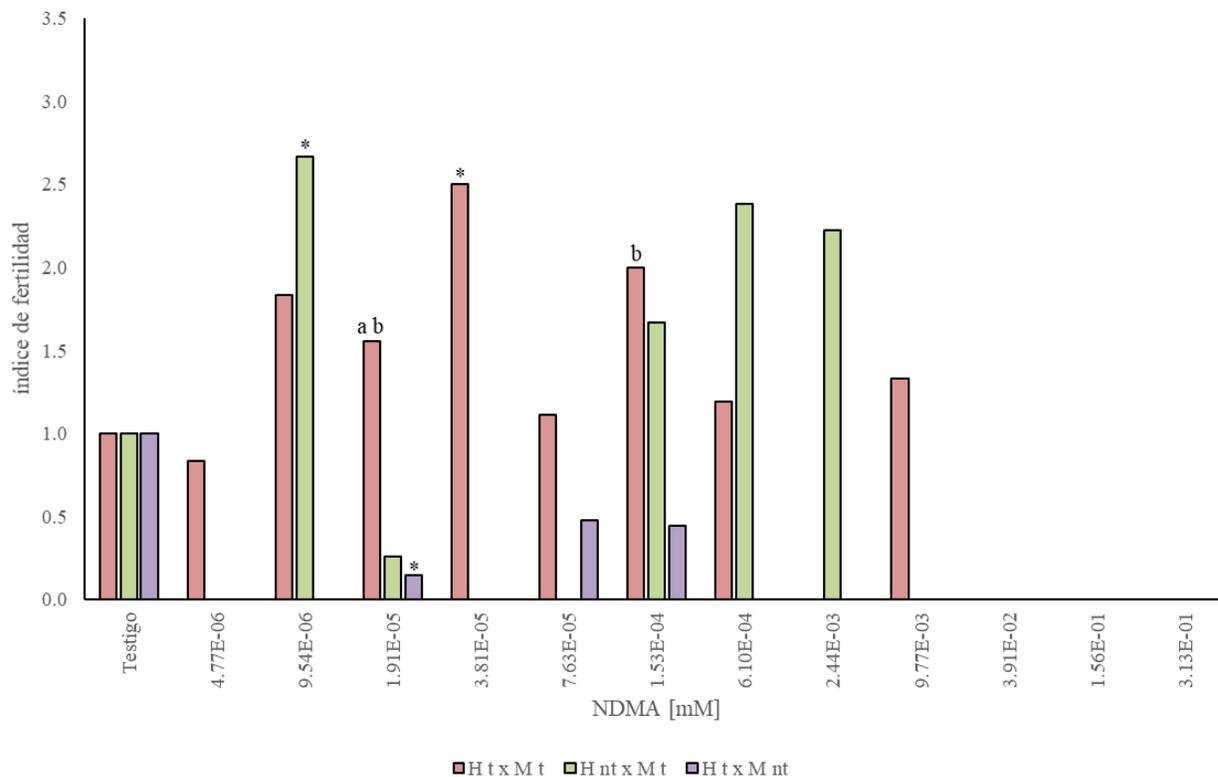


Fig. 6.13 Índices de fertilidad de la progenie F₁ procedente de parentales *D. aldrichi* expuestos a NDMA de los tres sistemas de cruce: H t x M t (ambos progenitores tratados), H nt x M t (solo machos tratados) y H t x M nt (únicamente hembras tratadas). Z para proporciones: *, indica diferencias significativas con el testigo ($p < 0.05$); a, diferencias significativas entre las cruces H t x M t y H nt x M t; b, diferencias significativas entre los sistemas H t x M t y H t x M nt.

La cantidad de progenie de la F₁ no expuesta (generación F₂) mostró un comportamiento similar al observado en la fertilidad de la F₁: la progenie promedio por familia de las moscas F₁ del esquema donde se expuso al macho (H nt x M t y H t x M t) fue mayor con respecto al testigo y menor cuando solo la hembra progenitora fue tratada (H t x M nt). Las únicas excepciones a esta tendencia se observaron en las concentraciones 4.77 E-06 mM y 6.10 E-04 mM de los descendientes F₂ del sistema H t x M t (Fig. 6.14). No obstante, en ninguna progenie F₂ derivada de cada esquema se confirmaron diferencias significativas en relación con el testigo: H t x M t ($F_{8,65} = 1.15$, $p = 0.3428$), H nt x M t ($F_{4,17} = 0.8556$, $p = 0.5099$) y H t x M nt ($F_{2,11} = 0.1551$, $p = 0.8581$).

La comparación de la cantidad de progenie F₂ de los tres sistemas no arrojó diferencias significativas en ninguna concentración ($F_{2,34} = 0.6064$, $p = 0.5511$). Por último, la proporción sexual de la descendencia F₂ de cada cruce tampoco evidenció diferencias significativas respecto

al testigo: H t x M t ($F_{8,65} = 0.7345$, $p = 0.6607$), H nt x M t ($F_{4,17} = 1.217$, $p = 0.3403$) y H t x M nt ($F_{2,11} = 0.2919$, $p = 0.7525$) (Tabla 6).

Estos resultados muestran que la capacidad reproductiva de los descendientes F_1 de hembras expuestas se afecta más que la de machos tratados, y que la respuesta es notablemente distinta en la F_1 proveniente de solo un progenitor expuesto (hembra o macho) en comparación con la F_1 de ambos parentales tratados (Fig. 6.15). Esto contrasta con que no se encontraron grandes diferencias en los biomarcadores al comparar los tres esquemas de cruce en la generación de progenitores.

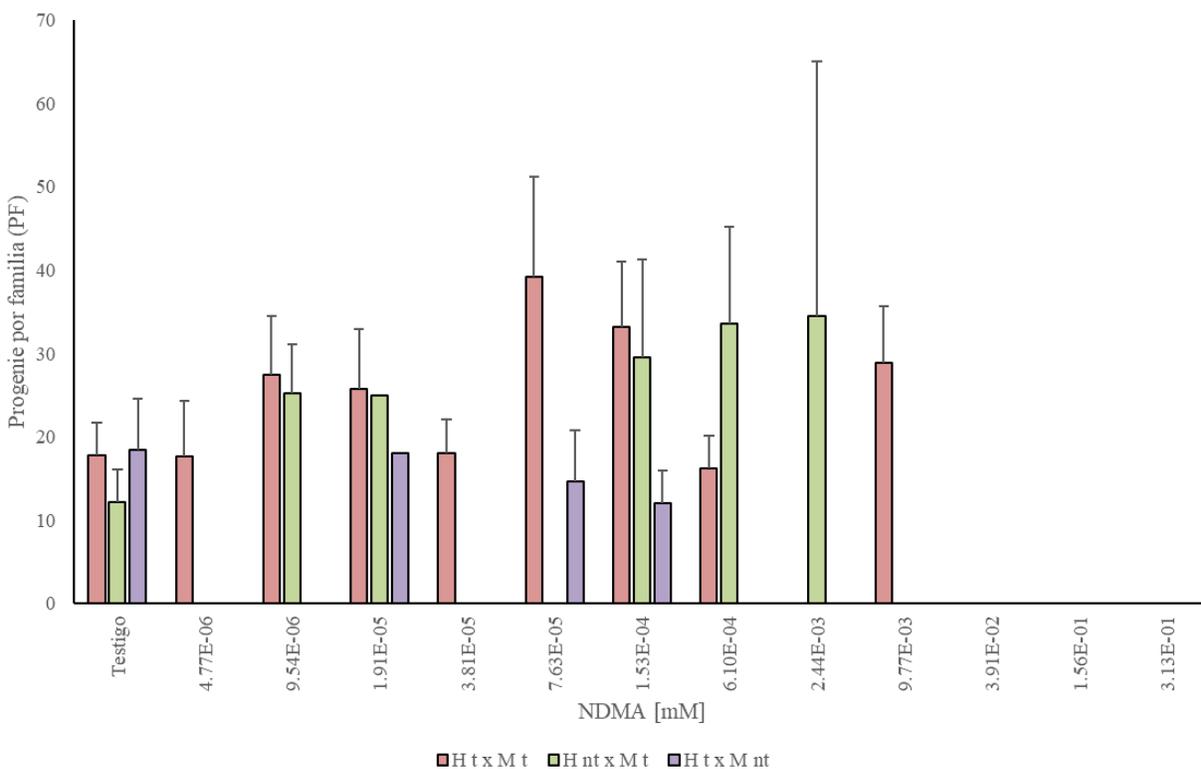


Fig. 6.14 Progenie promedio por familia de la descendencia F_1 (F_2) de parentales *D. aldrichi* expuestos a NDMA de los tres sistemas de cruce: H t x M t (ambos parentales tratados), H nt x M t (solo machos tratados) y H t x M nt (únicamente hembras tratadas). No se encontraron diferencias significativas en relación con los testigos ni entre los esquemas de cruce.

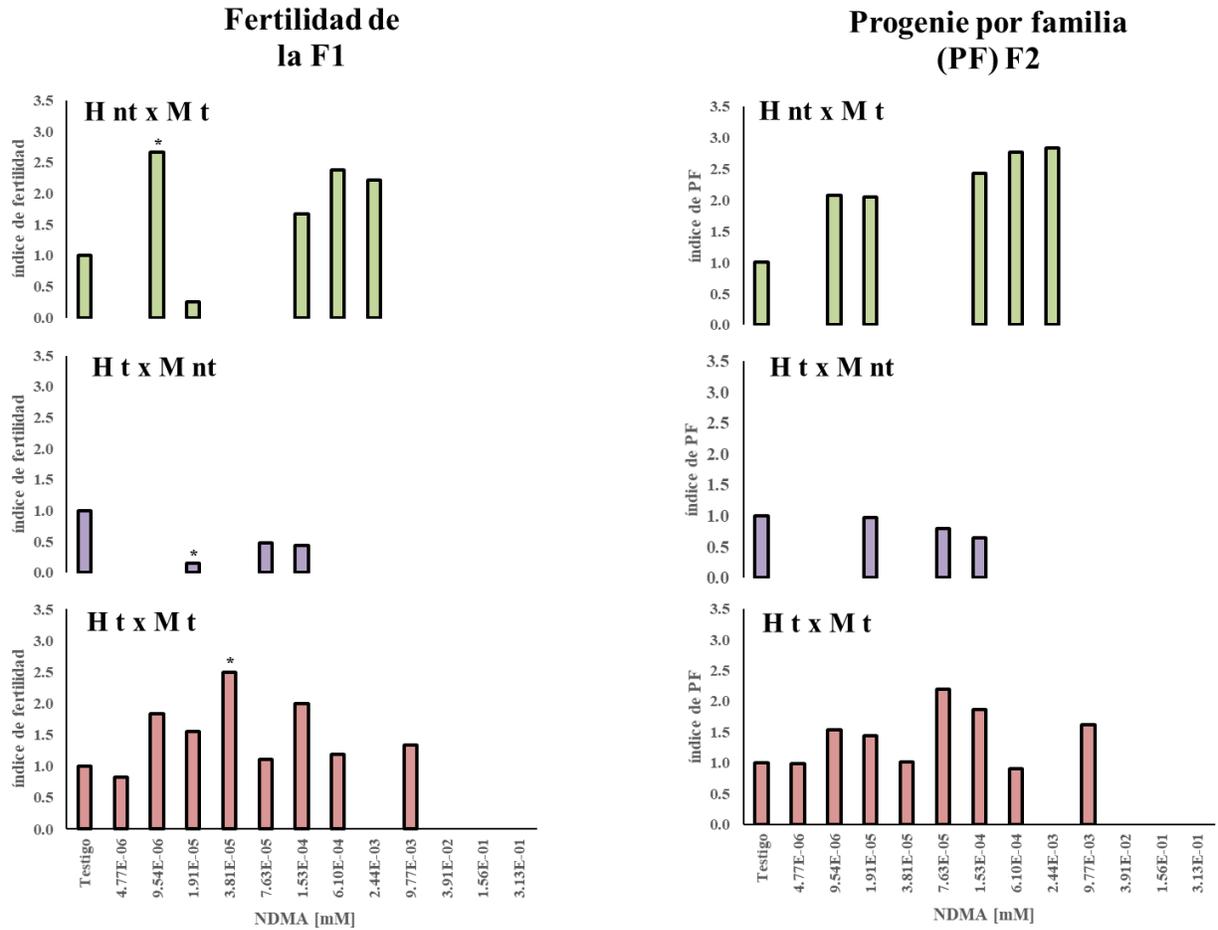


Fig. 6.15 Comparación de los biomarcadores para capacidad reproductiva de la descendencia F₁ de parentales *D. aldrichi* tratados con NDMA. Fertilidad de la F₁ (izquierda) y progenie promedio por familia de la F₁ (F₂) (derecha) de los tres sistemas de cruce: H nt x M t (solo machos tratados), H t x M nt (únicamente hembras tratadas) y H t x M t (ambos parentales tratados). *, indica diferencias significativas con el testigo ($p < 0.05$).

Por otro lado, en la tabla 7 se muestran los biomarcadores de fertilidad y cantidad de progenie promedio para la F₂ que valoran si se afectó la capacidad reproductiva de esta generación no tratada, que desciende de los sistemas donde uno o ambos parentales fueron expuestos a NDMA.

Tabla 7. Capacidad reproductiva de las moscas F₂ no expuestas provenientes de progenitores tratados con NDMA.

Sistema de cruza	NDMA [mM]	n	F	d ^a	N	PF ± ee	d ^b	Psx H ± ee	Psx M ± ee	d ^b
H t x M t	Testigo	10	0.40	-	167	41.75 ± 13.82	-	0.44 ± 0.07	0.56 ± 0.07	-
	4.77E-06	10	0.40	-	63	15.75 ± 10.45	-	0.37 ± 0.12	0.63 ± 0.12	-
	9.54E-06	10	0.30	-	99	33.00 ± 19.66	-	0.57 ± 0.18	0.43 ± 0.18	-
	1.91E-05	9	0.33	-	101	33.67 ± 21.18	-	0.43 ± 0.03	0.57 ± 0.03	-
	3.81E-05	10	0.30	-	23	7.67 ± 2.40	-	0.48 ± 0.10	0.52 ± 0.10	-
	7.63E-05	6	0.67	-	62	15.50 ± 4.70	-	0.58 ± 0.17	0.42 ± 0.17	-
	1.53E-04	10	0.30	-	46	15.33 ± 7.54	-	0.61 ± 0.03	0.39 ± 0.03	-
	6.10E-04	10	0.20	-	6	3.00 ± 0.00	-	0.50 ± 0.17	0.50 ± 0.17	-
	9.77E-03	10	0.00	-	0	0.00	-	-	-	-
H nt x M t	Testigo	4	0.25	-	7	7.00	-	0.57	0.43	-
	9.54E-06	8	0.00	-	0	0.00	-	-	-	-
	1.91E-05	5	0.00	-	0	0.00	-	-	-	-
	1.53E-04	10	0.00	-	0	0.00	-	-	-	-
	6.10E-04	10	0.00	-	0	0.00	-	-	-	-
	2.44E-03	1	0.00	-	0	0.00	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H t x M nt	Testigo	10	0.20	-	16	8.00 ± 4.00	-	0.50 ± 0.00	0.50 ± 0.00	-
	1.91E-05	3	0.00	-	0	0.00	-	-	-	-
	7.63E-05	10	0.20	-	68	34.00 ± 30.00	-	0.47 ± 0.03	0.53 ± 0.03	-
	1.53E-04	4	0.25	-	66	66.00	-	0.59	0.41	-

H t x M t (ambos progenitores tratados), H nt x M t (machos tratados) y H t x M nt (hembras tratadas); n, número de parejas; F, fertilidad de la F₂; N, total de moscas recobradas (progenie de todas las parejas); PF, progenie promedio por familia de la F₂ (F₃); Psx H, proporción sexual promedio de hembras en la progenie F₃; Psx M, proporción sexual promedio de machos en la progenie F₃; ee, error estándar; d, diagnóstico estadístico: a, prueba de Z para proporciones; b, prueba de ANOVA de una vía; -, indica que no se encontraron diferencias significativas respecto al testigo. Los valores de PF, Psx H y Psx M, distintos de cero, sin errores estándar indican que en esas concentraciones no se pudieron obtener promedios porque solo se recobró progenie adulta de una pareja. En el sistema de cruza H t x M nt se empleó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para determinar si existían diferencias estadísticas, en la progenie por familia y en la proporción sexual, entre la concentración 7.63E-05 y el testigo.

De las doce concentraciones con las que se inició cada sistema de cruza en la generación parental, en la descendencia F₂ proveniente del esquema donde se expuso solamente al macho en la generación de los progenitores, el 100% de los tratamientos experimentales acumuló fertilidad igual a cero y solo sobrevivió el testigo (tratamiento control). Por su parte, los descendientes F₂ de la cruza donde se trató únicamente a la hembra acumularon 83.33% de concentraciones con infertilidad en las que no se recobró progenie F₃; en tanto que la descendencia F₂ del sistema donde fueron expuestos ambos parentales acumuló un 41.67% de concentraciones con fertilidad de cero (Fig. 6.16).

Como se mencionó anteriormente, las moscas F_2 resultantes del esquema H nt x M t fueron infértiles en todas concentraciones. Por tanto, los análisis estadísticos se llevaron a cabo solamente con los resultados para los biomarcadores de toxicidad reproductiva, fertilidad y progenie por familia, de los descendientes F_2 de los esquemas donde fueron tratadas solo las hembras (H t x M nt) o ambos parentales (H t x M t) en la generación de los progenitores.

Tomando en consideración únicamente los tratamientos experimentales en los que no hubo infertilidad, la fertilidad de la F_2 procedente del sistema donde solamente fue expuesta la hembra mostró un comportamiento similar al testigo en las dos únicas concentraciones: 7.63 E-05 mM ($z = 0, p > 0.9999$) y 1.53 E-04 mM ($z = 0.206, p = 0.8368$). Mientras que la fertilidad de la progenie F_2 del esquema donde se trataron ambos progenitores fue menor al testigo en la mayoría de los tratamientos experimentales, salvo en las concentraciones 4.77 E-06 mM y 7.63 E-05 mM (Fig. 6.16); sin embargo, dicha reducción no fue significativa. Comparando la fertilidad de la descendencia F_2 de las cruza H t x M t y H t x M nt, no se encontraron diferencias significativas.

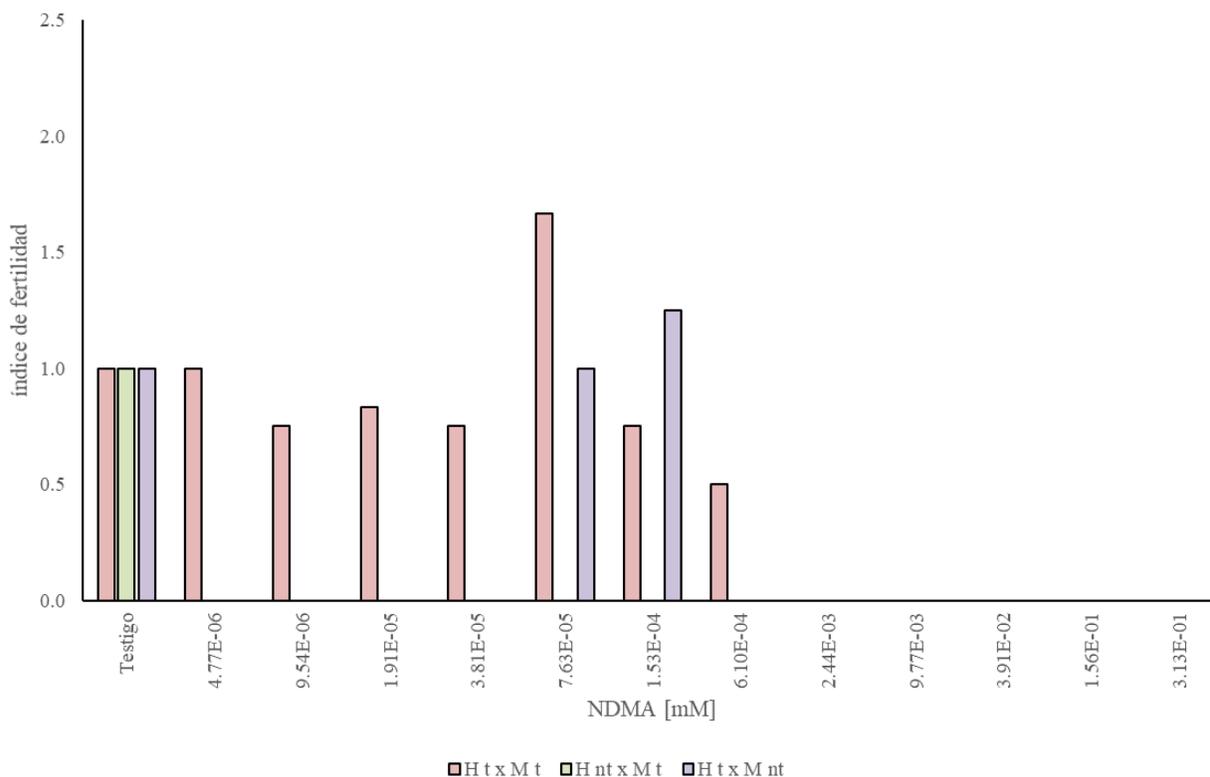


Fig. 6.16 Índices de fertilidad de la progenie F_2 proveniente de parentales *D. aldrichi* expuestos a NDMA de los tres sistemas de cruce: H t x M t (ambos progenitores tratados), H nt x M t (solo machos tratados) y H t x M nt (únicamente hembras tratadas). No se detectaron diferencias significativas respecto a los testigos ni entre los esquemas de cruce.

La cantidad de progenie F_3 del sistema H t x M t fue menor que el testigo en todas las concentraciones (Fig. 6.17), aunque no significativamente ($F_{7,18} = 1.147, p = 0.3786$). La progenie por familia de la F_2 derivada del esquema H t x M nt fue mayor que el testigo en las dos concentraciones donde se recobraron organismos: en la concentración $1.53 \text{ E-}04 \text{ mM}$ se recuperó 8.3 veces la progenie adulta del testigo y provino exclusivamente de una pareja; mientras que en la concentración $7.63 \text{ E-}05 \text{ mM}$ la cantidad de progenie fue 4.3 veces la del testigo (Fig. 6.17), pero ese incremento no fue estadísticamente significativo ($U = 1.5, p > 0.9999$). Al confrontar los dos sistemas, no se detectaron diferencias significativas ($F_{1,8} = 3.318, p = 0.1060$). Tampoco se encontraron diferencias significativas respecto al testigo en la proporción sexual de las moscas F_3 del sistema H t x M t ($F_{7,18} = 0.5048, p = 0.8190$) ni del esquema H t x M nt ($U = 1, p > 0.9999$) (Tabla 7).

La evidencia indica que la capacidad reproductiva de la descendencia F_2 derivada de hembras o machos tratados se perjudica notablemente, pero el efecto es más severo cuando se expone solamente al macho progenitor (Fig. 6.18). Además, la diferencia en los biomarcadores entre los sistemas donde se trata únicamente a un parental con respecto al esquema en el que se expone a ambos, se acrecienta aún más en esta generación (Fig. 6.18).

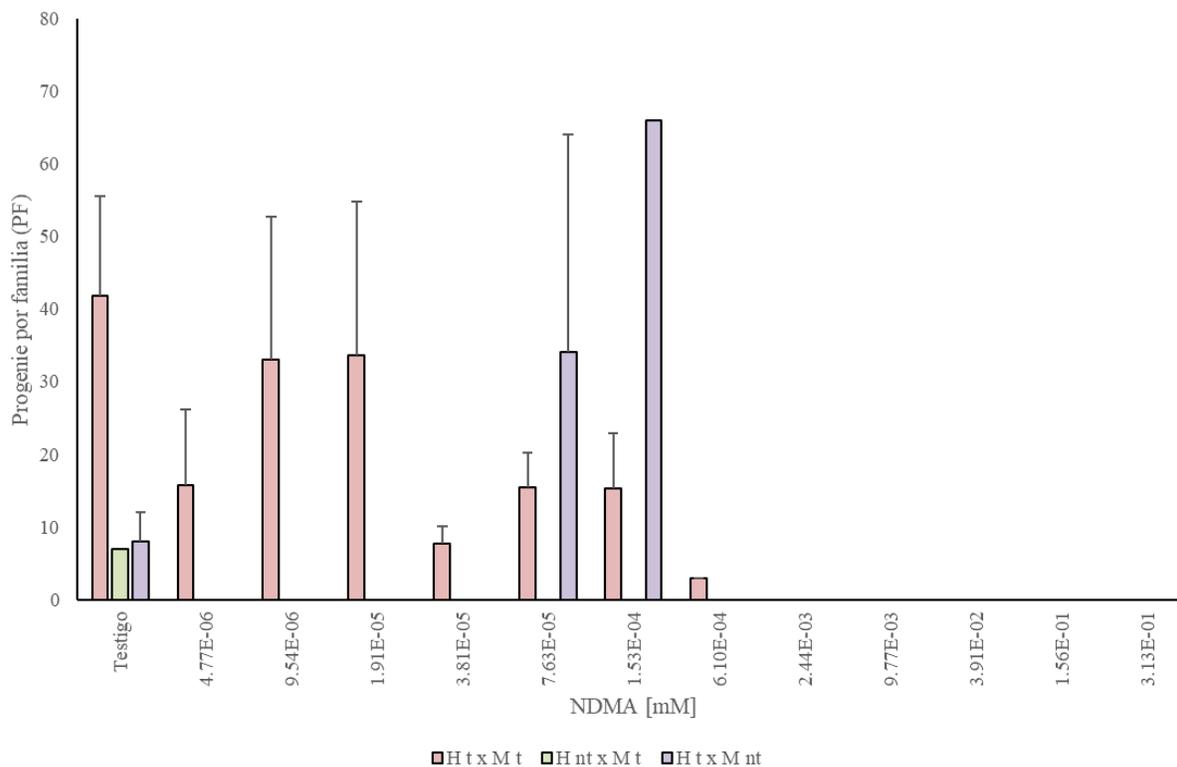


Fig. 6.17 Progenie promedio por familia de las moscas F₂ (F₃) derivadas de progenitores *D. aldrichi* expuestos a NDMA de los tres sistemas de cruce: H t x M t (ambos parentales tratados), H nt x M t (solo machos tratados) y H t x M nt (únicamente hembras tratadas). No se encontraron diferencias significativas en comparación con los testigos ni entre los esquemas de cruce.

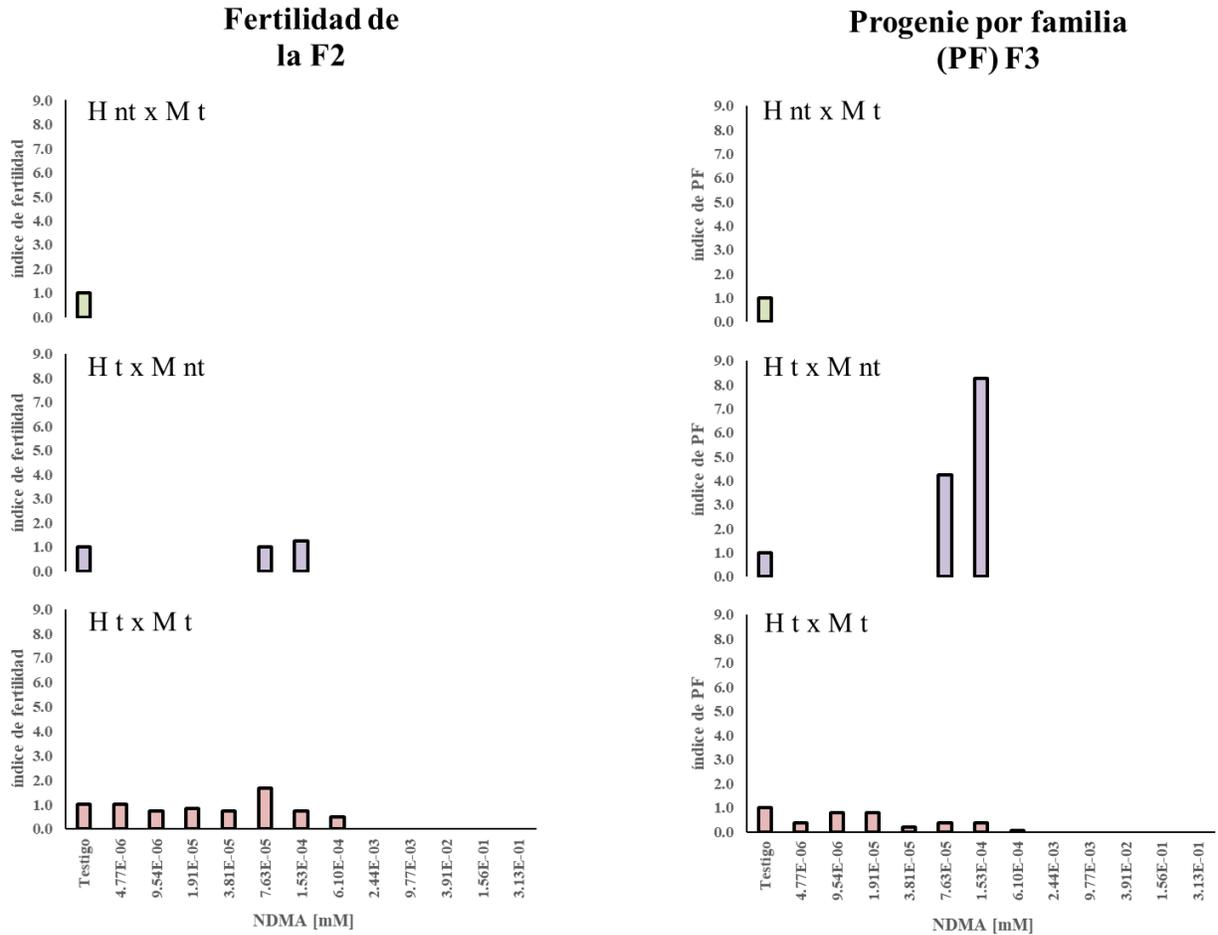


Fig. 6.18 Comparación de los biomarcadores para capacidad reproductiva de las moscas F₂ provenientes de progenitores *D. aldrichi* expuestos a NDMA. Fertilidad de la F₂ (izquierda) y progenie promedio por familia de la F₂ (F₃) (derecha) de los tres sistemas de cruce: H nt x M t (solo machos tratados), H t x M nt (únicamente hembras tratadas) y H t x M t (ambos parentales tratados).

6.1.6 Revisión morfológica externa e interna de las gónadas de *Drosophila*

Los machos progenitores *D. aldrichi* de cada generación y las muestras de sus descendencias presentaron dos testículos; esta información se corroboró con las disecciones. En las hembras parentales *D. aldrichi* y sus progenies se encontraron dos ovarios. Asimismo, las hembras y machos *D. melanogaster* presentaron el número regular de gónadas. En ningún caso, al realizar las disecciones, las gónadas de *D. aldrichi* ni de *D. melanogaster* presentaron alguna malformación evidente.

6.2 Ensayo molecular

6.2.1 Determinación del efecto de la NDMA en la expresión del gen *shade* (*shd*, *Cyp314a1*) en *D. melanogaster*

Para analizar la expresión de *shd* a nivel transcripcional en *D. melanogaster*, se diseñaron oligonucleótidos para la amplificación de su mRNA por ensayos de RT-PCR, así como otro par para el gen *RpL23* como control. Para corroborar la especificidad de los oligonucleótidos, se purificó el gDNA de tres muestras de larvas *D. melanogaster* de 72 h y se utilizó como molde para la amplificación por PCR (Fig. 6.19). Además de haber obtenido solo un producto de amplificación en cada reacción, el tamaño obtenido correspondió con lo esperado (509 pb, 1892 pb para *shd* y 854 pb para *RpL23*) considerando a los intrones. Asimismo, en la figura 6.20 se muestran los resultados de amplificación por RT-PCR tanto de *shd* como de *RpL23* a partir de RNA total de las siete muestras.

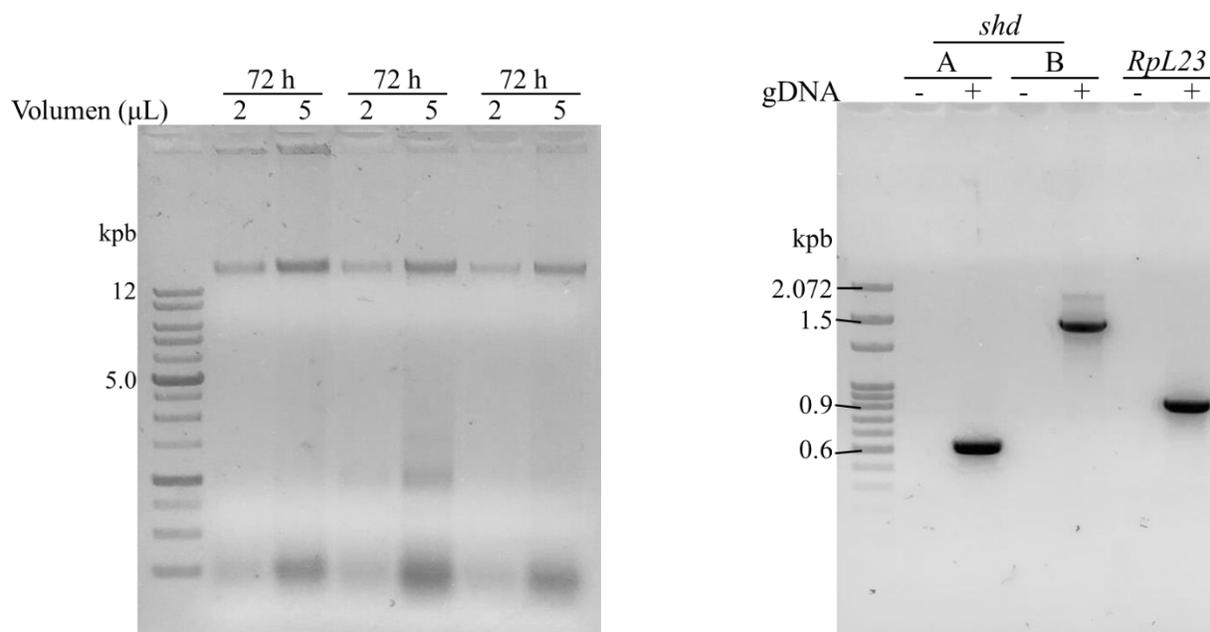


Fig. 6.19 Análisis por electroforesis en gel de agarosa del gDNA purificado a partir de larvas de *D. melanogaster* de 72 h de edad (izquierda) y amplificación por PCR usándolo como molde y a los oligonucleótidos diseñados para *shd* y *RpL23* (derecha). El amplicón del carril *shd* A (509 pb) se obtuvo con los oligonucleótidos propuestos en este trabajo para amplificar *shade* en la RT-PCR, mientras que las bandas en *shd* B (1892 pb) y *RpL23* (854 pb) se generaron con los oligonucleótidos propuestos por Petryk *et al.* (2003) en la determinación del CYP314A1 como la enzima en *D. melanogaster* que cataliza la formación de 20E a partir de E.

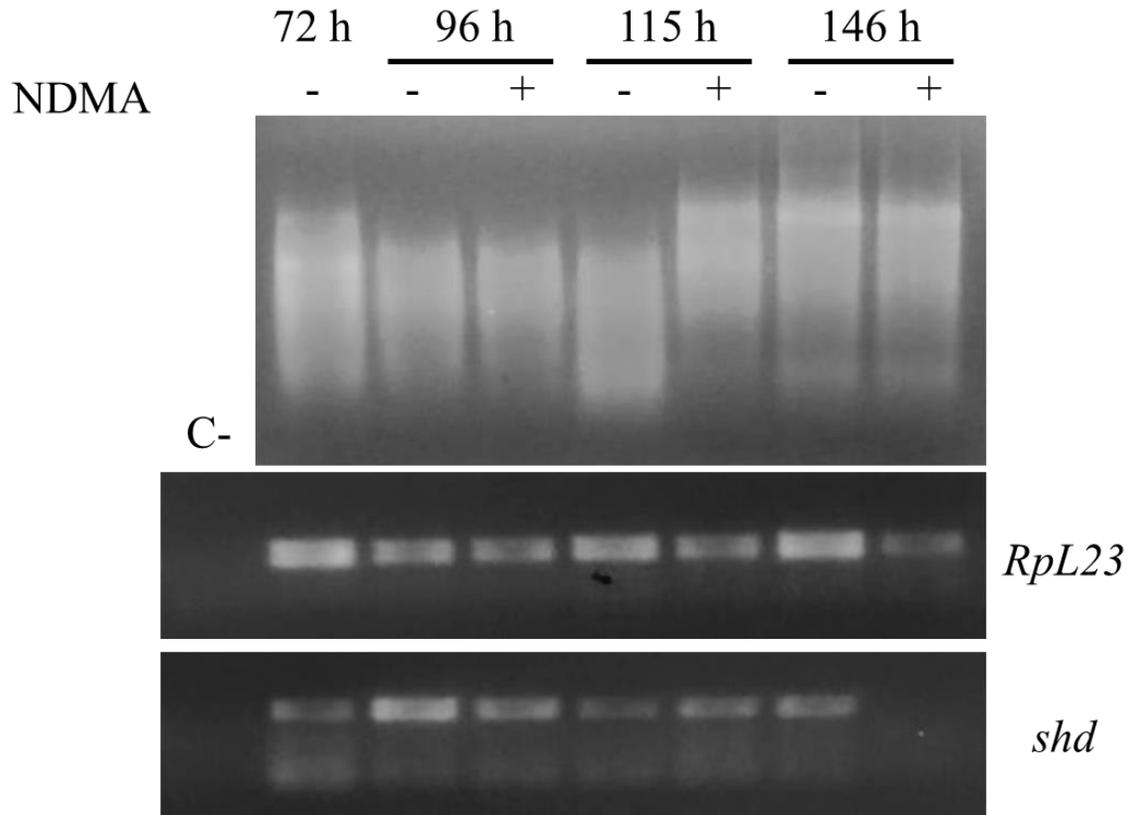


Fig. 6.20 Integridad del RNA total extraído de larvas y pupas de *D. melanogaster* (arriba). Resultado de la RT-PCR para las siete muestras con el gen de referencia *RpL23* (268 pb) (centro) y el experimental *shd* (319 pb) (abajo). NDMA (*N*-nitrosodimetilamina); edades: 72 h, 96 h y 115 h (larvas) y 146 h (pupas); -, sin NDMA; +, con NDMA [1.56 E-01 mM]; C-, control negativo.

De acuerdo con la figura 6.20, se detectó el transcrito de *shd* en todas las muestras (tratadas y control), excepto en la de pupas de 146 h de edad expuestas a NDMA, lo que sugiere una diferencia cualitativa importante. Este resultado indica que en la concentración 1.56 E-01 mM la exposición a NDMA interfiere con la expresión de *shd* en algún punto entre las 115 y 146 h. Esto último implica que probablemente la NDMA o sus metabolitos aún permanecieron y actuaron en el organismo de 43 a 74 h después de que la larva de tercer estadio entró en contacto con el compuesto (entre 1.8 y 3.1 días).

7. DISCUSIÓN

7.1 Toxicidad de la NDMA

La sobrevivencia y la proporción sexual fueron los biomarcadores utilizados para evaluar el efecto tóxico de la NDMA tanto en *D. melanogaster* como en *D. aldrichi*. Al comparar la respuesta de ambas especies, se recuperaron menos moscas a bajas concentraciones y posteriormente se encontró toxicidad del tratamiento. Además, el comportamiento de la sobrevivencia al incremento en la concentración de NDMA siguió una relación básica de dosis-respuesta con un área sin efecto aparente (favorable o desfavorable) seguida de otra con efectos tóxicos (Weiner & Matthews, 2003; Repetto & Repetto, 2009).

Los resultados sugieren que *D. aldrichi* es más sensible que *D. melanogaster* a la NDMA. A partir de 3.91 E-02 mM se redujo significativamente el número de adultos promedio de *D. aldrichi* recobrados, pero en *D. melanogaster* esto ocurrió a partir de una concentración mayor (1.04 mM), por lo que las larvas de tercer estadio de *D. melanogaster* lograron inactivar, excretar (o ambos) este xenobiótico o sus metabolitos, atenuando parcial o completamente su toxicidad, en un rango más amplio de concentraciones que las de *D. aldrichi*; esto concuerda con que la especie en sí misma es un factor que modifica la toxicidad (Repetto & Repetto, 2009).

La evidencia también indica que la toxicidad de la NDMA afectó de manera similar a hembras y machos, ya que la caída en la sobrevivencia por la exposición a dicho compuesto no trajo consigo diferencias significativas en la proporción sexual; esto quiere decir que la NDMA ejerce un efecto adverso en los organismos expuestos de *Drosophila* independientemente de su sexo. Lo anterior coincide con que no se esperaban diferencias en la respuesta al compuesto entre machos y hembras en ambas especies, debido a que se conoce que la actividad metabólica de los cuerpos grasos en las larvas de tercer estadio (etapa de exposición al xenobiótico) es semejante en ambos sexos (Clark, 1982). Además, la actividad mutagénica de la NDMA formando aductos en el DNA se ha documentado tanto en hembras como en machos.

7.1.1 ¿La variación del tiempo de desarrollo por exposición a NDMA estaría vinculada con la aparición de malformaciones en *D. aldrichi*?

Los resultados en *D. melanogaster* evidenciaron un retraso en el desarrollo que se acentuó al incrementar la concentración de NDMA, lo cual coincide con reportes previos en los que la exposición a un agente tóxico ralentiza el desarrollo de las moscas *D. melanogaster* (Olcott *et al.*, 2010; Pappus & Mishra, 2018). No obstante, en *D. aldrichi* se halló evidencia tanto de aceleración como de retraso en el desarrollo.

La coincidencia de que las únicas tres concentraciones que presentaron tanto aceleración como retraso fueron las que tuvieron más de la mitad de los organismos sobrevivientes con malformaciones, en comparación con la concentración 9.77 E-03 mM en donde la presencia de malformaciones fue inferior al 5% y únicamente se encontró retraso del desarrollo, sugiere que el incremento en la velocidad con la que las moscas *D. aldrichi* se desarrollaron, después de la exposición a NDMA, interviene mayormente en la aparición de malformaciones. En estas concentraciones previas a la letalidad, entre el 68 y el 80% del total de organismos ya se habían recobrado para la tercera lectura, mientras que solo el 33% en el control. Por tanto, puede ser que gran parte de esas moscas hayan sido las que presentaron malformaciones, que al final estuvieron entre el 52 y el 75%.

Asimismo, puede ser que la aceleración en el desarrollo resultara en un organismo con estructuras no formadas, mal formadas o incompletas que murió antes de emerger de la pupa y por eso se observó una caída en la sobrevivencia en todas las concentraciones donde hubo aceleración del desarrollo. Para confirmar esto podrían realizarse estudios con estas concentraciones no letales donde cae abruptamente la sobrevivencia, en los que se diseccionen las pupas de las que no emerjan individuos para validar que los organismos no logran completar su desarrollo o presentan malformaciones.

Sin embargo, la evidencia señala que la aceleración en el desarrollo por sí sola no puede asociarse con la aparición de malformaciones. Como ya se mencionó, en la concentración 9.77 E-03 mM se encontraron malformaciones (4.79%) pero allí únicamente hubo retraso. Como solo en las cuatro concentraciones previas a la letalidad fue donde se hallaron malformaciones, esto indica que existe un punto en el que la bioacumulación de las formas biológicamente activas de la NDMA

en las moscas *D. aldrichi* incrementa la probabilidad de alteraciones en el desarrollo, a tal grado, que se manifiestan con la aparición de malformaciones.

7.1.2 Posible especificidad de la NDMA sobre la terminalia

A pesar de que la larva de tercer estadio de *Drosophila* expuesta a la NDMA tiene la mayor tasa de actividad de desintoxicación, y en esa etapa es donde se espera que metabolice, inactive y excrete el compuesto o sus metabolitos, las malformaciones aparecieron en los adultos de *D. aldrichi* en las concentraciones mayores. Esto indicaría que en esos tratamientos las larvas de tercer estadio de esta especie no lograron desintoxicarse completamente o al menos no en la medida necesaria para evitar efectos adversos, por lo que la NDMA permaneció en una concentración biológicamente activa en los individuos e interfirió con el desarrollo de las estructuras de las placas genital y anal.

En *D. melanogaster* no se encontraron malformaciones en ninguna de las concentraciones utilizadas en este trabajo, esto puede haberse dado porque las larvas de esta especie se desintoxicaron más eficientemente de la NDMA (o sus metabolitos) que las de *D. aldrichi*, o a que el periodo en el cual las larvas ingirieron el compuesto fue mayor en esta última al tener un ciclo de vida más largo, lo que puede haber resultado en una mayor bioacumulación de NDMA. No obstante, debido a que en *D. melanogaster* no se hallaron malformaciones en las concentraciones previas a la letalidad como sí ocurrió con *D. aldrichi*, y estas concentraciones fueron mayores, es más probable que una de las razones principales de la presencia de malformaciones solamente en una especie sea la capacidad diferencial para desintoxicarse.

Una posible explicación de por qué la NDMA actuaría tan específicamente sobre la terminalia de *D. aldrichi* generando malformaciones en hembras y machos, se puede obtener al centrarse en el desarrollo de los discos imaginales de su especie hermana *D. melanogaster*. En esta especie, el número de células de este disco permanece más o menos constante hasta el final del primer estadio larvario. Aproximadamente a las 25 h (comienzo del segundo estadio larval), las células empiezan a dividirse y para las 30 h (aún en larva de segundo estadio) el 25% de las células de este disco se han dividido (Madhavan & Schneiderman, 1977).

Lo anterior implica que al momento de la exposición de los organismos a la NDMA (inicio del tercer estadio larvario), las células de los discos imaginales estaban en el periodo de proliferación celular pero aún no se habían comenzado a diferenciar; entonces, ¿por qué si las condiciones fueron

similares en el término de la maduración de todos los discos imagales, los efectos adversos parecen concentrarse únicamente en las estructuras derivadas del disco genital? Una explicación podría estar en la diferenciación celular.

Durante la metamorfosis de *Drosophila* se producen las estructuras del adulto a partir de la diferenciación de los discos imagales y nidos de histoblastos. No obstante, la diferenciación de estas estructuras no se lleva a cabo simultáneamente; en general, las estructuras de la mosca adulta tienden a formarse dentro del pupario de la región anterior a la posterior (Bainbridge & Bownes, 1981). Por tanto, al ser la terminalia de las últimas estructuras en formarse, habría un intervalo de tiempo mayor para que los metabolitos biológicamente activos de la NDMA, que no pudieron ser eliminados, interfieran con la diferenciación de la genitalia y la analia.

Si al finalizar el tercer estadio larvario y entrar en periodo de pupación, la proliferación celular de los discos imagales se reduce sustancialmente alcanzando niveles basales (Del Saz, 2017), la aparición de malformaciones como placas evertidas “tipo trompeta”, prolongaciones y protuberancias, probablemente quitinosas, permitiría inferir que la exposición a NDMA puede afectar la regulación del ciclo celular durante la diferenciación de la terminalia, al punto de que haya un incremento descontrolado de la proliferación celular cuando ésta debería estar prácticamente inhibida.

Se conoce que para que se pueda dar una coordinación en el incremento de los tejidos con las señales hormonales que inducen metamorfosis y diferenciación, es necesario un riguroso control de la proliferación en los discos imagales y en los nidos de histoblastos (Del Saz, 2017). En ese orden de ideas, las cinasas dependientes de ciclina (CDKs) son enzimas reguladoras esenciales involucradas en la proliferación celular mediante la regulación de puntos de control del ciclo celular y eventos transcripcionales en respuesta a señales extracelulares e intracelulares (Follette & O'Farrell, 1997; Ding *et al.*, 2020). Por tanto, sería de enorme importancia evaluar en estudios futuros si en *Drosophila* la función de las CDK se ve alterada por la exposición a NDMA y que esta sea una de las razones por la que se modifica la morfología de las estructuras de la terminalia en algunos individuos.

Por su parte, la presencia de múltiples malformaciones en la terminalia de un mismo organismo, por ejemplo, un macho con su placa genital girada y que presente una prolongación, indica que la exposición a NDMA puede afectar distintos blancos durante el desarrollo del mismo

disco genital. Es más, la presencia de diversos ángulos de rotación de la genitalia de los machos sugiere que el tiempo en el que se produce la toxicidad del desarrollo por exposición a NDMA es variable.

Para finalizar, encontrar evidencia que ayude a esclarecer el por qué la marcada especificidad que parece tener la NDMA por las estructuras de la terminalia, requerirá mayores esfuerzos en estudios posteriores.

7.1.2.1 ¿La activación metabólica de la NDMA puede interferir con la rotación de la terminalia en *D. aldrichi*? Evidencia en machos

En este trabajo se encontró evidencia de que la exposición a NDMA induce malformaciones en *D. aldrichi* y parece ser específica de la terminalia. Además, los resultados sugieren que la activación metabólica de dicho compuesto interfiere con el posicionamiento regular de la genitalia y analia externas, observado claramente en los machos. La interrupción puede ocurrir en diferentes momentos del desarrollo lo que resulta en rotaciones parciales con distintos ángulos.

Ahora bien, tomando como referencia a *D. melanogaster*, la rotación de la genitalia (y la analia) en machos es un proceso que inicia en pupas de aproximadamente 24 h y dura alrededor de 12 a 15 h, en el que ambas estructuras en conjunto realizan un giro de 360° siempre en dirección de las manecillas del reloj o dextral (considerando una vista posterior de la mosca) (Coutelis *et al.*, 2013; Prieto, 2018). Lo anterior valida que la NDMA estaría interfiriendo en distintos momentos, durante la metamorfosis del individuo, lo que da como resultado rotaciones incompletas.

Cabe resaltar que pudo haber sido posible que algunos machos tuvieran su genitalia en aparente posición regular pero que en realidad no se hubiese realizado el giro completo, es decir, no hubo forma de diferenciar externamente si no realizó la rotación (0°) o si se llevó a cabo un giro de 360°, el resultado es igual porque ubica la estructura en el mismo lugar. En futuros estudios las disecciones permitirán esclarecer estas situaciones, debido a que el espermiducto gira alrededor del intestino durante la rotación de la genitalia (Prieto, 2018).

La evidencia indica que las malformaciones se asocian tanto con la aceleración como con el retraso del desarrollo en *D. aldrichi*, estando la primera probablemente involucrada en mayor medida. En el caso de la aceleración en el desarrollo podrían darse dos eventos: en el primero la NDMA directamente interferiría con la rotación de la placa genital. En el segundo el compuesto

indirectamente generaría la interrupción porque de alguna manera haría que el organismo se forme antes de tiempo, por tanto, la genitalia no alcanzaría a girar y esto daría como resultado la malformación. En los eventos en los que haya retraso en el desarrollo, la mosca tendría suficiente tiempo para desarrollarse; pero la NDMA directamente actuaría sobre los componentes de la maquinaria que hace posible el giro de la genitalia impidiendo el desarrollo regular. Respecto a esto último, ¿cuáles pueden ser los blancos de la NDMA?

7.1.2.2 Abdominal-B (*Abd-B*), *doublesex* (*dsx*) y *caudal* (*cad*) como posibles blancos de la NDMA

Las malformaciones en *D. aldrichi* se encontraron en ambos sexos; esto probablemente sea consecuencia de que las estructuras de la terminalia masculina y femenina derivan de un único disco genital similar en composición (fusión de tres primordios). Se ha reportado que la ausencia de un primordio en el disco genital de *Drosophila* afecta el desarrollo de los demás: cuando las células de los primordios de la analia o de la genitalia femenina se eliminan con la toxina ricina, el resto del disco genital no se desarrolla adecuadamente (Estrada *et al.*, 2003). Con esto cabría la posibilidad de que por la exposición a NDMA se afectara alguno de los primordios y esto conllevara a un desarrollo inadecuado de la terminalia. Sin embargo, si los demás discos imagales y los nidos de histoblastos estuvieron bajo condiciones adversas similares y no se encontró evidencia de malformaciones en las partes de la mosca a las que dan lugar, sería más probable que la especificidad hacia la terminalia derive de la alteración de genes que sean particularmente relevantes en el desarrollo de la genitalia y la analia.

Por el periodo en el que se expuso a los organismos al compuesto, los posibles blancos de la NDMA deberían sean genes que se expresen cuando se termina de madurar el disco genital y se comienza a diferenciar, o sea, estos deberían expresarse hacia el final del tercer estadio larvario y durante el periodo de pupa, además de ser vitales en el desarrollo de la terminalia externa.

La importancia de los genes *Abd-B*, *cad* y *dsx*, especialmente los dos primeros, no se limita a nivel embrionario; su expresión también abarca los estadios larvales y el periodo de pupa. En el disco genital, la expresión de *Abd-B* se ha reportado durante el tercer estadio larvario (Freeland & Kuhn, 1996), específicamente en los segmentos A8 y A9 en hembras y machos (de Navas *et al.*, 2006; Foronda *et al.*, 2006; Petzoldt *et al.*, 2012), así como en el periodo de pupa en el segmento A8 del disco genital masculino (Suzanne *et al.*, 2010). *Abd-B* también se expresa en las células de

los nidos de histoblastos y en las células epiteliales larvales del epitelio abdominal pupal temprano. Abd-B es necesario en las células de los nidos de histoblastos para su identidad (Singh & Mishra, 2014).

Por su parte, en la literatura existe evidencia de la expresión de *dsx* en el disco genital de hembras y machos en el estadio larvario (Massey *et al.*, 2019), particularmente en las larvas de tercer estadio (Robinett *et al.*, 2010). Además, *dsx* se expresa durante el desarrollo genital en varias regiones de la genitalia masculina pupal, entre ellas los *claspers* (Rice *et al.*, 2019). En cuanto a *cad*, en general durante los tres estadios larvarios se expresa en el disco imagal genital (Freeland & Kuhn, 1996; Gorfinkiel *et al.*, 1999) y especialmente en el tercer estadio lo hace en la parte posterior del disco (Mlodzik & Gehring, 1987). En el periodo de pupa se expresa en la analia (Calleja *et al.*, 1996).

Los genes *Abd-B* y *dsx* son algunos de los que modifican las rutas de señalización en diferentes niveles para especificar el crecimiento y la diferenciación propios de la genitalia masculina y femenina (Sánchez *et al.*, 2001; Estrada *et al.*, 2003). Las mutaciones de *Abd-B* que transforman los segmentos A8 y A9 en abdomen provocan la ausencia de analia. Mutaciones en *Abd-B r* (que se expresa solo en A9) conducen a la ausencia de genitalia femenina y analia (Estrada *et al.*, 2003). El gen *dsx* controla el crecimiento y la diferenciación en el disco genital. Este gen regula el organizador anterior/posterior (A/P) para controlar el crecimiento de cada primordio genital del disco y luego dirige cada uno de ellos para diferenciar estructuras adultas definidas en ambos sexos (Keisman *et al.*, 2001).

Asimismo, el gen *Abd-B* es clave para la rotación de la genitalia de *D. melanogaster*. Abd-B induce la expresión de *myoID*, gen que codifica la miosina ID (MyoID). En ausencia de Abd-B no se produce MyoID y la genitalia no rota (Coutelis *et al.*, 2013; Prieto, 2018). Abd-B activa tanto al determinante dextral (*myoID*) como a un determinante sinistral aún no descrito. En presencia de Abd-B se activa la transcripción de ambos, y el dextral inhibe al sinistral, prevaleciendo el giro regular a la derecha (Prieto, 2018).

En *D. melanogaster* el último segmento abdominal (A7) se encuentra en las hembras, pero se ausenta en los machos. La presencia de Dsx^M (producto de la expresión de *dsx*), junto con Abd-B, determina la desaparición del A7 en el macho. Combinaciones genéticas que inhiben a *Abd-B* o *dsx* no eliminan el A7 y esto también impide la rotación completa de la terminalia tanto dextral

(giro regular) como sinistral en los machos (Fig. 7.1) (Prieto, 2018). Es igualmente por esta última razón, evidenciada en los machos, por la que se propone específicamente a *Abd-B* y *dsx* como posibles blancos de la NDMA. En el caso del gen *cad*, debido a su particular participación en ambos sexos en la formación del primordio anal desde estadios tempranos hasta su diferenciación en la analia durante la metamorfosis, y a que se encontraron protuberancias en la terminalia de los organismos *D. aldrichi*, se propone que en la aparición de estas malformaciones también podría estar involucrado este gen.

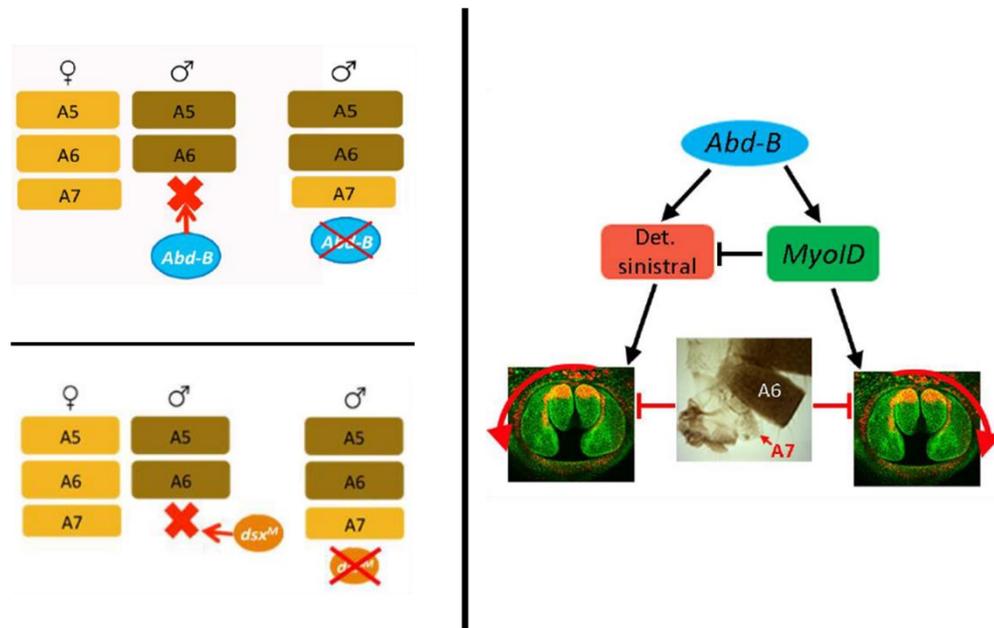


Fig. 7.1 Combinaciones genéticas que no eliminan el segmento A7 en los machos (izquierda) también impiden la rotación completa de la terminalia tanto dextral como sinistral (derecha). *Abd-B* activa también a *myoID* (determinante dextral) y a un posible determinante sinistral (adaptado de Prieto, 2018).

7.2 ¿La NDMA modificó la capacidad reproductiva de los progenitores expuestos y la de su descendencia (F₁ y F₂) no tratada?

Para evaluar el efecto *in vivo* de la NDMA sobre la capacidad reproductiva de tres generaciones en *D. aldrichi* (P, F₁ y F₂) se llevó a cabo un ensayo de reprotoxicidad. Los progenitores de la generación F₁ (P) fueron expuestos directamente al compuesto, por ende, sus gónadas y células germinales indirectamente. En cambio, los parentales de la F₂ (F₁ x F₁) y de la F₃ (F₂ x F₂) no fueron tratados con NDMA. La fertilidad y la progenie por familia fueron los biomarcadores que se usaron para evaluar el efecto de la NDMA en las células germinales de los organismos y, por lo tanto, en la capacidad reproductiva de *D. aldrichi*. A continuación, se discuten

los resultados obtenidos cuando uno o los dos progenitores fueron expuestos a NDMA, y si hubo o no un efecto sobre la capacidad reproductiva de su descendencia no tratada por dos generaciones más.

7.2.1 ¿Interfirió la NDMA con la capacidad reproductiva de los organismos expuestos durante el último estadio larval?

La cruce en donde tanto la hembra como el macho fueron tratados (H t x M t) implica que la formación y maduración de las células germinales de ambos se llevó a cabo en presencia de la NDMA. En la cruce donde solo se trató al macho (H nt x M t), sus células germinales estuvieron expuestas al compuesto, pero las de la hembra que fecundaron no, y en el sistema donde solamente la hembra fue tratada (H t x M nt) únicamente sus células germinales estuvieron expuestas a NDMA.

De acuerdo con la contribución de la hembra y del macho durante la reproducción, se esperaba que la cruce donde ambos progenitores fueron tratados con NDMA resultara mayormente afectada, seguido del esquema donde solo se trató a la hembra y por último la cruce donde solamente el macho fue expuesto. Esto con base en la literatura donde se ha reportado que la contribución es diferencial en los organismos con reproducción sexual, debido a que el gameto de la hembra además de aportar la mitad de la información genética contribuye con el citoplasma por completo, así como RNA, proteínas, organelos, y otros componentes indispensables para el desarrollo del cigoto y la formación del nuevo organismo, que no se encuentran en los gametos masculinos (Dworkin & Dworkin-Rastl, 1990; Greiner *et al.*, 2015; Laver *et al.*, 2015; Despici *et al.*, 2017); por consiguiente, las hembras emplean más recursos proteicos, transcripcionales y citoplasmáticos para generar la descendencia (Mousseau & Fox, 1998). Sin embargo, se asume que los efectos de los xenobióticos en los procesos reproductivos masculinos y femeninos son generalmente similares y que un agente que afecte la función reproductiva en un sexo lo hace también en el otro, a menos que se demuestre lo contrario (EPA, 1996).

En la generación de los progenitores (P), la disminución significativa de la fertilidad en el sistema donde ambos parentales fueron tratados con el compuesto (H t x M t) y la infertilidad en las dos concentraciones más altas en los tres esquemas de cruce, evidencia que la NDMA afecta el desarrollo de las células germinales tanto de hembras como de machos expuestos, esto es, altera sus capacidades reproductivas. Por ello, cuando un macho tratado fecunda a una hembra no

expuesta, un macho no tratado fertiliza a una hembra expuesta o un macho tratado fecunda a una hembra expuesta, los ovocitos fertilizados tienen dificultades para desarrollarse. El éxito en la formación del nuevo organismo dependería de varios factores, entre ellos la severidad del daño en las células germinales de cada progenitor y la capacidad de cada uno para repararlo.

Ahora bien, en *D. melanogaster* al final de la embriogénesis se forma la gónada embrionaria que contiene los precursores del componente somático de las gónadas y las células germinales primordiales que se diferencian posteriormente por gametogénesis (Szabad & Nöthiger, 1992; Santos & Lehmann, 2004). Los ovarios y los testículos se comienzan a diferenciar desde el momento en el que las larvas eclosionan de los huevos y para el tercer estadio larval dichas estructuras son visibles, aunque solo se definen por completo hacia el final de la pupación previo a la emergencia del adulto. Además, en los testículos de una larva de tercer estadio, la mayoría de las células germinales han madurado en espermatoцитos listos para entrar en las divisiones meióticas, mientras que en los ovarios larvarios apenas se encuentran ovogonias (Hartenstein, 1993).

Las disecciones no mostraron alguna anomalía evidente en las gónadas por exposición a NDMA que pudiese estar involucrada en la incorrecta formación y maduración de espermatozoides y ovocitos, esto sugiere que la alteración de la capacidad reproductiva en los organismos tratados tuvo lugar directamente en las células germinales. Es decir, se alcanzó suficiente concentración de NDMA (o de sus metabolitos) para que permeara las gónadas en diferenciación, llegando a las células germinales inmaduras en su interior e interfiriendo en su desarrollo.

7.2.1.1 ¿La exposición directa de los organismos a NDMA no afectó diferencialmente las células germinales de hembras y machos?

Los resultados para fertilidad señalan que en la generación parental (P) se afectó en mayor medida, como se esperaba, el sistema en el que se trataron con NDMA ambos progenitores (H t x M t), pero no se encontró evidencia que permitiera diferenciar el efecto entre los otros dos esquemas (H nt x M t y H t x M nt), o sea, los resultados sugieren que la capacidad reproductiva se alteró similarmente en las cruces donde solo uno de los parentales (hembra o macho) fue expuesto. Esto último se contrapone con que, entre tratar solamente a la hembra o únicamente al macho, se esperaba mayor daño en el sistema en el que solo las hembras fueron expuestas a NDMA; pero

concuera con la presunción descrita en las pautas para la evaluación de riesgo de toxicidad reproductiva de la EPA, que plantea que un xenobiótico que afecta la función reproductiva en un sexo lo hace similarmente en el otro (EPA, 1996). Ahora bien, ¿por qué la respuesta frente a la exposición con el compuesto no fue diferencial entre los sexos? La respuesta puede hallarse en el aporte del macho durante la reproducción.

Los hallazgos con esta investigación en *D. aldrichi* apoyan que la contribución del macho para la formación de un nuevo organismo es igualmente importante a la de la hembra. Esto contrasta con la idea generalizada de que el macho solamente aporta la mitad de la información genética (Hosken & Hodgson, 2014), y con que la contribución de la hembra debería ser más relevante en la protección, formación y maduración del cigoto por el aporte de recursos adicional al material genético que controlan el desarrollo temprano (Mtango *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha reportado que los machos contribuyen con RNA (Hosken & Hodgson, 2014) y proteínas que ejercen sus efectos en todas las fases de la biología reproductiva de la hembra copulada, desde el momento en que se deposita el espermatozoides en el tracto reproductivo hasta la deposición del huevo (Gillott, 2003).

Los machos de *D. melanogaster* presentan tres proteínas que son sintetizadas en el aparato genital y se transmiten en el fluido seminal durante el apareamiento. Dos de ellas (ACP26Aa y SP) se producen en la glándula accesoria y otra (DUP99B) en el ducto eyaculador. La ACP26Aa (ovulina) estimula la liberación de los ovocitos del ovario (Heifetz *et al.*, 2000) e interviene en la ovulación (transferencia de un huevo del ovario al útero) y la oviposición, al igual que los dos péptidos sexuales (Sps), péptido sexual (SP) y péptido 99B del conducto eyaculador (DUP99B) (Kubli, 2003).

Estas moléculas bioactivas presentes en el líquido seminal pueden ejercer sus efectos en procesos como la protección, el almacenamiento y la activación del espermatozoides, la competencia espermática (efectos sobre los espermatozoides de los machos rivales), el comportamiento femenino, la fecundidad, ovulación, oviposición y protección de los huevos puestos (Gillott, 2003). La exposición a NDMA podría alterar la estructura de los componentes del fluido seminal o reducir su cantidad interfiriendo con su función regular.

7.2.1.2 ¿El efecto adverso de la exposición a NDMA sobre la capacidad reproductiva pudo atenuarse en la generación progenitora?

Aunque se encontró evidencia de que la NDMA afecta la capacidad reproductiva de los progenitores expuestos, en los tratamientos con fertilidades distintas de cero no se detectó un cambio significativo cuando se trató solo a la hembra o únicamente al macho. Lo anterior sugiere que cuando solamente uno de los gametos se forma y madura en condiciones ambientales desfavorables, como lo es la exposición a un mutágeno, el efecto adverso de la NDMA sobre la capacidad reproductiva puede mitigarse. Para ello, pueden estar involucrados procesos de reparación previos o posteriores a la formación del cigoto que, al menos en esa generación, permitan su desarrollo regular que culmine con la formación de un nuevo individuo. También puede ser que en los casos donde el efecto desfavorable persista en algunos gametos, existan mecanismos de selección en uno o los dos progenitores, es decir, que haya selección de las células germinales antes de la formación del cigoto.

Se ha propuesto que deben existir algunos mecanismos que contribuyen a que se mitigue el efecto de la exposición al mutágeno de acción directa metil metano sulfonato (MMS) en la capacidad reproductiva de las hembras de *D. melanogaster* (el MMS es, al igual que la NDMA, un agente alquilante del DNA, donador de grupos metilo). Uno de estos elementos podría ser la selección a nivel celular, previamente a la formación del cigoto; en la cual pueden existir tres mecanismos: que las células toleren la lesión y continúen sus funciones, que las células dañadas se reparen o que las células afectadas se eliminen por apoptosis (Arroyo, 2019).

Respecto al primer mecanismo, en *D. melanogaster* se ha reportado tolerancia a condiciones de estrés; sin embargo, la localización de energía para activar la maquinaria que hace posible soportar la lesión impacta directamente otros procesos en el organismo. Por ejemplo, la exposición de moscas a temperaturas elevadas durante un corto período de tiempo activa los genes de choque térmico y se incrementa la sobrevivencia a estrés térmico posterior, pero disminuye la fecundidad (Maltby, 1999). Ya que este mecanismo puede disminuir la capacidad reproductiva, se descarta como uno de los que probablemente atenúa el efecto adverso en las células germinales por exposición a NDMA.

En lo que concierne al segundo mecanismo, las rutas de reparación del DNA en *Drosophila*, por nombrar algunas, incluyen la reparación por escisión de bases (BER) y nucleótidos (NER), la

reparación de emparejamientos erróneos (MMR), enlaces cruzados (ICLs) y roturas de doble cadena (DSBs) por recombinación homóloga (HR), siendo esta última predominante en las líneas germinales masculinas y femeninas (Sekelsky, 2017). Se conoce que la actividad de reparación del DNA se basa en la maquinaria del ovocito una vez que tiene lugar la fertilización, siendo el cigoto el responsable de reparar el daño que proviene del espermatozoide (Fernández-Díez *et al.*, 2016). En *Drosophila* este proceso ha sido documentado en embriones tempranos precisamente a través de la reparación por recombinación homóloga (Hagmann *et al.*, 1998). En consecuencia, el mecanismo de reparación sería viable incluso después de la fecundación; no obstante, hay que considerar que la exposición a NDMA puede alterar la maquinaria necesaria para llevar a cabo el proceso de reparación exitosamente.

Se ha reportado que la toxicidad en *Drosophila* induce la apoptosis (Pappus & Mishra, 2018). Los componentes de los puntos de control de daños del DNA no solo regulan el ciclo celular para retrasar los efectos adversos, sino que también activan la reparación del DNA y promueven la apoptosis, lo que elimina las células con DNA dañado (Jaklevic & Su, 2004). Las hembras de *Drosophila* presentan la maquinaria para inducir la muerte celular programada durante la ovogénesis y de esa manera deshacerse de los huevos defectuosos (Buszczak & Cooley, 2000). Por esto último, la apoptosis también puede ser uno de los mecanismos que interviene en la mitigación del efecto adverso de la NDMA en las células germinales, específicamente en las hembras.

Por otra parte, en *Drosophila* existe evidencia de que cuando se trata al macho o a la hembra con un mutágeno hay selección precigótica (previa a la formación del cigoto): los machos expuestos inhiben la oviposición en las hembras (tratadas o no), pero al mismo tiempo estimulan a las que ponen huevos para que lo hagan en mayores cantidades; esto significa que los machos expuestos ejercen un efecto dual y modulador sobre la capacidad reproductiva de las hembras (Arroyo, 2019). Esto también apoya lo que se ha mencionado en cuanto a que la contribución del macho en *Drosophila*, para la formación y desarrollo de un nuevo organismo, no se limita a la transferencia de la mitad de la información genética.

De igual forma, se ha encontrado evidencia que sugiere que en las hembras tratadas existe un mecanismo para seleccionar los huevos que se encuentran en mejores condiciones en etapas muy tempranas durante la ovogénesis, previas al cigoto (Arroyo, 2019). Además, se ha reportado que también hay selección postcigótica (posterior a la formación del cigoto) cuando se expone al

macho, ya que hay una reducción significativa de la viabilidad de su descendencia lo que sugiere que terminan su desarrollo solo aquellos organismos en mejores condiciones (Arroyo, 2019). Ambos procesos podrían estar implicados en la mitigación del efecto adverso de la NDMA sobre la capacidad reproductiva de la población expuesta, aunque solamente sea en esa generación. No obstante, para confirmar la existencia de estos mecanismos de selección por exposición a NDMA en *D. aldrichi*, se requieren más estudios.

Con todo lo anterior puede decirse que el sistema donde se exponen ambos progenitores (H t x M t) es el más afectado porque el genotóxico puede interferir con un mayor número de factores que cuando se trata solo a uno de los dos: componentes del líquido seminal del macho que estimulan la ovulación y oviposición, la maquinaria enzimática para reparar su propio DNA o la de la hembra que ayuda también a reparar el daño en los espermatozoides una vez se lleva a cabo la fecundación, así como RNA y factores proteicos que intervienen en la formación y desarrollo del cigoto.

7.2.2 Evidencia de modificaciones en la capacidad reproductiva de las generaciones F₁ y F₂ no expuestas a NDMA

En la F₁ y F₂ se evaluó si el posible efecto por la exposición a NDMA en los progenitores tuvo algún impacto en la capacidad reproductiva de estas dos generaciones y si fue diferencial dependiendo del parental tratado, o sea, cuando las células germinales de los progenitores (hembras o machos) se formaron y maduraron en presencia del compuesto, pero no las de las siguientes dos generaciones.

La infertilidad encontrada en la generación parental (P) y sus progenes F₁ y F₂, en los tres sistemas de cruce, revela que la NDMA afecta la capacidad reproductiva de *D. aldrichi* a lo largo de las generaciones. Además, los resultados sugieren que el efecto es más drástico a partir de la F₁ en las generaciones que no fueron expuestas, pero que provienen de uno de los progenitores tratados en la etapa larvaria (hembra o macho), respecto a la descendencia que deriva de la cruce donde ambos parentales fueron expuestos, ya que esta última logra mantenerse en el tiempo a pesar del efecto adverso de la NDMA; estas diferencias se acrecientan con el paso de las generaciones.

En los parentales, la presencia de infertilidad evidencia que aunque puedan existir mecanismos de reparación o de selección precigótica y postcigótica en estos organismos tratados, cuya consecuencia es que solo se desarrollan los que se encuentran en mejores condiciones, en algunos tratamientos el efecto adverso del compuesto es tal que incluso estas moscas presentan

daños irreversibles en sus células germinales que hacen que no se lleve a cabo la fecundación o, en los casos en los que esta sí llegue a ocurrir, que haya letalidad embrionaria; en ambos sucesos solamente se observan huevos de los que no eclosionan larvas.

La aparición de infertilidad en generaciones no expuestas también permite identificar que los mecanismos que deberían atenuar o erradicar el daño de la NDMA sobre las células germinales de sus progenitores tratados, no lograron contrarrestar totalmente el efecto adverso de este compuesto, porque no podría explicarse la aparición del daño en la progenie no expuesta en ausencia del compuesto que lo causa, a menos que el efecto perjudicial se haya transmitido de alguna manera.

Dicha infertilidad tuvo una tendencia a presentarse en las concentraciones más altas en las que aún sobrevivían individuos en cada generación; esto significa que a mayor bioacumulación del mutágeno en el organismo expuesto se incrementa la probabilidad de encontrar efectos adversos en él o puede que incluso en su descendencia.

Dos de las tres concentraciones donde más de la mitad de los organismos sobrevivientes a la exposición con el compuesto presentaron malformaciones, fueron infértiles en la generación parental y la restante en la generación F₁. En los sistemas de cruce no se usaron individuos malformados para no agregar una fuente de variación más; sin embargo, las moscas con malformaciones fueron cruzadas paralelamente con organismos regulares y en ningún caso se recuperó progenie. Por tanto, en estas concentraciones previas a la letalidad el efecto de la NDMA sobre *D. aldrichi* es severo: los individuos que no mueren por la toxicidad del mutágeno resultan malformados o con alteraciones en sus capacidades reproductivas, que se evidencian en esa misma generación o en la siguiente.

Para la F₁ se observó el efecto más drástico sobre la capacidad reproductiva en la descendencia de únicamente hembras expuestas, luego en la de solo machos tratados y el efecto más leve se encontró en la progenie de ambos parentales expuestos. En cuanto a la generación F₂, la capacidad reproductiva se afectó con mayor intensidad en la descendencia proveniente de solamente machos tratados, seguido de la progenie derivada de solo hembras expuestas y por último en los descendientes de ambos parentales tratados; por tanto, en la F₁ y la F₂ la progenie procedente del sistema H t x M t fue la menos afectada en su capacidad reproductiva, contrario a la generación parental en la que dicho esquema mostró el efecto más severo.

El que se haya modificado la capacidad reproductiva de las generaciones no expuestas (F_1 y F_2), pero que provienen de uno o ambos parentales tratados, indica que el efecto adverso en las células germinales de los progenitores interfiere con la capacidad reproductiva de su descendencia, a través de alteraciones ligadas a este tipo de células en la progenie. La exposición a NDMA de los parentales se asocia con la modificación de la capacidad reproductiva en la generación F_1 , mientras que la alteración en la F_2 podría estar asociada al deterioro del desarrollo de las células germinales de la F_1 después de la exposición de los progenitores.

Recientemente se ha utilizado la frecuencia de recombinación de las hembras en *D. melanogaster* para mostrar que la exposición al mutágeno MMS de las células germinales de los progenitores (hembra o macho) no alcanza a modificar dicha frecuencia en esa generación, porque el proceso de recombinación debe ocurrir en etapas muy tempranas durante la formación de las células germinales, incluso antes del tercer estadio larval; pero esta sí se altera en las hembras no expuestas de la siguiente generación. Esto pone en evidencia que, aunque las hembras no hayan recibido el daño directo, pueden detectar el daño ocasionado en las células germinales de sus progenitores tratados (Arroyo, 2019).

Las modificaciones en la sobrevivencia de los organismos *D. aldrichi* tratados, su capacidad reproductiva y la de su descendencia F_1 , así como la aparición de malformaciones, evidencian que la NDMA tiene un efecto multigeneracional; además, existe un efecto transgeneracional que se observa con la alteración de la capacidad reproductiva de la progenie F_2 .

El efecto transgeneracional significa que la exposición de los parentales tuvo alguna influencia en la descendencia no expuesta (Yu *et al.*, 2013), lo que señala una intervención a largo plazo (Lu *et al.*, 2020). Se ha reportado que concentraciones significativamente más altas del disruptor endocrino tebuconazol (TEB) fueron encontradas en embriones de pez cebra (*Danio rerio*) después de la exposición de los progenitores y pudieron inducir efectos tóxicos transgeneracionales en los descendientes, lo que indicó que la bioacumulación de TEB en los peces parentales puede resultar en la transferencia de TEB de los huevos a la progenie (Li *et al.*, 2019). De manera similar a la investigación anterior, la exposición de los progenitores a TEB indujo toxicidad reproductiva transgeneracional en *Caenorhabditis elegans*. En ese trabajo se planteó que la acumulación de TEB en las células germinales divididas o los ovocitos en desarrollo puede ser liberada a los embriones (Lu *et al.*, 2020). Estos hallazgos abren la posibilidad de una transferencia

de NDMA (o sus metabolitos) de los parentales expuestos de *Drosophila*, a través del huevo, a su descendencia no tratada; sin embargo, se hace necesaria más investigación para corroborar o desestimar lo dicho anteriormente.

En lo que respecta a la alteración de la capacidad reproductiva de la descendencia por cada sistema de cruce, en el esquema de solamente hembras tratadas fue mayor en la F₁ y se redujo en la F₂ mientras que cuando se expuso al macho se incrementó en la F₁ y se mantuvo en la F₂. En el caso de la cruce de ambos progenitores tratados, se mantuvo en la F₁ y disminuyó en la F₂. El caso donde solo fueron expuestos los machos, en el que no se obtuvo descendencia F₃, ilustra la importancia del uso de sistemas *in vivo* para realizar estudios en generaciones subsecuentes. El daño en los machos por exposición a NDMA a nivel de células germinales se enmascara y parece ser leve en la generación de progenitores, pero su impacto se evidencia totalmente dos generaciones más adelante. Enfatizando la importancia de considerar la biotoxicidad a lo largo de múltiples generaciones para realizar una evaluación precisa de los riesgos ambientales de las sustancias tóxicas.

Como se ha discutido, la modificación de la capacidad reproductiva de las progenes F₁ y F₂ no tratadas sugiere que hubo un efecto adverso en las células de sus progenitores expuestos a NDMA que no logró ser completamente suprimido. Por lo observado en la generación F₃, el efecto adverso recayó mayormente en el sistema de solo machos tratados, luego en la cruce de únicamente hembras expuestas y por último en el esquema donde ambos parentales estuvieron tratados.

Por tanto, podría ser que cuando un macho tratado aporte en el momento de la reproducción un espermatozoide que se formó y maduró en presencia del compuesto y la hembra contribuya con uno ovocito que no se desarrolló en contacto con el compuesto, no se alcancen a activar a tiempo mecanismos de reparación en la hembra posterior a la formación del cigoto para reparar el daño que aún continúe en el material que aportó el espermatozoide; esto directamente impactaría las siguientes generaciones. También puede ser que el daño en el espermatozoide sea irreversible o que los factores proteicos que aporta el macho en el líquido seminal estén afectados o disminuidos en cantidad y por tanto no se module correctamente la ovulación u oviposición de las hembras o se reduzca notablemente la viabilidad del huevo fecundado.

En el caso en el que solamente la hembra sea expuesta, como se ha mencionado en los mecanismos de selección, esta podría seleccionar a huevos que se encuentren en mejores

condiciones atenuando de alguna manera el efecto adverso del compuesto, lo que no podría realizar eficientemente cuando el afectado es el macho porque la selección dependería de si el daño en el espermatozoide es o no irreversible.

Lo anterior contrasta con el sistema en el cual ambos progenitores estaban tratados, en donde el aporte de gametos y desarrollo del cigoto hayan sido consecuencia de mecanismos de reparación o selección precigótica y postcigótica más exitosos, lo que permitiría el desarrollo de los organismos en mejores condiciones. Puede ser que exista una especie de acondicionamiento al entorno (adaptación) que incrementa la resiliencia en las moscas tratadas, lo que resulta en gametos mejor adaptados que confieren cierta resistencia a la descendencia, pero que ese efecto se exprese de mejor manera solamente cuando ambos gametos aportados se forman y maduran en condiciones desfavorables. Esto no ocurriría en la misma medida si solo se expone a uno de los parentales.

Como se ha mencionado, el aporte masculino y femenino no se limita al DNA, sino que involucra también proteínas y RNA. Es posible que ese material, necesario para llevar a cabo una fecundación exitosa, se ajuste a las nuevas condiciones establecidas por el compuesto, sus metabolitos o ambos, atenuando sus efectos adversos en las moscas tratadas; pero que la interacción entre el material de un gameto que no se formó y maduró en presencia de NDMA y otro que sí se desarrolló en condiciones desfavorables, luego de la formación del cigoto, no traiga consigo la detección y corrección de las lesiones que aún persistan, o sencillamente que no interactúen correctamente. Esto irremediablemente impactaría a ese nuevo organismo y puede que incluso a su descendencia. Los resultados de este trabajo solo permiten hipotetizar lo que estaría ocurriendo, más investigación se requiere para confirmar o desestimar lo que se ha descrito.

En *D. melanogaster* se ha reportado la presencia de actividad mutagénica en la línea germinal por exposición a la NDMA (Vogel *et al.*, 1981; Lee *et al.*, 1983); sin embargo, no hay suficiente evidencia que permita sugerir un mecanismo de herencia de los efectos tóxicos reportados en este trabajo. Para complementar la información obtenida y determinar si realmente existen cambios en las secuencias de DNA en las células germinales de los organismos tratados, que den lugar a mutaciones heredables en hembras y machos de *D. aldrichi* en un rango de concentraciones bajas, se requieren más estudios con este compuesto. Un posible mecanismo alternativo que podría considerarse es mediante una regulación epigenética.

7.2.3 ¿Podría la exposición a NDMA inducir modificaciones epigenéticas en *Drosophila*?

La herencia epigenética transgeneracional mediada por mecanismos epigenéticos puede ayudar a explicar, al menos parcialmente, los efectos encontrados en las generaciones no expuestas a NDMA: modificaciones epigenéticas que pudieron haber sido transmitidas a través de la línea germinal de los parentales tratados a la siguiente generación no expuesta para causar efectos en las generaciones subsecuentes. Por tanto, cabe preguntarse: aparte de las modificaciones de las histonas reportadas en *Drosophila* ¿qué otros factores epigenéticos podrían estar involucrados?

7.2.3.1 Metilación del DNA en *Drosophila* por exposición a la NDMA: ¿una posibilidad?

La metilación del DNA es el factor de regulación epigenético más estudiado y se cree que es el mecanismo primario involucrado en los fenómenos hereditarios transgeneracionales para mediar los efectos de los disruptores endocrinos a través de la línea germinal (Skinner, 2008; Brehm & Flaws, 2019). Se ha demostrado que la activación metabólica de la NDMA, nitrosodialquilamina simétrica donadora de grupos metilo, causa tanto metilación como oxidación del DNA y existe evidencia que respalda la hipótesis de que el daño del DNA inducido por NDMA puede desempeñar un papel importante en la expresión de sus efectos tóxicos (Hecht *et al.*, 1986; Bartsch *et al.*, 1989; Jorquera *et al.*, 1993; Lin & Hollenberg, 2001). Por lo anterior cabría preguntarse: ¿puede la metilación del DNA estar involucrada en los efectos transgeneracionales encontrados en *Drosophila* por la exposición a NDMA?

La metilación del carbono 5 de la citosina del dinucleótido citosina-guanina (CpG) para formar 5-metilcitosina (5mC) fue una de las primeras marcas epigenéticas identificadas. Es un factor importante en las vías conservadas de regulación de la expresión génica en casi todos los organismos multicelulares (Dunwell *et al.*, 2013; Dunwell & Pfeifer, 2014). Sin embargo, la presencia de 5mC en el genoma de *Drosophila* ha sido un tema controversial cuya discusión viene desde hace más de 30 años, con frecuentes informes contradictorios que afirman ya sea pruebas a favor o en contra de la presencia de 5mC; a medida que las técnicas han avanzado, también lo ha hecho el debate (Dunwell & Pfeifer, 2014).

Este organismo carece de homólogos de los genes para DNA metiltransferasas (DNMT) de mamíferos *Dnmt1*, *Dnmt3a* o *Dnmt3b*, pero contiene un gen que codifica un homólogo de *Dnmt2* (también conocido como Mt2) (Dunwell *et al.*, 2013). Se ha sugerido que el ancestro de

DNMT2/Mt2 era una DNA metiltransferasa y cambió su preferencia de sustrato al tRNA con posibilidad de actividades duales (Jeltsch *et al.*, 2006; Krauss & Reuter, 2011).

El genoma de *Drosophila* también alberga un homólogo de la proteína de unión al CpG metilado de mamífero MBD2 (dMBD2/3). Se ha demostrado que dicha proteína tiene la capacidad de unirse a este sitio metilado del DNA, al menos *in vitro* (Tweedie *et al.*, 1999; Roder *et al.*, 2000). Además, se reportó que la metilación sí se encontraba en el DNA de *Drosophila*, pero estaba restringida al desarrollo embrionario temprano (Lyko *et al.*, 2000).

La evidencia en contra más fuerte fue descrita en los últimos años en el trabajo de Raddatz *et al.* (2013) en el que se utilizó la secuenciación por bisulfito, la técnica dominante para el análisis de metilación del DNA desde 1992 (Frommer *et al.*, 1992), para determinar su contenido en *D. melanogaster*. Allí no se encontraron rastros de metilación en el genoma de la mosca; sin embargo, el protocolo usado por Capuano *et al.* (2014) confirmó la presencia de 5mC en el DNA de adultos *D. melanogaster* con un valor de 0.034% de citosinas metiladas, que está hasta dos órdenes de magnitud por debajo del límite de detección de la secuenciación de bisulfito (~0.5%); razón por la que potencialmente este bajo nivel de metilación no sería hallado con la secuenciación de bisulfito convencional (Dunwell & Pfeifer, 2014). En esa misma línea, Takayama *et al.* (2014) reportaron metilación de citosinas en el 0.94% del genoma de *D. melanogaster*, pero no encontraron que fuese dependiente de la actividad de Mt2, por tanto, sugirieron la presencia de una nueva metiltransferasa.

Asimismo, la identificación de la proteína dTet en *Drosophila* apoya la presencia de la metilación del DNA en este género (Dunwell *et al.*, 2013). Dado que es muy probable que dTet utilice a la 5mC genómica como sustrato y la oxide a 5-hidroximetilcitosina (Dunwell *et al.*, 2013; Boffelli *et al.*, 2014), por lo que se conoce de las proteínas TET de mamíferos, no hay razón para que dTet se conserve en el genoma de *Drosophila* si no hay 5mC sobre el que actuar. Parece muy poco probable que en este género se hubiese mantenido una proteína del tamaño de dTet si, como se hace más evidente en los estudios con mamíferos, no estuviera desempeñando un papel significativo en uno o más puntos del desarrollo como modificador epigenético. También, los residuos para la unión de DNA y la actividad catalítica están todos altamente conservados, lo que indica que es menos probable que dTet haya desarrollado una función diferente a la que se ha informado previamente para las TET de mamíferos. Debido a la obvia conservación de importantes

residuos, dominios y estructura proteica, la carencia total de 5mC en *Drosophila* no parece viable (Dunwell *et al.*, 2013).

Existen numerosos casos reportados de insectos, incluyendo hormigas, pulgones, abejas, moscas y escarabajos (*Acyrtosiphon pisum*, *Aedes aegypti*, *Apis mellifera*, *Camponotus floridanus*, *Harpegnathos saltator*, *Nasonia vitripennis*, *Tribolium castaneum*) en los que se han detectado claramente niveles y patrones específicos de 5mC, lo que significa que la ausencia de metilación del DNA en *D. melanogaster* aparentemente sería única dentro de esta clase de animales (Dunwell *et al.*, 2013).

Sintetizando, la memoria de exposición ambiental en la generación parental puede transmitirse a través de los gametos y dar lugar a la aparición de fenotipos en las generaciones futuras no expuestas (Sharma, 2013). Por tanto, las modificaciones epigenéticas podrían explicar los efectos transgeneracionales observados en *Drosophila* con este trabajo: rearreglo de la cromatina por modificaciones de las histonas, que pueden incluir metilación, o la metilación del DNA, por ejemplo. No obstante, tal explicación necesita directamente evidencia epigenética en futuros estudios.

7.2.4 Efectos de la NDMA sobre la sobrevivencia y la reproducción: repercusiones a nivel poblacional

Aunque los biólogos han propuesto diversidad de definiciones para la eficacia biológica (*fitness*) (Mobley, 2019), en general están de acuerdo con la esencia de la idea. En términos más simples, implica la capacidad de los organismos para sobrevivir y reproducirse en el entorno en el que se encuentran (Orr, 2009). Los resultados que aquí se reportan muestran una reducción de la sobrevivencia de los organismos tratados y una alteración de su capacidad reproductiva por exposición a NDMA, así como la de su descendencia F₁ y F₂ no tratada. Además, durante los experimentos se observó que, aunque algunas moscas lograron desarrollarse, murieron al poco tiempo de emerger de los puparios previo a las cruces, por lo que la sobrevivencia de estos individuos no expuestos también se vio afectada.

El ensayo de reprotoxicidad realizado en este trabajo representa tres posibles escenarios de estrés ambiental; los resultados concuerdan con lo que se ha reportado en cuanto a que los organismos de poblaciones naturales de *Drosophila* sometidos a contaminantes medioambientales presentan una modificación de su eficacia biológica (Tabares, 2016), pero no hay suficiente

evidencia para sugerir que dicha alteración se asocia con la segregación de mutaciones deletéreas que tienden a ser recesivas, mantenerse en heterocigosis y manifestarse con el incremento de la homocigosidad (Ávila & García-Dorado, 2002).

Por otro lado, a diferencia de la fertilidad, en la progenie promedio por familia no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún sistema de cruce al transcurrir las generaciones; sin embargo, con ese biomarcador fue posible identificar que no todas las parejas contribuyeron en la misma medida: unas parejas generaron poca descendencia mientras que otras produjeron mucha progenie. Por ejemplo, en la concentración 7.63 E-05 mM de la progenie F₃ del sistema donde solamente se trató a la hembra se obtuvo 4.3 veces la cantidad de descendencia promedio con respecto al control y provino de dos parejas; pero una aportó cuatro organismos mientras que la otra generó 64. Además, las concentraciones con progenes promedio disminuidas en número tuvieron una tendencia a presentar mayor fertilidad que aquellas donde las descendencias fueron numerosas. Lo descrito anteriormente sugiere que en los efectos observados por la exposición a NDMA también intervienen mecanismos a nivel poblacional.

En una población, las condiciones preexistentes como niveles anteriores de agentes tóxicos pueden aumentar la sensibilidad de algunos individuos. Por lo tanto, la exposición a un agente tóxico puede resultar en un mayor riesgo de efectos adversos para algunos, pero no necesariamente para todos los organismos (EPA, 1996). Esto ayudaría a explicar por qué se encontraron respuestas variables dentro de una misma concentración en las generaciones no tratadas.

Por otro lado, los comportamientos observados con estos biomarcadores de capacidad reproductiva, ante la exposición a concentraciones bajas de NDMA, evidencian que las respuestas no fueron lineales; esto coincide con que los efectos de la toxicidad reproductiva no suelen ser lineales. La respuesta no lineal se basa en mecanismos homeostáticos, compensatorios o adaptativos que deben superarse antes de que se alcance el punto en el que se manifiesta la toxicidad (EPA, 1996).

Ahora bien, la reproducción es costosa para un organismo porque requiere energía que debe desviarse de otros procesos corporales. La historia de vida de un animal es una consecuencia de tres procesos biológicos que compiten por los recursos del cuerpo: reparación (o mantenimiento), crecimiento y reproducción. La inversión en reproducción disminuye inevitablemente la cantidad de energía que se puede destinar en reparación y crecimiento y, como consecuencia, disminuye la

sobrevivencia y el potencial para reproducirse en un futuro (Stulp & Barrett, 2015). En muchas especies generalmente se cree que existe una compensación entre la sobrevivencia y la reproducción (Giaino & Traulsen, 2019). Las compensaciones son los costos que se pagan en términos de *fitness* cuando un cambio beneficioso en una característica se vincula con uno perjudicial en otra (Stearns, 1992).

La siguiente “decisión” a la que se enfrenta un animal una vez que ha alcanzado la fase reproductiva es cuánta descendencia producirá y cuántos recursos invertirá en ella. Cualquier cantidad de energía invertida en la progenie actual conlleva costos en términos de sobrevivencia y generación de descendientes en el futuro (Dijkstra *et al.*, 1990). Es más, el costo de la reproducción, y sus compensaciones asociadas, no solo afectan el propio potencial para reproducirse y la sobrevivencia futura de un individuo, sino también la de su descendencia. Es decir, este costo es multifacético, con efectos tanto intra (disminución de la sobrevivencia de los parentales) como intergeneracionales (reducción de la cantidad de progenie y su sobrevivencia) (Stulp & Barrett, 2015).

En *D. melanogaster* se ha reportado que la resistencia a estrés está correlacionada negativamente con la fecundidad (Chippindale *et al.*, 1996), y que la exposición a estrés da como resultado una compensación entre la sobrevivencia y la reproducción. Un estrés repetido discontinuo incrementa la sobrevivencia debido a que el organismo invierte sus recursos energéticos en reparación y mantenimiento, pero disminuye la energía destinada en reproducción y eso conlleva a una reducción en la cantidad de progenie (Marshall & Sinclair, 2010).

En este trabajo se evidenció que los organismos *D. aldrichi* expuestos a NDMA que sobrevivieron a las concentraciones previas a la letal presentaron una disminución en su capacidad reproductiva (sistema H t x M t). Lo anterior indicaría que el costo a nivel energético por haber sobrevivido al contrarrestar el efecto adverso del compuesto (reparación, mantenimiento y posterior crecimiento) fue alto, e irremediamente se disminuyeron los recursos que pudieron ser destinados para reproducción.

Asimismo, que en algunas concentraciones se hayan recuperado adultos procedentes de solamente una pareja sugiere que la existencia de estos procesos a nivel poblacional favorece la sobrevivencia y la reproducción de los organismos que se encuentran en mejores condiciones, generando una descendencia elevada que compensa a la de aquellos que no pudieron reproducirse.

Los tratamientos con valores bajos de progenie promedio tienden a presentar una mayor fertilidad que los que presentan mayor cantidad de progenie, lo que señalaría que cuando se producen muchos hijos bajo condiciones de estrés por la exposición a un mutágeno como la NDMA, los padres invierten más recursos para incrementar la sobrevivencia de su descendencia a cambio de una disminución de la capacidad reproductiva de esa generación. Por el contrario, cuando se genera una descendencia escasa, los parentales destinan menos energía en la sobrevivencia de su progenie a cambio de que la capacidad reproductiva de esta no disminuya considerablemente (los recursos se irían a reparación de gametos, por ejemplo), esto es, prima la calidad por encima de la cantidad de hijos.

7.3 La exposición a NDMA y su efecto en la expresión de *shd* (*shd*)

Los resultados sugieren que la exposición a 1.56 E-01 mM de NDMA interfiere con la expresión de *shd* y esto se hace evidente a las 146 h durante el estadio de pupa, lo que significa que la acumulación del compuesto por la ingesta de las larvas puede llegar a tal punto que impide la expresión génica de al menos este gen; una de las razones puede ser que este compuesto al ser donador de grupos metilo (-CH₃) induce el silenciamiento génico por metilación cuando se incrementa considerablemente la cantidad de NDMA en el organismo; dicho mecanismo de regulación epigenética se discutió con anterioridad. El silenciamiento de *shd* también estaría acorde con la letalidad en las concentraciones mayores de NDMA debido a la importancia del CYP314A1 en la formación de la 20-hidroxiecdisona (20E), la hormona de muda principal. Hasta donde se conoce, la 20E parece ser producida únicamente por la hidroxilación en el carbono 20 de la Ecdisona (E) por el CYP314A1. Si hay poco o nulo transcrito debido a la modificación de la expresión que parece aplicar la NDMA al gen *shd*, la 20E no estaría disponible en las cantidades que requeriría el organismo (siempre incrementa previo a un cambio de estadio), por consiguiente, su ciclo de vida se vería interrumpido drásticamente.

El que no se haya obtenido producto de amplificación del mRNA que corresponde a *shd* únicamente en la muestra de pupas pudo haber sido consecuencia de varias razones: la RT-PCR no se llevó a cabo con esa muestra en particular por la integridad del mRNA, hubo inhibición o retraso de la expresión del gen, o el gen estaba apagado en ese momento como una condición regular en el individuo. A continuación se discuten cada una de estas posibilidades.

Históricamente, la integridad del RNA se evalúa mediante electroforesis en gel de agarosa a través de la presencia e intensidad de un patrón de bandas definido. El análisis de RNA total en un gel de agarosa debería mostrar dos fragmentos ribosómicos distintos que corresponden a las subunidades ribosomales 18S (~2.0 kb) y 28S (~4.8 kb) en eucariontes o 16S y 23S para rRNA procarionte, y fragmentos adicionales de especies de RNA más pequeñas (Aranda *et al.*, 2012). El rRNA representa aproximadamente el 80% de una muestra de RNA total en comparación con el mRNA que únicamente representa alrededor del 5% (Amaru *et al.*, 2008). Así pues, este método se basa en la suposición de que la calidad y cantidad de rRNA reflejan la del mRNA (Aranda *et al.*, 2012; Charney *et al.*, 2013).

Si bien las bandas nítidas de las subunidades 28S y 18S son indicativas de RNA intacto, está menos claro cómo estas moléculas abundantes y de larga duración reflejan realmente la calidad del mRNA, el cual se renueva mucho más rápidamente (Charney *et al.*, 2013). Respecto a esto último, a pesar de que en la electroforesis no se ven claras estas subunidades ribosomales, indicando degradación del RNA, se obtuvo la amplificación de un fragmento de la subunidad ribosomal *RpL23* en todas las muestras. La amplificación de *shd* fue positiva en todas excepto en la de 146 h tratadas con NDMA. Cabe señalar que se hicieron ensayos de RT-PCR por duplicado y usando diferentes extractos de RNA, lo que hasta cierto punto le da solidez a los resultados.

En ese orden de ideas, la integridad del RNA total debió ser similar entre la muestra de pupas provenientes de larvas expuestas (146 h (+)) y la de no expuestas a NDMA (146 h (-)). Por tanto, si la calidad del RNA fue similar entre muestras que fueron obtenidas con el mismo protocolo, iguales condiciones de extracción, almacenamiento y manipulación, y en la de 146 h (-) sí se amplificó *shd* pero no en la muestra de 146 h (+), dicha diferencia cualitativa puede asociarse con la exposición de los organismos al compuesto. La evidencia inicial sugiere un silenciamiento génico.

El silenciamiento génico en eucariontes es uno de los tantos procesos que regulan la expresión de genes a nivel transcripcional y post-transcripcional. El silenciamiento génico a nivel transcripcional inhibe la transcripción causando una reducción en la síntesis de mRNA. El silenciamiento génico a nivel post-transcripcional consiste en la represión de la traducción o en la desestabilización de los mRNA; este último se refiere a cualquier proceso que disminuya la vida

media de un mRNA, haciéndolo más vulnerable a los procesos de degradación (Garcia-Ruiz *et al.*, 2016).

Con esto en consideración, si el silenciamiento hubiera ocurrido a nivel transcripcional no habría mRNA molde para la retrotranscriptasa y por tanto no se podría haber obtenido cDNA para la PCR. Sin embargo, si el silenciamiento hubiese sido a nivel post-transcripcional, por ejemplo desestabilización de los mRNA, tampoco se habría podido llevar a cabo la retrotranscripción. Por tanto, la evidencia no es suficiente para determinar si el posible silenciamiento génico evitó la aparición del mRNA o propició su degradación.

Si la ausencia de banda fue consecuencia de una inhibición de la expresión y esta hubiese sido irreversible entonces las moscas no podrían haber continuado su desarrollo debido a la importancia del pulso de la 20E en las transiciones entre estadios, pero este no fue el caso, por tanto puede ser que haya ocurrido silenciamiento génico transcripcional, de alguna manera reversible, o que se haya retrasado la expresión del gen. No hay que dejar de lado que la ausencia de mRNA no quiere decir que no haya enzima porque podría ser que, aunque ya no hubiera transcripción, la enzima estuviera presente de etapas anteriores; si así fuera, habría CYP314A1 para catalizar la formación de 20E. Sin embargo, si la enzima residual, suponiendo que poseyera la vida media necesaria para alcanzar estadios tardíos, fuese suficiente para que el organismo continuara su desarrollo, no se habría encontrado letalidad a concentraciones mayores de NDMA; esto abre la posibilidad de una inhibición enzimática.

Esto último genera la interrogante de si las malformaciones que se observaron solamente en los organismos *D. aldrichi* tratados se asocian mayormente con una inhibición enzimática, génica (transcripcional o post-transcripcional) o ambas. No obstante, algunos efectos adversos, como la infertilidad encontrada en los descendientes F₁ y F₂ no expuestos a NDMA, permiten advertir que no solamente una inhibición enzimática puede estar involucrada porque no podría explicarse la aparición de tal efecto adverso en ausencia del inhibidor. Para ayudar a esclarecer el mecanismo involucrado, podrían realizarse ensayos para medir con precisión la regulación: RT-PCR cuantitativo, inmunodetección de CYP314A1 con anticuerpos específicos, actividad enzimática o medir la 20E en organismos expuestos y no tratados con NDMA.

Otra opción es que *shd* estuviese silenciado no por la exposición a NDMA sino que fuese una condición regular de la mosca; no obstante, la evidencia obtenida en este trabajo mostró que

en pupas de 146 h el gen estaba “encendido”, y esto concuerda con lo reportado en la literatura donde asocian la expresión de *shade* en ese tiempo con la importancia del pulso de 20E durante la metamorfosis (Warren *et al.* 2002, 2004; Petryk *et al.*, 2003; Niwa *et al.*, 2004; Namiki *et al.*, 2005; Parvy *et al.*, 2005; Ono *et al.*, 2006; Warren *et al.*, 2006; Rewitz *et al.*, 2007), de ahí que se descarte esa posibilidad.

Ahora bien, cabe preguntarse si a la concentración de 1.56 E-01 mM la NDMA interfiere con la expresión de *shd* en algún punto entre las 115 y 146 h, y la 20E es indispensable para la metamorfosis del organismo, incluyendo la diferenciación de los discos imagales en estadio de pupa, entonces ¿por qué la mosca sobrevive? Para responder a esta pregunta se necesitaría observar el perfil de la 20E durante el ciclo de vida de *D. melanogaster* (Fig. 1.5): si se detallan los picos de 20E, estos se alcanzan en los organismos a esas edades, pero esto no implica que sean las cantidades mínimas que requieren para avanzar en su desarrollo. Si se modifica la expresión del gen que codifica la enzima que cataliza la conversión de E en 20E a edades tardías, entendiéndose cercanas al estadio de pupa, el organismo igual habría acumulado suficiente 20E para que se forme el imago dentro del pupario; sin embargo, la posible disminución de 20E puede impactar la formación de las estructuras que aún no se hayan diferenciado.

De hecho, al ser el disco genital (que da lugar a la genitalia y la analia) lo último en diferenciarse del adulto, lo dicho anteriormente apoyaría el hecho de la marcada especificidad que parece tener la NDMA para que haya malformación de estas estructuras evidenciada en *D. aldrichi*, lo que repercutiría en, por ejemplo, la incompatibilidad para la cópula. Aquí toma relevancia la fertilidad como biomarcador de este disruptor endocrino de mamíferos en *Drosophila*.

Otro aspecto interesante a relacionar con la alteración de la expresión de *shade* sería el retraso en el desarrollo: si consideramos que el organismo necesita una cantidad de 20E mínima para continuar su ciclo de vida, y si se expone a una concentración de NDMA que interfiera y por tanto retrase la producción del CYP314A1 pero no a edades tempranas, se podría esperar que el organismo tarde en alcanzar los niveles de 20E, respecto a uno que no haya sido expuesto, pero que de igual forma consiga avanzar en su ciclo de vida (Fig. 7.2).

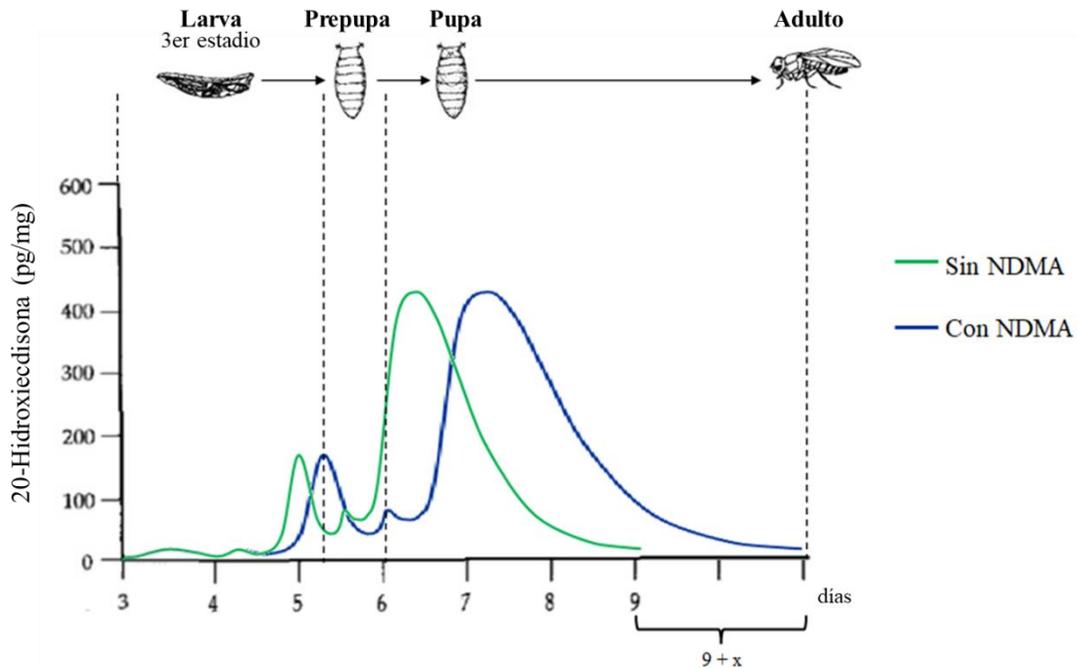


Fig. 7.2 El retraso en el desarrollo observado en *Drosophila* cuando se aplica el tratamiento con NDMA, parece estar ligado a la cantidad de 20E que requiere el organismo en cada estadio para continuar su ciclo de vida.

En el caso de un insecto holometábolo como *D. aldrichi*, así se lleve a cabo la fecundación de manera exitosa puede haber letalidad en momentos clave del ciclo de vida de las moscas: a nivel embrionario, en la ecdisis para la transición entre estadios larvales, en el paso de larva estadio tres a pupa, en el pupario mientras se lleva a cabo la diferenciación de las nuevas estructuras (metamorfosis) muriendo el adulto farato, en el momento de la emergencia del imago o inclusive el adulto puede morir al poco tiempo de haber completado su desarrollo y sin haberse reproducido.

Todas las transiciones del desarrollo, como larva a larva, larva a pupa y pupa a adulto, son iniciadas por 20E (Dubrovsky, 2005). El pulso tardío del tercer estadio de 20E se propaga a través de una jerarquía reguladora genética, que define el inicio de la transición metamórfica. 20E se une al receptor heterodímero compuesto por la subunidad del receptor de ecdisona (EcR) y la subunidad Ultraspiracle (USP) (20E+EcR/USP) y activa directamente un pequeño grupo de genes tempranos: *BR-C*, *E74* y *E75*. Los productos proteicos de los genes tempranos activan un grupo de genes tardíos que controlan diferentes aspectos de la metamorfosis, como la histólisis de los tejidos larvarios, la diferenciación de los tejidos imagales y la producción de la cutícula de la pupa (Andres

& Thummel, 1992; Thummel, 1995, 1996; Baehrecke, 1996; Thummel, 2001; Dubrovsky, 2005; Quinn *et al.*, 2012; Ou & King-Jones, 2013).

Uno de los tantos genes que se activan por la señalización que inicia la 20E es $\beta FTZ-F1$. Este gen se requiere para la transición prepupa-pupa durante la metamorfosis de *Drosophila* y su mutación impide que el adulto farato emerja o que se termine de desarrollar dentro del pupario (Thummel, 2001).

Al comparar el efecto de la NDMA en las dos especies, *D. melanogaster* y *D. aldrichi*, a dosis altas también puede verse cómo la alteración en la expresión de *shd* estaría ligado a la cantidad de NDMA consumida, acumulada, excretada y al tiempo en que tarda el organismo en llevar esto a cabo. En la figura 6.3 puede observarse que en la única concentración letal para *D. melanogaster* de las estudiadas (5 mM), sí se llegó al estadio de pupa pero el imago nunca se desarrolló completo ni emergió (Fig. 6.3, izquierda, círculo rojo), esto posiblemente porque el organismo no alcanzó la cantidad de 20E necesaria para diferenciar todos sus discos imagales (Fig. 7.3).

Por el contrario, en *D. aldrichi* es distinto; debido a que el ciclo de vida de esta especie es más largo que el de *D. melanogaster*, la larva de tercer estadio consumió durante más tiempo la NDMA. Lo que pudo haber ocurrido es que se acumuló y alcanzó más rápido la cantidad de NDMA que interfiere con la expresión de *shd* y, por tanto, con la generación de la ecdisona 20-hidroxilasa. La acumulación de NDMA en la concentración 5 mM fue tal que las larvas nunca llegaron a pupar (Fig. 6.3, derecha, círculo azul); podría decirse que no alcanzaron la cantidad de 20E necesaria para hacer la transición de larva estadio tres a prepupa (Fig. 7.4) por el posible bloqueo o retraso de la expresión del gen que codifica la enzima. Solamente cuando la concentración disminuyó a 1.5 mM fue posible que los organismos de *D. aldrichi* consiguieran llegar a la 20E necesaria para avanzar en su ciclo de vida (pupar) pero no fue suficiente para desarrollarse por completo y por tanto murieron (Fig. 6.3, derecha, círculo rojo; Fig. 7.5).

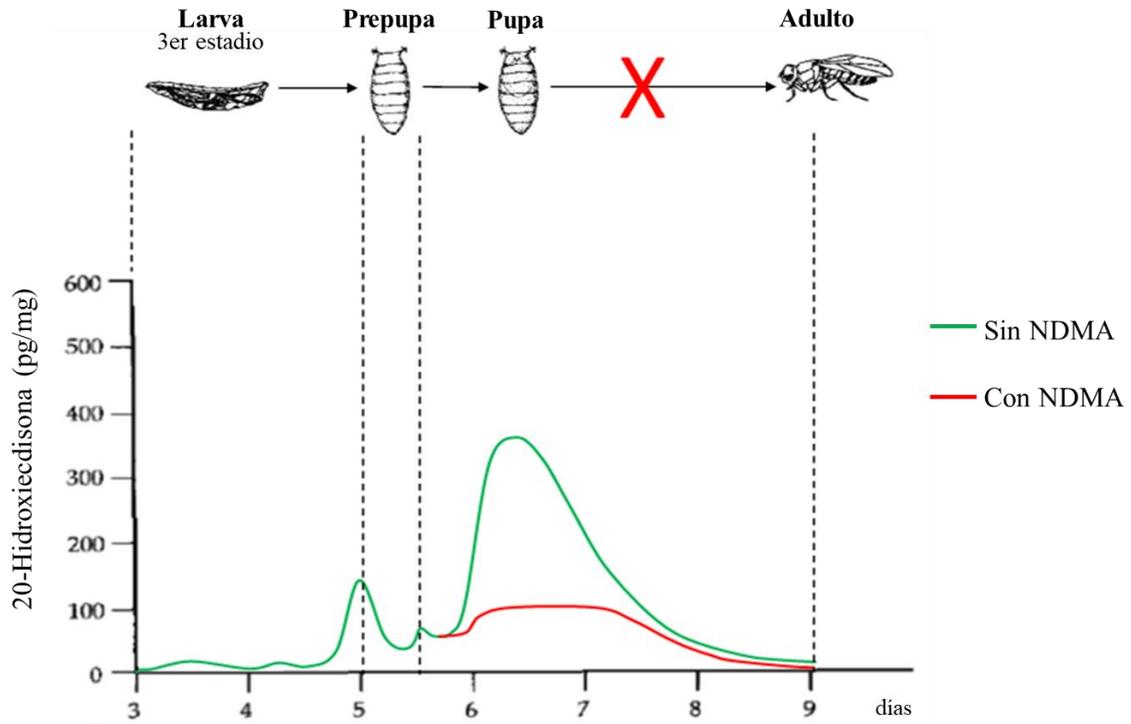


Fig. 7.3 Modelo que explicaría la inhibición del desarrollo de *D. melanogaster* a 5 mM de NDMA.

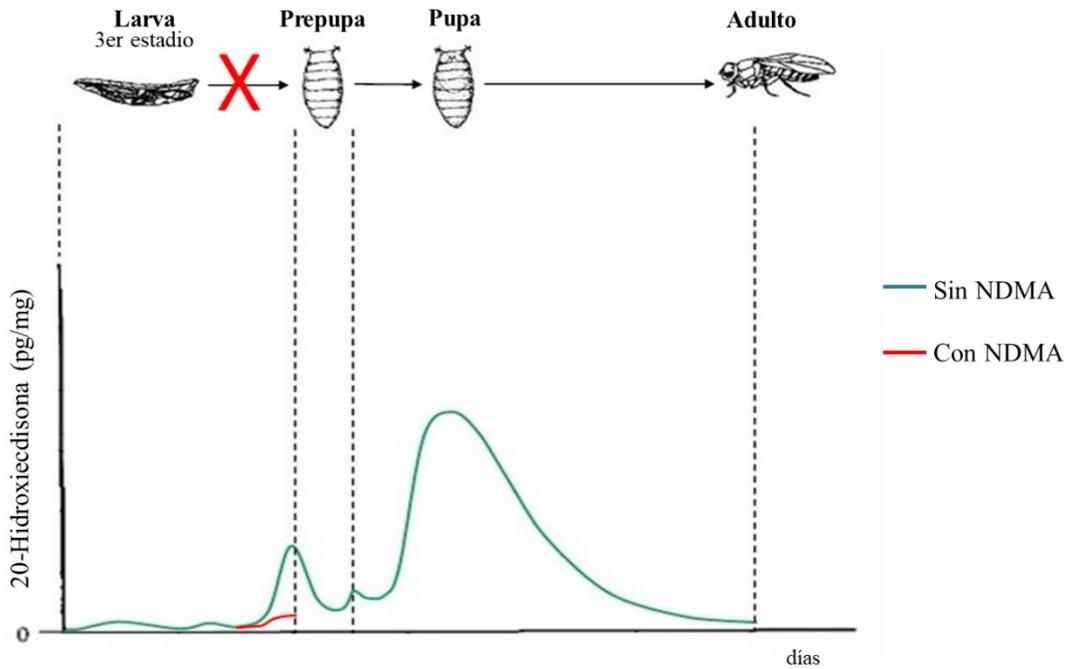


Fig. 7.4 Modelo que explicaría el bloqueo en el desarrollo de *D. aldrichi* a 5 mM de NDMA.

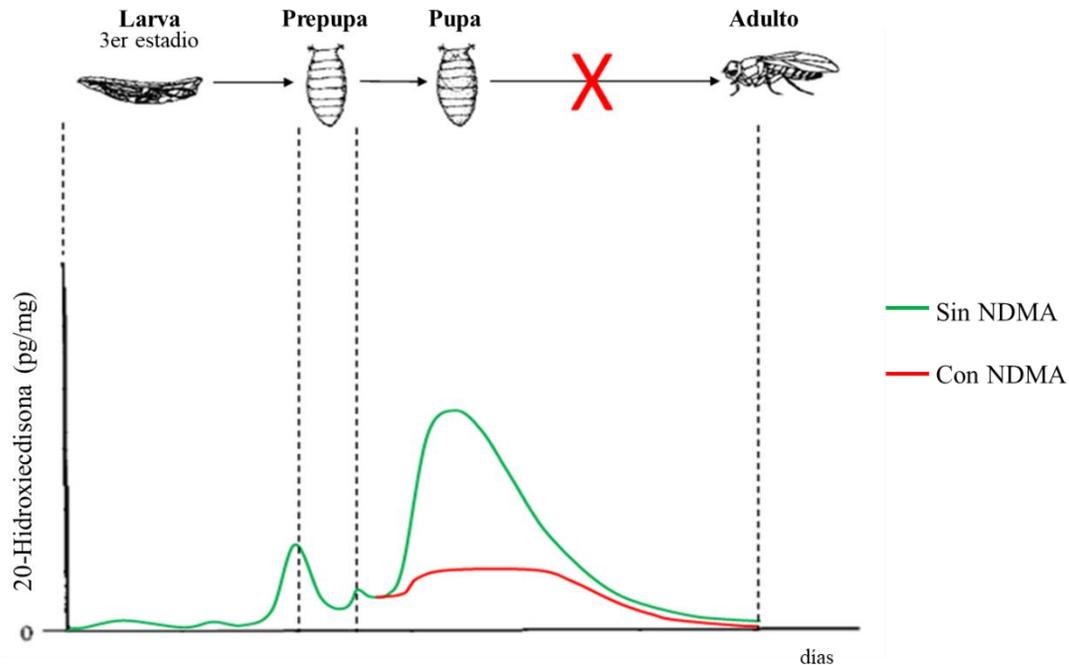


Fig. 7.5 Modelo que explicaría la interrupción en el desarrollo de *D. aldrichi* a 1.5 mM de NDMA. Nótese que la interrupción en el mismo punto del ciclo de vida (pupa a adulto) ocurre a una concentración menor respecto a *D. melanogaster*.

Aunque la evidencia sugiere que la exposición a NDMA interfiere con la expresión de *shade*, no es suficiente para determinar si lo que ocurre es un silenciamiento transcripcional, postranscripcional o un retraso. Por tanto, en futuros estudios podrían tomarse muestras expuestas a 1.56 E-01 mM de diferentes edades para evaluar si la expresión del gen se atrasa o definitivamente se apaga. El rango en el que pudo haber silenciamiento o apagado es amplio, por tanto habría que tomar muestras en tiempos intermedios entre 115 y 146 h y otras después de las 146 h para determinar si hay o no expresión.

Para finalizar, los efectos encontrados en *Drosophila* con este trabajo, por exposición a un disruptor hormonal de mamíferos, son similares a aquellos reportados en este último grupo. Los efectos en roedores, después de la exposición a los disruptores endocrinos durante el desarrollo, pueden comprender alteraciones en la genitalia (incluida la distancia ano-genital), desarrollo inhibido (femenino) o retenido (masculino) del pezón, comportamiento sexual afectado, retraso o aceleración del inicio de la pubertad y fertilidad reducida (Gray *et al.*, 1985, 1994, 1995; Gray & Ostby, 1995; Kelce *et al.*, 1995). Esto apoya la idea de que *Drosophila* puede ser un modelo complementario a mamíferos para detectar la actividad de disruptores hormonales de mamíferos;

asimismo, la evidencia inicial de una posible interrupción de la expresión de *Cyp314a1* por exposición a la NDMA, invita a seguir en la búsqueda de otros biomarcadores que sean sensibles a la presencia de dichos compuestos en la mosca.

8. CONCLUSIONES

- La aparente mayor sensibilidad de *D. aldrichi* a la NDMA que la de *D. melanogaster* probablemente se debe a la diferencia en la capacidad para metabolizar xenobióticos y el tiempo de exposición al compuesto que conlleva a una diferencia en la cantidad de NDMA presente en los organismos.

- La evidencia permite concluir que la exposición a una concentración letal de NDMA para los organismos detiene, en distintos puntos, el ciclo de vida en *Drosophila* y el momento en el que ocurre la interrupción depende directamente de la concentración del compuesto (cantidad biológicamente activa), ya que con el incremento en la concentración de NDMA la muerte de las moscas ocurrió en un punto más temprano de su ciclo.

- La NDMA afecta el tiempo de desarrollo tanto de *D. melanogaster* como de *D. aldrichi*. En la primera especie se observó una tendencia a retrasar el desarrollo. En la segunda se evidenció tanto aceleración como retraso en el desarrollo, estando la aceleración probablemente relacionada en mayor medida con la inducción de malformaciones en ambos sexos. Los efectos mencionados se acentuaron con el incremento de la concentración.

- El efecto de la NDMA aparece tanto en machos como en hembras, parece ser específico de la terminalia y afecta la capacidad reproductiva de estos organismos e incluso la de su descendencia F₁ y F₂ no tratada, por lo que la NDMA es un disruptor hormonal con efectos multi y transgeneracionales en *Drosophila*.

- *Drosophila* es un modelo que permite identificar satisfactoriamente *in vivo* la actividad del disruptor endocrino de mamíferos NDMA. Por la exposición a este compuesto se encontraron respuestas en las moscas a través de los biomarcadores de fertilidad y cantidad de progenie (asociados directamente con la capacidad reproductiva), malformaciones de la terminalia externa (genitalia y analia) y rotaciones de la genitalia evidenciada en machos, además de una probable

interrupción en la ruta de biosíntesis de ecdisteroides de la mosca, siendo el gen *shade* uno de los posibles blancos y, en consecuencia, el cambio en la expresión de este gen podría ser un biomarcador útil en la identificación de sustancias con actividad de disruptores endocrinos. Al existir, en la mosca, modificaciones de los niveles de los biomarcadores en respuesta a la acción de un disruptor endocrino de mamíferos, además de estar estas alteraciones dentro de las esperadas por la actividad de disruptores hormonales de mamíferos, se concluye que *Drosophila* puede ser un modelo viable, confiable y complementario a mamíferos para la detección de químicos disruptores endocrinos de mamíferos. Para calibrar el modelo y estandarizar los biomarcadores en *Drosophila* se requerirá de trabajos con otros disruptores conocidos de mamíferos, información que se espera validará los resultados recopilados con esta investigación.

9. REFERENCIAS

- Aldaz, S., & Escudero, L. M. (2010). Imaginal discs. *Current biology*, 20(10), R429–R431. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.03.010>
- Amaru, R., Peñaloza, R., Miguez, H., Torres, G., & Cuevas, H. (2008). UMSAgen, método para la extracción simultánea de RNA y DNA para diagnóstico molecular. *Cuadernos Hospital de Clínicas*, 53(1), 38-43. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1652-67762008000100007&lng=es&tlng=es
- Andrés, A. J., & Thummel, C. S. (1992). Hormones, puffs and flies: the molecular control of metamorphosis by ecdysone. *Trends in genetics: TIG*, 8(4), 132–138. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(92\)90371-A](https://doi.org/10.1016/0168-9525(92)90371-A)
- Aranda, P. S., LaJoie, D. M., & Jorcyk, C. L. (2012). Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*, 33(2), 366–369. <https://doi.org/10.1002/elps.201100335>
- Arroyo, E. (2019). *Evaluación de la exposición a genotóxicos en células germinales femeninas de Drosophila melanogaster y su impacto en la descendencia* [Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. https://ru.dgb.unam.mx/handle/DGB_UNAM/TES01000795005
- ATSDR. (1989). Toxicological profile for *N*-nitrosodimethylamine. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Public Health Service. 1-127 pp. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/94000VFH.PDF?Dockey=94000VFH.PDF>
- ATSDR. (2022). Toxicological profile for *N*-nitrosodimethylamine (Draft for Public Comment). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. 1-216 pp. <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp141.pdf>
- Ávila, V., & García-Dorado, A. (2002). The effects of spontaneous mutation on competitive fitness in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology*, 15(4), 561-566. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2002.00421.x>
- Baehrecke, E. H. (1996). Ecdysone signaling cascade and regulation of *Drosophila* metamorphosis. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 33(3-4), 231–244. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6327\(1996\)33:3/4<231::AID-ARCH5>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6327(1996)33:3/4<231::AID-ARCH5>3.0.CO;2-V)
- Bainbridge, S. P., & Bownes, M. (1981). Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *Journal of embryology and experimental morphology*, 66, 57–80. <https://doi.org/10.1242/dev.66.1.57>
- Bartsch, H., Hietanen, E., & Malaveille, C. (1989). Carcinogenic nitrosamines: free radical aspects of their action. *Free radical biology & medicine*, 7(6), 637–644. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(89\)90144-5](https://doi.org/10.1016/0891-5849(89)90144-5)
- Bayer, C. (1996). Gene regulation in imaginal disc and salivary gland development during *Drosophila* metamorphosis. *Metamorphosis: Postembryonic reprogramming of gene*

- expression in amphibian and insect cells*. En Gilbert, L., Tata, J. & Atkinson, B. *Cell Biology*. 321–361. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012283245-1/50011-7>
- Beira, J. V., & Paro, R. (2016). The legacy of *Drosophila* imaginal discs. *Chromosoma*, 125(4), 573–592. <https://doi.org/10.1007/s00412-016-0595-4>
- Beranek, D. T. (1990). Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutation research*, 231(1), 11–30. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(90\)90173-2](https://doi.org/10.1016/0027-5107(90)90173-2)
- Blair, S. S. (2009). Imaginal discs. *Encyclopedia of insects*. En Resh, V. & Cardé, R. 489-492. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00139-9>
- Boffelli, D., Takayama, S., & Martin, D. I. (2014). Now you see it: genome methylation makes a comeback in *Drosophila*. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 36(12), 1138–1144. <https://doi.org/10.1002/bies.201400097>
- Brehm, E., & Flaws, J. A. (2019). Transgenerational Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on Male and Female Reproduction. *Endocrinology*, 160(6), 1421–1435. <https://doi.org/10.1210/en.2019-00034>
- Brendler, S. Y., Tompa, A., Hutter, K. F., Preussmann, R., & Pool-Zobel, B. L. (1992). *In vivo* and *in vitro* genotoxicity of several *N*-nitrosamines in extrahepatic tissues of the rat. *Carcinogenesis*, 13(12), 2435–2441. <https://doi.org/10.1093/carcin/13.12.2435>
- Brouwer, A., Ahlborg, U. G., Van den Berg, M., Birnbaum, L. S., Boersma, E. R., Bosveld, B., ... Winneke, G. (1995). Functional aspects of developmental toxicity of polyhalogenated aromatic hydrocarbons in experimental animals and human infants. *European journal of pharmacology*, 293(1), 1–40. [https://doi.org/10.1016/0926-6917\(95\)90015-2](https://doi.org/10.1016/0926-6917(95)90015-2)
- Brueggemeier, R. W., Hackett, J. C., & Diaz-Cruz, E. S. (2005). Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Endocrine reviews*, 26(3), 331-345. <https://doi.org/10.1210/er.2004-0015>
- Bryant, P. J., & Schmidt, O. (1990). The genetic control of cell proliferation in *Drosophila* imaginal discs. *Journal of cell science. Supplement*, 13, 169–189. https://doi.org/10.1242/jcs.1990.supplement_13.16
- Buescher, J. L., Musselman, L. P., Wilson, C. A., Lang, T., Keleher, M., Baranski, T. J., & Duncan, J. G. (2013). Evidence for transgenerational metabolic programming in *Drosophila*. *Disease models & mechanisms*, 6(5), 1123–1132. <https://doi.org/10.1242/dmm.011924>
- Bulger, W. H., Kupfer, D. (1985). Estrogenic activity of pesticides and other xenobiotics on the uterus and male reproductive tract. In: Thomas, J.A., Korach, K.S., McLachlan, J.A. *Endocrine Toxicology*. Raven Press, New York. pp. 1-33.
- Buszczak, M., & Cooley, L. (2000). Eggs to die for: cell death during *Drosophila* oogenesis. *Cell death and differentiation*, 7(11), 1071–1074. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400755>
- Byskov, A. G., Hoyer, P. E. (1994). Embryology of mammalian gonads and ducts. In: Knobil, E., Neill, J.D. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York. pp. 487-540.

- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S., & Morata, G. (1996). Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5285), 252–255. <https://doi.org/10.1126/science.274.5285.252>
- Capuano, F., Mülleder, M., Kok, R., Blom, H. J., & Ralser, M. (2014). Cytosine DNA methylation is found in *Drosophila melanogaster* but absent in *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, and other yeast species. *Analytical chemistry*, 86(8), 3697–3702. <https://doi.org/10.1021/ac500447w>
- Charney, D. S., Buxbaum, J. D., Sklar, P., & Nestler, E. J. (Eds.). (2013). *Neurobiology of mental illness*. Oxford University Press.
- Chávez, V. M., Marqués, G., Delbecque, J. P., Kobayashi, K., Hollingsworth, M., Burr, J., Natzle, J. E., & O'Connor, M. B. (2000). The *Drosophila disembodied* gene controls late embryonic morphogenesis and codes for a cytochrome P450 enzyme that regulates embryonic ecdysone levels. *Development (Cambridge, England)*, 127(19), 4115–4126. <https://doi.org/10.1242/dev.127.19.4115>
- Chifiriuc, M. C., Ratiu, A. C., Popa, M., & Ecovoiu, A. A. (2016). Drosophotoxicology: An Emerging Research Area for Assessing Nanoparticles Interaction with Living Organisms. *International journal of molecular sciences*, 17(2), 36. <https://doi.org/10.3390/ijms17020036>
- Chippindale, A. K., Chu, T. J., & Rose, M. R. (1996). Complex trade-offs and the evolution of starvation resistance in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 50(2), 753–766. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1996.tb03885.x>
- Clark, A. M. (1982). The use of larval stages of *Drosophila* in screening for some naturally occurring mutagens. *Mutation Research*, 92(1-2), 89–97. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(82\)90212-3](https://doi.org/10.1016/0027-5107(82)90212-3)
- Clough, E., Moon, W., Wang, S., Smith, K., & Hazelrigg, T. (2007). Histone methylation is required for oogenesis in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 134(1), 157–165. <https://doi.org/10.1242/dev.02698>
- Clough, E., Tedeschi, T., & Hazelrigg, T. (2014). Epigenetic regulation of oogenesis and germ stem cell maintenance by the *Drosophila* histone methyltransferase Eggless/dSetDB1. *Developmental biology*, 388(2), 181–191. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.01.014>
- Coutelis, J. B., Géminard, C., Spéder, P., Suzanne, M., Petzoldt, A. G., & Noselli, S. (2013). *Drosophila* left/right asymmetry establishment is controlled by the Hox gene *abdominal-B*. *Developmental cell*, 24(1), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.11.013>
- Cranna, N., & Quinn, L. (2009). Impact of steroid hormone signals on *Drosophila* cell cycle during development. *Cell division*, 4(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-4-3>
- Crews, C. (2014). Processing Contaminants: *N*-Nitrosamines. In: *Encyclopedia of Food Safety (Volume 2)* (pp. 409–415). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00217-1>

- De Celis, J. F., García-Bellido, A., Maloy, S., & Hughes, K. (2013). Imaginal Disks. *Brenner's Encyclopedia of Genetics, 2nd ed.* Academic Press, Cambridge, USA, 19-23. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00769-5>.
- De Loof, A. (2006). Ecdysteroids: the overlooked sex steroids of insects? Males: the black box. *Insect Science, 13*(5), 325- 338. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2006.00101.x>
- De Loof, A., & Huybrechts, R. (1998). "Insects do not have sex hormones": a myth?. *General and comparative endocrinology, 111*(3), 245–260. <https://doi.org/10.1006/gcen.1998.7101>
- de Navas, L., Foronda, D., Suzanne, M., & Sánchez-Herrero, E. (2006). A simple and efficient method to identify replacements of P-lacZ by P-Gal4 lines allows obtaining Gal4 insertions in the bithorax complex of *Drosophila*. *Mechanisms of development, 123*(11), 860–867. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2006.07.010>
- Del Saz, D. (2017). *Estudio de la regulación de la proliferación y la formación de patrón en el desarrollo del abdomen por los genes Hox Ultrabithorax y abdominal-A de Drosophila melanogaster* [Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Madrid]. <http://hdl.handle.net/10486/665271>
- Despic, V., Dejung, M., Gu, M., Krishnan, J., Zhang, J., Herzel, L., ... & Neugebauer, K. M. (2017). Dynamic RNA-protein interactions underlie the zebrafish maternal-to-zygotic transition. *Genome research, 27*(7), 1184–1194. <https://doi.org/10.1101/gr.215954.116>
- Dew-Budd, K., Jarnigan, J., & Reed, L. K. (2016). Genetic and Sex-Specific Transgenerational Effects of a High Fat Diet in *Drosophila melanogaster*. *PloS one, 11*(8), e0160857. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160857>
- Dijkstra, C., Bult, A., Bijlsma, S., Daan, S., Meijer, T., & Zijlstra, M. (1990). Brood Size Manipulations in the Kestrel (*Falco tinnunculus*): Effects on Offspring and Parent Survival. *Journal of Animal Ecology, 59*(1), 269–285. <https://doi.org/10.2307/5172>
- Ding, L., Cao, J., Lin, W., Chen, H., Xiong, X., Ao, H., Yu, M., Lin, J., & Cui, Q. (2020). The Roles of Cyclin-Dependent Kinases in Cell-Cycle Progression and Therapeutic Strategies in Human Breast Cancer. *International journal of molecular sciences, 21*(6), 1960. <https://doi.org/10.3390/ijms21061960>
- Dubrovsky, E. B. (2005). Hormonal cross talk in insect development. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM, 16*(1), 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2004.11.003>
- Dunwell, T. L., & Pfeifer, G. P. (2014). *Drosophila* genomic methylation: new evidence and new questions. *Epigenomics, 6*(5), 459–461. <https://doi.org/10.2217/epi.14.46>
- Dunwell, T. L., McGuffin, L. J., Dunwell, J. M., & Pfeifer, G. P. (2013). The mysterious presence of a 5-methylcytosine oxidase in the *Drosophila* genome: possible explanations. *Cell cycle (Georgetown, Tex.), 12*(21), 3357–3365. <https://doi.org/10.4161/cc.26540>
- Dworkin, M. B., & Dworkin-Rastl, E. (1990). Functions of maternal mRNA in early development. *Molecular reproduction and development, 26*(3), 261–297. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080260310>

- EPA. (1996). Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency, 61(212), 56274–56322. https://www.epa.gov/sites/default/files/2014-11/documents/guidelines_repro_toxicity.pdf
- EPA. (2017). Technical Fact Sheet – N-Nitroso-dimethylamine (NDMA), November. United States Environmental Protection Agency, 1-8 pp. https://www.epa.gov/sites/production/files/2017-10/documents/ndma_fact_sheet_update_9-15-17_508.pdf
- Estrada, B., Casares, F., & Sánchez-Herrero, E. (2003). Development of the genitalia in *Drosophila melanogaster*. *Differentiation; research in biological diversity*, 71(6), 299–310. <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2003.03017.x>
- Fernández-Alba, A. R., & Agüera, A. (2005). Nitrosamines. In: Encyclopedia of Analytical Science (*Second Edition*) (pp. 197-202). <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00402-7>
- Fernández-Díez, C., González-Rojo, S., Lombó, M., & Herráez, M. P. (2016). Impact of sperm DNA damage and oocyte-repairing capacity on trout development. *Reproduction (Cambridge, England)*, 152(1), 57–67. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0077>
- Ferreira, D. W., & Allard, P. (2015). Models of germ cell development and their application for toxicity studies. *Environmental and molecular mutagenesis*, 56(8), 637–649. <https://doi.org/10.1002/em.21946>
- Follette, P. J., & O'Farrell, P. H. (1997). Cdks and the *Drosophila* cell cycle. *Current opinion in genetics & development*, 7(1), 17-22. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(97\)80104-9](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(97)80104-9)
- Foronda, D., Estrada, B., de Navas, L., & Sánchez-Herrero, E. (2006). Requirement of *abdominal-A* and *Abdominal-B* in the developing genitalia of *Drosophila* breaks the posterior downregulation rule. *Development (Cambridge, England)*, 133(1), 117–127. <https://doi.org/10.1242/dev.02173>
- Freeland, D. E., & Kuhn, D. T. (1996). Expression patterns of developmental genes reveal segment and parasegment organization of *D. melanogaster* genital discs. *Mechanisms of development*, 56(1-2), 61–72. [https://doi.org/10.1016/0925-4773\(96\)00511-4](https://doi.org/10.1016/0925-4773(96)00511-4)
- Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., Molloy, P. L., & Paul, C. L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(5), 1827–1831. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.5.1827>
- García-Ruiz, H., García-Ruiz, M. T., Gabriel-Peralta, S. M., Miravel-Gabriel, C. B., & El-Mounadi, K. (2016). Mechanisms, applications, and perspectives of antiviral RNA silencing in plants. *Revista mexicana de fitopatología*, 34(3), 286-307. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1606-8>
- Gellert, R. J. (1978). Kepone, mirex, dieldrin, and aldrin: estrogenic activity and the induction of persistent vaginal estrus and anovulation in rats following neonatal treatment. *Environmental research*, 16(1-3), 131–138. [https://doi.org/10.1016/0013-9351\(78\)90150-0](https://doi.org/10.1016/0013-9351(78)90150-0)

- George, F. W., Wilson, J. D. (1994). Sex determination and differentiation. In: Knobil, E., Neill, J.D. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York. pp. 3-28.
- Gaiimo, S., & Traulsen, A. (2019). Generation Time Measures the Trade-Off between Survival and Reproduction in a Life Cycle. *The American naturalist*, 194(2), 285–290. <https://doi.org/10.1086/704155>
- Gilbert, L. I. (2004). Halloween genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and cellular endocrinology*, 215(1-2), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.11.003>
- Gilbert, L. I. (2008). *Drosophila* is an inclusive model for human diseases, growth and development. *Molecular and cellular endocrinology*, 293(1-2), 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.02.009>
- Gillott C. (2003). Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. *Annual review of entomology*, 48, 163–184. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.48.091801.112657>
- Giusti, R. M., Iwamoto, K., & Hatch, E. E. (1995). Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects. *Annals of internal medicine*, 122(10), 778–788. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-122-10-199505150-00008>
- Gorfinkiel, N., Sánchez, L., & Guerrero, I. (1999). *Drosophila* terminalia as an appendage-like structure. *Mechanisms of development*, 86(1-2), 113–123. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(99\)00122-7](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(99)00122-7)
- Goss, P. E., & Strasser, K. (2001). Aromatase inhibitors in the treatment and prevention of breast cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 19(3), 881–894. <https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.3.881>
- Goto, Y., Matsuda, T., Ito, K., Huh, N. H., Thomale, J., Rajewsky, M. F., Hayatsu, H., & Negishi, T. (1999). Mutagenicities of *N*-nitrosodimethylamine and *N*-nitrosodiethylamine in *Drosophila* and their relationship to the levels of O-alkyl adducts in DNA. *Mutation research*, 425(1), 125–134. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(99\)00032-9](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(99)00032-9)
- Gray, L. E. & Ostby, J. S. (1995). *In Utero* 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) alters reproductive morphology and function in female rat offspring. *Toxicology and applied pharmacology*, 133(2), 285–294. <https://doi.org/10.1006/taap.1995.1153>
- Gray, L. E. (1991). Delayed effects on reproduction following exposure to toxic chemicals during critical periods of development. In: Cooper, R.L., Goldman, J.M., Harbin, T.J. *Aging and Environmental Toxicology: Biological and Behavioral Perspectives*. Johns Hopkins University Press, Baltimore. pp. 183-210.
- Gray, L. E., Ferrell, J. M., & Ostby, J. S. (1985). Alteration of behavioral sex differentiation by exposure to estrogenic compounds during a critical neonatal period: effects of zearalenone, methoxychlor, and estradiol in hamsters. *Toxicology and applied pharmacology*, 80(1), 127–136. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(85\)90107-3](https://doi.org/10.1016/0041-008x(85)90107-3)
- Gray, L. E., Kelce, W. R., Monosson, E., Ostby, J. S., & Birnbaum, L. S. (1995). Exposure to TCDD during development permanently alters reproductive function in male Long Evans

- rats and hamsters: reduced ejaculated and epididymal sperm numbers and sex accessory gland weights in offspring with normal androgenic status. *Toxicology and applied pharmacology*, 131(1), 108–118. <https://doi.org/10.1006/taap.1995.1052>
- Gray, L. E., Ostby, J. S., & Kelce, W. R. (1994). Developmental effects of an environmental antiandrogen: the fungicide vinclozolin alters sex differentiation of the male rat. *Toxicology and applied pharmacology*, 129(1), 46–52. <https://doi.org/10.1006/taap.1994.1227>
- Gray, L. E., Ostby, J., Ferrell, J., Rehnberg, G., Linder, R., Cooper, R., ... Laskey, J. (1989). A dose-response analysis of methoxychlor-induced alterations of reproductive development and function in the rat. *Fundamental and applied toxicology: official journal of the Society of Toxicology*, 12(1), 92–108. [https://doi.org/10.1016/0272-0590\(89\)90065-1](https://doi.org/10.1016/0272-0590(89)90065-1)
- Greiner, S., Sobanski, J., & Bock, R. (2015). Why are most organelle genomes transmitted maternally?. *Bioessays*, 37(1), 80-94. <https://doi.org/10.1002/bies.201400110>
- Hagmann, M., Bruggmann, R., Xue, L., Georgiev, O., Schaffner, W., Rungger, ... & Gerster, T. (1998). Homologous recombination and DNA-end joining reactions in zygotes and early embryos of zebrafish (*Danio rerio*) and *Drosophila melanogaster*. *Biological chemistry*, 379(6), 673–681. <https://doi.org/10.1515/bchm.1998.379.6.673>
- Harrison, P. T. C., Humfrey, C. D. N., Litchfield, M., Peakall, D., Shuker, L. K. (1995). IEH assessment on Environmental Oestrogens: Consequences to Human Health and Wildlife. MRC Institute for Environment and Health. Leicester, UK. 107 pp.
- Hartenstein, V. (1993). *Atlas of Drosophila Development* (Vol. 328). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://www.sdbonline.org/sites/fly/atlas/00atlas.htm>
- Hecht, S. S., Trushin, N., Castonguay, A., & Rivenson, A. (1986). Comparative tumorigenicity and DNA methylation in F344 rats by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and N-nitrosodimethylamine. *Cancer research*, 46(2), 498–502. <https://aacrjournals.org/cancerres/article/46/2/498/490568/Comparative-Tumorigenicity-and-DNA-Methylation-in>
- Heifetz, Y., Lung, O., Frongillo, E. A., Jr, & Wolfner, M. F. (2000). The *Drosophila* seminal fluid protein Acp26Aa stimulates release of oocytes by the ovary. *Current biology*, 10(2), 99–102. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00288-8](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00288-8)
- Hennig, W., & Weyrich, A. (2013). Histone modifications in the male germ line of *Drosophila*. *BMC developmental biology*, 13, 7. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-13-7>
- Hero, M., Wickman, S., & Dunkel, L. (2006). Treatment with the aromatase inhibitor letrozole during adolescence increases near-final height in boys with constitutional delay of puberty. *Clinical endocrinology*, 64(5), 510–513. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2006.02499.x>
- Hosken, D. J., & Hodgson, D. J. (2014). Why do sperm carry RNA? Relatedness, conflict, and control. *Trends in ecology & evolution*, 29(8), 451–455. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.05.006>

- Huang, A. M., Rehm, E. J., & Rubin, G. M. (2009). Quick preparation of genomic DNA from *Drosophila*. *Cold Spring Harbor protocols*, 2009(4), pdb.prot5198. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5198>
- Iga, M., & Kataoka, H. (2012). Recent studies on insect hormone metabolic pathways mediated by cytochrome P450 enzymes. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 35(6), 838–843. <https://doi.org/10.1248/bpb.35.838>
- Jaklevic, B. R., & Su, T. T. (2004). Relative contribution of DNA repair, cell cycle checkpoints, and cell death to survival after DNA damage in *Drosophila* larvae. *Current biology: CB*, 14(1), 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.12.032>
- Jeltsch, A., Nellen, W., & Lyko, F. (2006). Two substrates are better than one: dual specificities for Dnmt2 methyltransferases. *Trends in biochemical sciences*, 31(6), 306–308. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.04.005>
- Jorquera, R., Castonguay, A., & Schuller, H. M. (1993). Effects of age and ethanol on DNA single-strand breaks and toxicity induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone or *N*-nitrosodimethylamine in hamster and rat liver. *Cancer letters*, 74(3), 175–181. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(93\)90240-a](https://doi.org/10.1016/0304-3835(93)90240-a)
- Keisman, E. L., Christiansen, A. E., & Baker, B. S. (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. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(01\)00027-2](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(01)00027-2)
- Kelce, W. R., Stone, C. R., Laws, S. C., Gray, L. E., Kempainen, J. A., & Wilson, E. M. (1995). Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature*, 375(6532), 581–585. <https://doi.org/10.1038/375581a0>
- Keller, L. K. (2006). *Comparison of caffeine-inducibility of 0.8-kb and 0.2-kb upstream DNA of the Cyp6a8 gene in male Drosophila melanogaster* [Chancellor's Honors Program Projects, University of Tennessee]. https://trace.tennessee.edu/utk_chanhonoproj/979
- Koyama, T., & Mirth, C. K. (2021). Ecdysone Quantification from Whole Body Samples of *Drosophila melanogaster* Larvae. *Bio-protocol*, 11(3), e3915. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3915>
- Koyama, T., & Mirth, C. K. (2021). Ecdysone Quantification from Whole Body Samples of *Drosophila melanogaster* Larvae. *Bio-protocol*, 11(3), e3915. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3915>
- Krauss, V., & Reuter, G. (2011). DNA methylation in *Drosophila*—a critical evaluation. *Progress in molecular biology and translational science*, 101, 177–191. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387685-0.00003-2>
- Kubli E. (2003). Sex-peptides: seminal peptides of the *Drosophila* male. *Cellular and molecular life sciences*, 60(8), 1689–1704. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3052>
- Lafont, R., Dauphin-Villemant, C., Warren, J. T., & Rees, H. H. (2017). Ecdysteroid Chemistry and Biochemistry. *Reference Module in Life Sciences* (pp. 125-195). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.04026-7>

- Laver, J. D., Li, X., Ray, D., Cook, K. B., Hahn, N. A., Nabeel-Shah, S., ... & Smibert, C. A. (2015). Brain tumor is a sequence-specific RNA-binding protein that directs maternal mRNA clearance during the *Drosophila* maternal-to-zygotic transition. *Genome biology*, *16*(1), 1-30. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0659-4>
- Lee, W. R., Abrahamson, S., Valencia, R., von Halle, E. S., Würigler, F. E., & Zimmering, S. (1983). The sex-linked recessive lethal test for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation research*, *123*(2), 183–279. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(83\)90025-8](https://doi.org/10.1016/0165-1110(83)90025-8)
- Li, S., Wu, Q., Sun, Q., Coffin, S., Gui, W., & Zhu, G. (2019). Parental exposure to tebuconazole causes thyroid endocrine disruption in *zebrafish* and developmental toxicity in offspring. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, *211*, 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.04.002>
- Lin, H., & Hollenberg, P. F. (2001). *N*-nitrosodimethylamine-mediated formation of oxidized and methylated dna bases in a cytochrome P450 2E1 expressing cell line. *Chemical research in toxicology*, *14*(5), 562–566. <https://doi.org/10.1021/tx0001979>
- Liu, B., Xue, Q., Tang, Y., Cao, J., Guengerich, F. P., & Zhang, H. (2016). Mechanisms of mutagenesis: DNA replication in the presence of DNA damage. *Mutation research. Reviews in mutation research*, *768*, 53–67. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.03.006>
- Lu, Q., Bu, Y., Ma, L., & Liu, R. (2020). Transgenerational reproductive and developmental toxicity of tebuconazole in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of applied toxicology: JAT*, *40*(5), 578–591. <https://doi.org/10.1002/jat.3927>
- Lyko, F., Ramsahoye, B. H., & Jaenisch, R. (2000). DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, *408*(6812), 538–540. <https://doi.org/10.1038/35046205>
- Madhavan, M., & Schneiderman, H. A. (1977). Histological analysis of the dynamics of growth of imaginal discs and histoblast nests during the larval development of *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's archives of developmental biology*, *183*(4), 269–305. <https://doi.org/10.1007/BF00848459>
- Maltby, L. (1999). Studying stress: The importance of organism-level responses. *Ecological Applications*, *9*(2), 431-440. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(1999\)009\[0431:SSTIOO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(1999)009[0431:SSTIOO]2.0.CO;2)
- Marshall, K. E., & Sinclair, B. J. (2010). Repeated stress exposure results in a survival-reproduction trade-off in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings. Biological sciences*, *277*(1683), 963–969. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.1807>
- Massey, J. H., Chung, D., Siwanowicz, I., Stern, D. L., & Wittkopp, P. J. (2019). The *yellow* gene influences *Drosophila* male mating success through sex comb melanization. *eLife*, *8*, e49388. <https://doi.org/10.7554/eLife.49388>
- Mitch, W. A., Sharp, J. O., Trussell, R. R., Valentine, R. L., Alvarez-Cohen, L., & Sedlak, D. L. (2003). *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) as a drinking water contaminant: a review. *Environmental engineering science*, *20*(5), 389-404. <https://doi.org/10.1089/109287503768335896>

- Miyagawa, S., Sato, T. & Iguchi, T. (2016). Endocrine Disruptors. In Yoshio, T., Hironori, A. & Kazuyoshi, T. (Ed.) *Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research* (pp. 571-572). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801028-0.00101-X>
- Mlodzik, M., & Gehring, W. J. (1987). Expression of the caudal gene in the germ line of *Drosophila*: formation of an RNA and protein gradient during early embryogenesis. *Cell*, 48(3), 465–478. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90197-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90197-8)
- Mobley, M. L. (2019). *Biological Fitness: A Discussion of Definitions and Metrics* [Tesis de Maestría, Universidad Purdue]. [https://hammer.purdue.edu/articles/thesis/Biological Fitness A Discussion of Definitions and Metrics/9107930](https://hammer.purdue.edu/articles/thesis/Biological_Fitness_A_Discussion_of_Definitions_and_Metrics/9107930)
- Mousseau, T. A., & Fox, C. W. (1998). The adaptive significance of maternal effects. *Trends in ecology & evolution*, 13(10), 403–407. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(98\)01472-4](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(98)01472-4)
- Mtango, N. R., Potireddy, S., & Latham, K. E. (2008). Oocyte quality and maternal control of development. *International review of cell and molecular biology*, 268, 223–290. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(08\)00807-1](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)00807-1)
- Nakagawa, Y., & Sonobe, H. (2016). 20-Hydroxyecdysone. In Yoshio, T., Hironori, A. & Kazuyoshi, T. (Ed.) *Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research* (pp. 560-564). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801028-0.00238-5>
- Namiki, T., Niwa, R., Sakudoh, T., Shirai, K., Takeuchi, H., & Kataoka, H. (2005). Cytochrome P450 CYP307A1/Spook: a regulator for ecdysone synthesis in insects. *Biochemical and biophysical research communications*, 337(1), 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.09.043>
- Negishi, T., Shiotani, T., Fujikawa, K., & Hayatsu, H. (1991). The genotoxicities of *N*-nitrosamines in *Drosophila melanogaster in vivo*: the correlation of mutagenicity in the wing spot test with the DNA damages detected by the DNA-repair test. *Mutation research*, 252(2), 119–128. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(91\)90012-w](https://doi.org/10.1016/0165-1161(91)90012-w)
- Nichols, C. D., Becnel, J., & Pandey, U. B. (2012). Methods to assay *Drosophila* behavior. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (61), 3795. <https://doi.org/10.3791/3795>
- Nilsson, E. E., Sadler-Riggelman, I., & Skinner, M. K. (2018). Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Environmental epigenetics*, 4(2), dvy016. <https://doi.org/10.1093/eep/dvy016>
- Ninova, M., Fejes Tóth, K., & Aravin, A. A. (2019). The control of gene expression and cell identity by H3K9 trimethylation. *Development (Cambridge, England)*, 146(19), dev181180. <https://doi.org/10.1242/dev.181180>
- Nishie, K. (1983). Comparison of the effects of *N*-nitrosodimethylamine on pregnant and nonpregnant Holtzman rats. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 21(4), 453–462. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(83\)90102-3](https://doi.org/10.1016/0278-6915(83)90102-3)

- Nöthiger, R. (1970). Sucrose density separation: A method for collecting large numbers of *Drosophila* larvae. *Dros. Inf. Serv*, 45,177.
- NTP. (2021). *N-Nitrosamines: 15 Listings*. In: Report on Carcinogens, Fifteenth Edition. National Toxicology Program Research. Triangle Park, NC: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. <https://ntp.niehs.nih.gov/go/roc15>. 1-23 pp. <https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/content/profiles/nitrosamines.pdf>
- Obach, R. S., & Kalgutkar, A. S. (2018). Reactive Electrophiles and Metabolic Activation. In: *Comprehensive Toxicology (Third Edition, Volume 1)* (pp. 295-331). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64290-3>
- Olcott, M. H., Henkels, M. D., Rosen, K. L., Walker, F. L., Sneh, B., Loper, J. E., & Taylor, B. J. (2010). Lethality and developmental delay in *Drosophila melanogaster* larvae after ingestion of selected *Pseudomonas fluorescens* strains. *PLoS one*, 5(9), e12504. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012504>
- Olivera, I. (2017). *Analysis of the determination of testis development in Drosophila melanogaster* [Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Madrid]. <http://hdl.handle.net/10486/680387>
- Ono, H., Rewitz, K. F., Shinoda, T., Itoyama, K., Petryk, A., Rybczynski, R., Jarcho, M., Warren, J. T., Marqués, G., Shimell, M. J., Gilbert, L. I., & O'Connor, M. B. (2006). *Spook* and *Spookier* code for stage-specific components of the ecdysone biosynthetic pathway in Diptera. *Developmental biology*, 298(2), 555–570. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.07.023>
- Orr H. A. (2009). Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nature reviews. Genetics*, 10(8), 531–539. <https://doi.org/10.1038/nrg2603>
- Ou, Q., & King-Jones, K. (2013). What goes up must come down: transcription factors have their say in making ecdysone pulses. *Current topics in developmental biology*, 103, 35–71. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385979-2.00002-2>
- Pappus, S. A., & Mishra, M. (2018). A *Drosophila* Model to Decipher the Toxicity of Nanoparticles Taken Through Oral Routes. *Advances in experimental medicine and biology*, 1048, 311–322. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72041-8_18
- Parvy, J. P., Blais, C., Bernard, F., Warren, J. T., Petryk, A., Gilbert, L. I., O'Connor, M. B., & Dauphin-Villemant, C. (2005). A role for betaFTZ-F1 in regulating ecdysteroid titers during post-embryonic development in *Drosophila melanogaster*. *Developmental biology*, 282(1), 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.02.028>
- Peto, R., Gray, R., Brantom, P., & Grasso, P. (1991). Effects on 4080 rats of chronic ingestion of *N*-nitrosodiethylamine or *N*-nitrosodimethylamine: a detailed dose-response study. *Cancer research*, 51(23 Pt 2), 6415–6451. https://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/51/23_Part_2/6415/2445760/cr05123p26415.pdf
- Petryk, A., Warren, J. T., Marqués, G., Jarcho, M. P., Gilbert, L. I., Kahler, J., Parvy, J. P., Li, Y., Dauphin-Villemant, C., & O'Connor, M. B. (2003). Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-

- hydroxyecdysone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), 13773–13778. <https://doi.org/10.1073/pnas.2336088100>
- Petzoldt, A. G., Coutelis, J. B., Géminard, C., Spéder, P., Suzanne, M., Cerezo, D., & Noselli, S. (2012). DE-Cadherin regulates unconventional Myosin ID and Myosin IC in *Drosophila* left-right asymmetry establishment. *Development (Cambridge, England)*, 139(10), 1874–1884. <https://doi.org/10.1242/dev.047589>
- Prieto, N. (2018). *Estudio de los mecanismos que regulan el desarrollo del abdomen posterior y la asimetría en el aparato reproductor del macho de Drosophila melanogaster* [Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Madrid]. <http://hdl.handle.net/10486/684252>
- Quinn, L., Lin, J., Cranna, N., Lee, J., Mitchell, N., & Hannan, R. (2012). Steroid hormones in *Drosophila*: How ecdysone coordinates developmental signalling with cell growth and division. *Steroids-Basic Science. InTech, Rijeka*, 141-168. <https://doi.org/10.5772/27927>
- Raddatz, G., Guzzardo, P. M., Olova, N., Fantappiè, M. R., Rampp, M., Schaefer, M., Reik, W., Hannon, G. J., & Lyko, F. (2013). Dnmt2-dependent methylomes lack defined DNA methylation patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(21), 8627–8631. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306723110>
- Raman, J. D., & Schlegel, P. N. (2002). Aromatase inhibitors for male infertility. *The Journal of urology*, 167(2 Part 1), 624–629. <https://doi.org/10.1097/00005392-200202000-00038>
- Ramos-Morales, P., Ordaz, Ma. G., Dorantes, A., Rivas, H., Campos, P., Martínez, M. & Hernández, B. (2001). *Drosophila* is a Reliable Biomonitor of Water Pollution. In: Butterworth, F.M., Gunatilaka, A., Gonsebatt, M.E. (Eds) *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change 2*. Environmental Science Research, vol 56. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1305-6_15
- Ray, S. D., Brown, D., & Yang, N. (2014). Dimethylnitrosamine. In: *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)* (pp. 598-600). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00343-2>
- Repetto, M., & Repetto, G. (2009). *Toxicología Fundamental*. (4ª Edición). Ediciones Díaz de Santos.
- Rewitz, K. F., O'Connor, M. B., & Gilbert, L. I. (2007). Molecular evolution of the insect Halloween family of cytochrome P450s: phylogeny, gene organization and functional conservation. *Insect biochemistry and molecular biology*, 37(8), 741–753. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.02.012>
- Rice, G. R., Barmina, O., Luecke, D., Hu, K., Arbeitman, M., & Kopp, A. (2019). Modular tissue-specific regulation of *doublesex* underpins sexually dimorphic development in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 146(14), dev178285. <https://doi.org/10.1242/dev.178285>
- Riddiford, L. M., Hiruma, K., Zhou, X., & Nelson, C. A. (2003). Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 33(12), 1327–1338. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2003.06.001>

- Robinett, C. C., Vaughan, A. G., Knapp, J. M., & Baker, B. S. (2010). Sex and the single cell. II. There is a time and place for sex. *PLoS biology*, 8(5), e1000365. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000365>
- Roder, K., Hung, M. S., Lee, T. L., Lin, T. Y., Xiao, H., Isobe, K. I., Juang, J. L., & Shen, C. J. (2000). Transcriptional repression by *Drosophila* methyl-CpG-binding proteins. *Molecular and cellular biology*, 20(19), 7401–7409. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.19.7401-7409.2000>
- Ruden, D. M., & Lu, X. (2008). Hsp90 affecting chromatin remodeling might explain transgenerational epigenetic inheritance in *Drosophila*. *Current genomics*, 9(7), 500–508. <https://doi.org/10.2174/138920208786241207>
- Safe S. H. (1995). Modulation of gene expression and endocrine response pathways by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related compounds. *Pharmacology & therapeutics*, 67(2), 247–281. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(95\)00017-b](https://doi.org/10.1016/0163-7258(95)00017-b)
- Sánchez, L., & Guerrero, I. (2001). The development of the *Drosophila* genital disc. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 23(8), 698–707. <https://doi.org/10.1002/bies.1099>
- Santos, A. C., & Lehmann, R. (2004). Germ cell specification and migration in *Drosophila* and beyond. *Current biology: CB*, 14(14), R578–R589. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.07.018>
- Scaglia, H., Chichizola, C., Franconi, M. C., Ludueña, B., Mastandrea, C., & Scaglia, J. (2009). Disruptores endocrinos. Composición química, mecanismo de acción y efecto sobre el eje reproductivo. *Reproducción*, 24(2), 74-86. http://www.samer.org.ar/revista/numeros/2009/vol24_n2/6_disruptores_endocrinos.pdf
- Sekelsky J. (2017). DNA Repair in *Drosophila*: Mutagens, Models, and Missing Genes. *Genetics*, 205(2), 471–490. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.186759>
- Sharma A. (2013). Transgenerational epigenetic inheritance: focus on soma to germline information transfer. *Progress in biophysics and molecular biology*, 113(3), 439–446. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2012.12.003>
- Sharpe, R. M. (1994). Regulation of spermatogenesis. In: Knobil, E., Neill, J.D. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York. pp. 1363-1434.
- Sheweita, S. A., El Banna, Y. Y., Balbaa, M., Abdullah, I. A., & Hassan, H. E. (2017). *N*-nitrosamines induced infertility and hepatotoxicity in male rabbits. *Environmental toxicology*, 32(9), 2212–2220. <https://doi.org/10.1002/tox.22436>
- Singh, N. P., & Mishra, R. K. (2014). Role of *abd-A* and *Abd-B* in development of abdominal epithelia breaks posterior prevalence rule. *PLoS genetics*, 10(10), e1004717. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004717>
- Skinner, M. K. (2008). What is an epigenetic transgenerational phenotype? F3 or F2. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 25(1), 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.09.001>

- Skinner, M. K. (2011). Environmental epigenetic transgenerational inheritance and somatic epigenetic mitotic stability. *Epigenetics*, 6(7), 838–842. <https://doi.org/10.4161/epi.6.7.16537>
- Skinner, M. K. (2014). Endocrine disruptor induction of epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Molecular and cellular endocrinology*, 398(1-2), 4–12. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.07.019>
- Skinner, M. K. (2015). Epigenetic transgenerational inheritance. *Nat Rev Endocrinol*, 12(1), 68–70. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.206>
- Smith, I. E., & Dowsett, M. (2003). Aromatase inhibitors in breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 348(24), 2431- 2442. <https://doi.org/10.1056/NEJMra023246>
- Souliotis, V. L., van Delft, J. H., Steenwinkel, M. J., Baan, R. A., & Kyrtopoulos, S. A. (1998). DNA adducts, mutant frequencies and mutation spectra in lambda *lacZ* transgenic mice treated with *N*-nitrosodimethylamine. *Carcinogenesis*, 19(5), 731–739. <https://doi.org/10.1093/carcin/19.5.731>
- Stearns, S. C. (1992). *The evolution of life histories*. Oxford University Press, Oxford.
- Stulp, G., & Barrett, L. (2015). Fertility theory: theory of life history evolution. *The International Encyclopedia of the Social and Behavioral Sciences*. https://www.gertstulp.com/pdf/2015_Stulp&Barrett_Encyclopedia_LHT.pdf
- Suzanne, M., Petzoldt, A. G., Spéder, P., Coutelis, J. B., Steller, H., & Noselli, S. (2010). Coupling of apoptosis and L/R patterning controls stepwise organ looping. *Current biology: CB*, 20(19), 1773–1778. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.08.056>
- Szabad, J., & Nöthiger, R. (1992). Gynandromorphs of *Drosophila* suggest one common primordium for the somatic cells of the female and male gonads in the region of abdominal segments 4 and 5. *Development (Cambridge, England)*, 115(2), 527–533. <https://doi.org/10.1242/dev.115.2.527>
- Tabares, O. E. (2016.). *Efecto de la contaminación urbana sobre la viabilidad huevo-adulto de Drosophila melanogaster (Drosophilidae) en Cali, Colombia*. [Tesis de Licenciatura, Universidad del Valle]. <http://hdl.handle.net/10893/15560>
- Takayama, S., Dhahbi, J., Roberts, A., Mao, G., Heo, S. J., Pachter, L., Martin, D. I., & Boffelli, D. (2014). Genome methylation in *D. melanogaster* is found at specific short motifs and is independent of DNMT2 activity. *Genome research*, 24(5), 821–830. <https://doi.org/10.1101/gr.162412.113>
- Thummel, C. S. (1995). From embryogenesis to metamorphosis: the regulation and function of *Drosophila* nuclear receptor superfamily members. *Cell*, 83(6), 871–877. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90203-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90203-1)
- Thummel, C. S. (1996). Flies on steroids—*Drosophila* metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action. *Trends in genetics: TIG*, 12(8), 306–310. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(96\)10032-9](https://doi.org/10.1016/0168-9525(96)10032-9)

- Thummel, C. S. (2001). Molecular mechanisms of developmental timing in *C. elegans* and *Drosophila*. *Developmental cell*, 1(4), 453–465. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(01\)00060-0](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(01)00060-0)
- Tijet, N., Helvig, C., & Feyereisen, R. (2001). The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene*, 262(1-2), 189–198. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00533-3](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00533-3)
- Tricker, A. R., & Preussmann, R. (1991). Carcinogenic *N*-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential. *Mutation research*, 259(3-4), 277–289. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(91\)90123-4](https://doi.org/10.1016/0165-1218(91)90123-4)
- Tweedie, S., Ng, H. H., Barlow, A. L., Turner, B. M., Hendrich, B., & Bird, A. (1999). Vestiges of a DNA methylation system in *Drosophila melanogaster*?. *Nature genetics*, 23(4), 389–390. <https://doi.org/10.1038/70490>
- Veena, S., & Rashmi, S. (2014). A review on mechanism of nitrosamine formation, metabolism and toxicity in *in vivo*. *Int. J. Toxicol. Pharmacol. Res*, 6, 86-96. <http://impactfactor.org/PDF/IJTPR/6/IJTPR,Vol6,Issue4,Article7.pdf>
- Viluksela, M., & Pohjanvirta, R. (2019). Multigenerational and Transgenerational Effects of Dioxins. *International journal of molecular sciences*, 20(12), 2947. <https://doi.org/10.3390/ijms20122947>
- Vogel, E., Schalet, A., Lee, W. R., & Würgler, F. (1981). Mutagenicity of selected chemicals in *Drosophila*. In *Comparative Chemical Mutagenesis* (pp. 175-255). Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-3409-5_9
- Warren, J. T., Petryk, A., Marques, G., Jarcho, M., Parvy, J. P., Dauphin-Villemant, C., O'Connor, M. B., & Gilbert, L. I. (2002). Molecular and biochemical characterization of two P450 enzymes in the ecdysteroidogenic pathway of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17), 11043–11048. <https://doi.org/10.1073/pnas.162375799>
- Warren, J. T., Petryk, A., Marqués, G., Parvy, J. P., Shinoda, T., Itoyama, K., Kobayashi, J., Jarcho, M., Li, Y., O'Connor, M. B., Dauphin-Villemant, C., & Gilbert, L. I. (2004). Phantom encodes the 25-hydroxylase of *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*: a P450 enzyme critical in ecdysone biosynthesis. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34(9), 991–1010. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.06.009>
- Warren, J. T., Yerushalmi, Y., Shimell, M. J., O'Connor, M. B., Restifo, L. L., & Gilbert, L. I. (2006). Discrete pulses of molting hormone, 20-hydroxyecdysone, during late larval development of *Drosophila melanogaster*: correlations with changes in gene activity. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 235(2), 315–326. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20626>
- Weiner, R., & Matthews, R. (2003). *Environmental engineering*. (4^a Edición). Butterworth-Heinemann.
- Werck-Reichhart, D., & Feyereisen, R. (2000). Cytochromes P450: a success story. *Genome biology*, 1(6), reviews 3003.1–3003.9. <https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-6-reviews3003>

- WHO. (2002). *N*-Nitrosodimethylamine. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Concise International Chemical Assessment Document No. 38). 1-52 pp. <https://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad38.pdf>
- WHO. (2008). *N*-Nitrosodimethylamine in drinking-water. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. Geneva, World Health Organization (WHO/HSE/AMR/08.03/8). 1-37 pp. https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/ndma_2add_feb2008.pdf
- Woodruff, R. C., & Seeger, M. A. (1991). Test of a semiselective screen for induced aneuploidy in germ cells of *Drosophila melanogaster* females with structurally normal chromosomes. *Mutation research*, 252(1), 61–82. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(91\)90252-4](https://doi.org/10.1016/0165-1161(91)90252-4)
- Xia, B., & de Belle, J. S. (2016). Transgenerational programming of longevity and reproduction by post-eclosion dietary manipulation in *Drosophila*. *Aging*, 8(5), 1115–1134. <https://doi.org/10.18632/aging.100932>
- Xia, B., Gerstin, E., Schones, D. E., Huang, W., & Steven de Belle, J. (2016). Transgenerational programming of longevity through E(z)-mediated histone H3K27 trimethylation in *Drosophila*. *Aging*, 8(11), 2988–3008. <https://doi.org/10.18632/aging.101107>
- Xia, R., Liu, Y., Yang, L., Gal, J., Zhu, H., & Jia, J. (2012). Motor neuron apoptosis and neuromuscular junction perturbation are prominent features in a *Drosophila* model of Fus-mediated ALS. *Molecular neurodegeneration*, 7, 10. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-7-10>
- Yu, Z., Zhang, J., Chen, X., Yin, D., & Deng, H. (2013). Inhibitions on the behavior and growth of the nematode progeny after prenatal exposure to sulfonamides at micromolar concentrations. *Journal of hazardous materials*, 250-251, 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.01.078>
- Zhang, J., Sun, T., Sun, Z., Li, H., Qi, X., Zhong, G., & Yi, X. (2018). Azadirachtin acting as a hazardous compound to induce multiple detrimental effects in *Drosophila melanogaster*. *Journal of hazardous materials*, 359, 338–347. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.057>
- Zhang, Q., Hao, L., & Hong, Y. (2021). Detrimental effects induced by diisononyl phthalate on development and behavior of *Drosophila* larva and potential mechanisms. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP*, 243, 108967. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108967>