



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

*Drosophila mülleri* cómo organismo modelo  
para la evaluación de daño reprotoxico y  
transgeneracional

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGA**

P R E S E N T A :

Evangelista Casimiro Rubi



DIRECTOR DE TESIS:

Patricia Ramos Morales

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

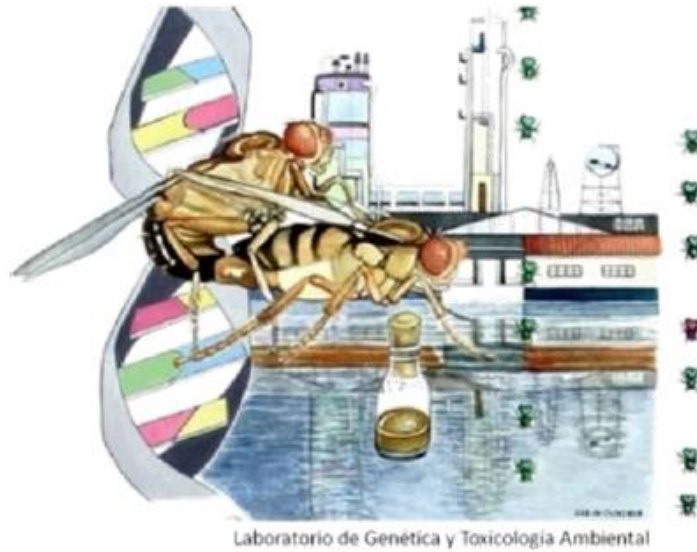
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

## DATOS

---

1. Datos del alumno  
Evangelista  
Casimiro  
Rubi  
55 2559 7746  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología
2. Datos del tutor  
Dra.  
Patricia  
Ramos  
Morales
3. Datos del sinodal 1  
Dra.  
Maricela  
Villagrán  
Santa Cruz
4. Datos del sinodal 2  
Dr.  
Luis Humberto  
Mojica  
Vázquez
5. Datos del sinodal 3  
Dra.  
Josefina  
Herrera  
Santoyo
6. Datos del sinodal 4  
M. en C.  
Estefania  
Arroyo  
Jilote
7. Datos del trabajo escrito  
*Drosophila mülleri* como organismo  
modelo para la evaluación daño  
reprotoxico y transgeneracional.  
80 pp  
2022

El material utilizado en este trabajo fue donado por el Banco de Moscas de la Facultad de Ciencias, UNAM. Se realizó en el Laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental, en la Facultad de Ciencias, UNAM. Gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM (IN-229719).



## DEDICATORIA

---

La persona en la que me he convertido es el fruto  
de la semilla que plantaron y cuidaron con amor,  
confianza y sabiduría. Un gracias no es suficiente.  
Les amo con cada célula en mi cuerpo.

A mamá y papá.

*No amo mi patria. Su fulgor abstracto  
es inasible.*

*Pero (aunque suene mal) daría la vida  
por diez lugares suyos, cierta gente,  
puertos, bosques de pinos, fortalezas,  
una ciudad deshecha, gris, monstruosa,  
varias figuras de su historia, montañas  
-y tres o cuatro ríos.*

*Jose Emilio Pacheco*

## AGRADECIMIENTOS

---

A la Universidad Nacional Autónoma de México por el conocimiento y recursos que ha invertido en mi formación.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM (IN-229719).

Al Laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental – Banco de Moscas de la Facultad de ciencias de la UNAM, por los organismos brindados, el material e instalaciones para la realización de este trabajo.

A la Dra. Patricia Ramos Morales por la oportunidad y confianza brindada, el apoyo técnico en la manipulación de organismos y compuestos químicos, conocimiento compartido, tiempo y comentarios brindados para esta investigación.

A los sinodales; Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz, Dra. Josefina Herrera Santoyo, Dr. Luis Humberto Mojica Vázquez y la M. en C. Estefanía Arroyo Jilote por los comentarios y tiempo brindado para este escrito.

A las personas que colaboraron con el desarrollo de esta investigación;

Dra. Adriana Muñoz Hernández (apoyo técnico en el uso de compuestos químicos), Biól. Blanca Rosa Hernández Bernal (apoyo técnico en la revisión y disección de organismos), M. en C. Estefanía Arrollo Jilote (asesoramiento con datos estadísticos), Biól. Hugo Rivas Martínez (apoyo técnico en toma de fotografías), M. en C. Yaneli Trujillo Varela (asesoramiento en manipulación de organismos).

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

---

A mi familia; mis padres por darme la mejor vida de todas, por confiar y brindarme apoyo en todo momento. Mis hermanos, porque en toda crisis siempre estuvieron para aconsejarme y cuidarme. Mis dos pequeñas, Danae y Arleth, que sin ser enteramente mías, no hay forma de explicar el amor que siento por ustedes, que la curiosidad sea nuestro motor todos los días. Les amo.

A la Dra. Patricia Ramos Morales por creer en mí, abrirme las puertas del laboratorio y darme la oportunidad de conocerla como la gran investigadora, mujer y persona que es, por darme empujoncitos cuando los necesitaba y por contagiarme de amor por la genética y la docencia.

A todos y cada uno de los que forman y formaban parte del Laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental; Blanca, por el conocimiento, consejos, risas y ejemplo de valor. Hugo, por los regaños, risas y clases compartidas. Estefania, por los consejos, preguntas e incitarme a siempre ir por más. Tania, por la hermosa chispa de felicidad que contagias. Dra. Adriana, por enseñarme a luchar y defender mis ideas. Yaneli, por animarme cada vez que me desesperaba. Dany, por los helados, platicas y aprendizaje compartido.

A mi segunda familia, la elegida;

Carito, Ro, Angel, Chezz, por el café, las cenas de navidad, risas, llanto, baile, viajes, regaños y creer siempre en mí, sin ustedes mi vida no estaría completa.

Mariannita, Fers, gracias por ser mis amigas desde el primer momento, por sus consejos, su paciencia y su amor, no hay forma de explicar lo mucho que las admiro y lo feliz que me hace estar en su proceso de crecimiento académico y personal, me siento afortunada de ser su amiga. Las amo.

Ragde, por estar conmigo cuando más perdida me sentía y compartir tantas historias lejos de casa.

A mi mejor amiga y hermana, Sandy, gracias por las risas y las lágrimas, por creer en mi cuando yo dejo de hacerlo, ojalá la vida nos siga llenando de instantes únicos. Eres mi complemento.



**SAILING SEAS OF DNA...**



## ÍNDICE

---

Resumen	11
I. Introducción	12
1. Toxicología	12
2. Modelo <i>in vivo</i>	14
3. <i>Drosophila melanogaster</i>	15
4. <i>Drosophila mulleri</i>	18
5. N-nitrosodimetilamina (NDMA)	22
6. Daño reprotóxico y transgeneracional	26
II. Justificación	31
III. Hipótesis	32
IV. Objetivos	33
V. Material y métodos	34
1. Mantenimiento de cultivos	34
2. Organismos para tratamiento	35
3. Tratamiento	
3.1. Concentraciones	35
3.2. Obtención de larvas	36
3.3. Determinación de toxicidad	36
4. Cruza para evaluar fertilidad y cantidad de la progenie de organismos tratados (efecto reprotóxico y transgeneracional)	38
5. Disección de aparato reproductor	40
6. Análisis estadístico	40
VI. Resultados	42
A) Organismos tratados	

1. Toxicidad	42
2. ¿Cómo se ven estas moscas?	47
3. Daño reprotóxico	
3.1. Machos tratados	49
3.2. Cruza F <sub>1</sub> (NT x T)	50
B) Cruzas de organismos no tratados (efecto transgeneracional)	
1. Progenie F <sub>2</sub> (Cruza F <sub>1</sub> x F <sub>1</sub> )	56
2. Progenie F <sub>3</sub> (Cruza F <sub>2</sub> x F <sub>2</sub> )	62
VII. Discusión	66
1. Toxicidad a la NDMA	66
2. Daño reprotóxico y transgeneracional	67
3. Cruza NT x T	68
4. Drosophila mülleri como modelo alternativo	
4.1. Morfología de gónadas	69
4.2. Organismo modelo	69
VIII. Conclusiones	71
IX. Referencias	72

## RESUMEN

---

Existen sustancias que pueden provocar efectos adversos en los seres vivos de los cuales uno de los menos estudiados es el daño a la capacidad reproductora. Nuestro grupo de trabajo ha calibrado bioindicadores como fertilidad, cantidad de progenie y proporción sexual, todos enfocados a evaluar el daño reprotóxico *in vivo* con especies del género *Drosophila*. En este trabajo se evaluó la introducción de *Drosophila mulleri* como un modelo alternativo a *Drosophila melanogaster* en estudios de daño reprotóxico. Durante la valoración de un modelo experimental se expone a los organismos a sustancias de resultado conocido para verificar la respuesta respecto a estudios anteriores. El objetivo fue determinar si *D. mulleri* mostraba una respuesta similar a *D. melanogaster*, para el daño reprotóxico causado por el promutágeno y alquilante N-nitrosodimetilamina (NDMA), así como observar daño transgeneracional como efecto de tratar a los machos con dicho compuesto. Para el desarrollo del proyecto se aislaron larvas de tercer estadio de *D. melanogaster* y *D. mülleri* que se alimentaron con NDMA ( $7.63E-05$  –  $1.50E+00$ ) o agua destilada (testigo negativo y diluyente). Los organismos recobrados se contaron para estimar la sobrevivencia, se revisó la morfología poniendo especial atención a la estructura genital y gónadas masculinas. Por cada concentración se realizaron treinta cruza 1:1 de machos tratados con hembras no tratadas para obtener la F<sub>1</sub>. Posteriormente se forman treinta familias que se siguieron por dos generaciones más (F<sub>2</sub> y F<sub>3</sub>). En cada generación se contó y revisó morfológicamente a las moscas, calculando además fertilidad y fecundidad por cada familia, así como la proporción sexual. *D. melanogaster* y *D. mulleri* presentaron diferencias significativas, respecto a su testigo, en un 50% de las concentraciones usadas. También se presentó la perdida de fertilidad a partir de la concentración  $2.35E+01$  para ambas cepas, aunque en distintas generaciones, y para *D. mulleri* se presentó perdida de fertilidad también en concentraciones intermedias. Respecto a la fecundidad, ambas cepas de moscas se vieron afectadas en distintas concentraciones y generaciones, por lo que se sugiere que la NDMA causa daño reprotóxico y transgeneracional en el género *Drosophila*. Se propone que *D. mulleri* resulta un modelo confiable para la evaluación daño reprotóxico y transgeneracional al obtener datos cuantitativos similares a *D. melanogaster*.

# I. INTRODUCCIÓN

---

## 1. Toxicología

La toxicología es la ciencia de los venenos, identifica y cuantifica los efectos adversos asociados a la exposición con agentes físicos, químicos o biológicos en los organismos para comprender los mecanismos de acción de los agentes tóxicos para lo que se han elaborado herramientas experimentales enfocadas a la determinación de sus propiedades (E. Silbergeld, n.d., 2000; Smart and Hodgson 2008; Roldan 2016). El efecto de la sustancia será modulado por la edad, el sexo, la dieta y la salud del organismo (Brusick 1987; Peña, Carter, and Ayala-Fierro 2001; E. K. Silbergeld 2000).

Una rama de la toxicología es la toxicología genética, esta, identifica y examina la acción de los agentes tóxicos que tienen la capacidad de interactuar con el material genético, a los que llamamos agentes genotóxicos (Brusick 1987). Su objetivo fundamental es medir el impacto que los compuestos externos pueden inducir cambios hereditarios en las células sexuales o en las células somáticas de los organismos expuestos, pero que también podrían alterar nuevas generaciones por otros mecanismos (E. Silbergeld 2000; Brusick 1987; Ramos-Morales and Vega García 2008).

Un tóxico es todo agente químico, físico o biológico que, al entrar en un organismo en dosis determinadas, producen efectos adversos o indirectos. Pueden ser xenobióticos, es decir sustancias que no se producen dentro del organismo, sino que viene del ambiente; algunos ejemplos de éstos son los productos industriales, las drogas o los fármacos, pero también pueden ser compuestos producidos por animales y vegetales (Kniewald et al. 2005; Peña, Carter, and Ayala-Fierro 2001; Roldan 2016; Smart and Hodgson 2008).

La forma de medir el efecto de la sustancia que entra al cuerpo es dosis-dependiente, estas sustancias pueden ser de efecto directo, es decir tóxicas en cuanto entran al organismo, o bien necesitar del metabolismo del organismo para ser descompuesta, en este caso los metabolitos son la forma tóxica. El tipo de lesión será dada por el tipo de exposición, la distribución, retención o excreción de la sustancia en el organismo y la eficacia del metabolismo. (Brusick 1987; Peña, Carter, and Ayala-Fierro 2001; E. K. Silbergeld 2000).

Los compuestos pueden tener efecto genotóxico, que puede detectarse en forma de mutaciones, por ejemplo, cambiar una base por otra, eliminar o agregar a una o más bases lo que provoca el corrimiento del marco de lectura durante la traducción y puede generar proteínas alteradas, entre otras posibilidades. También pueden afectar su integridad, como aberraciones cromosómicas o bien rupturas de las hebras de DNA que pueden llevar a pérdidas o ganancias de segmentos, cambios en el orden de los genes; en el número de cromosomas, por la pérdida o ganancia de un cromosoma o incluso de un juego completo de éstos, entre otros efectos (Choy 2001; Lodola and Stadler 2011).

Tanto las células somáticas como las germinales pueden sufrir daño y su capacidad para reparar o eliminar la lesión causada por un genotóxico influye en el daño que se podría heredar a futuras generaciones. Actualmente existen estudios que asocian enfermedades o síntomas a diversos contaminantes ambientales, por ejemplo, las enfermedades que tiene que ver con aparato respiratorio como la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) (Smart and Hodgson 2008; Ramos Morales *et al.* 1993; E. Silbergeld 2000).

El diagnóstico del potencial genotóxico de una sustancia se ha basado principalmente en los efectos provocados en las células somáticas de los organismos expuestos o en sus descendientes, mediante la inducción de mutaciones en las células sexuales, aspectos para los que se dispone de gran variedad de metodologías experimentales tanto *in vivo* como *in vitro*, sin embargo, la respuesta de reacción de los sistemas celulares ante el metabolismo puede ser diferente en cada organismo.

Se ha documentado el daño a nivel reproductivo a través de la incidencia de infertilidad en poblaciones humanas, problema que se ve incrementado en grandes ciudades. En el caso de la Ciudad de México, los registros que se tenían hasta 2019, marca que la tasa de fecundidad en México descendió de 6.74 en 1968 a 2.1 en 2018, datos obtenidos de estudios de infertilidad (Fig. 1), esto incrementa la necesidad de solicitar técnicas para reproducción asistida (González Cervera 2006).

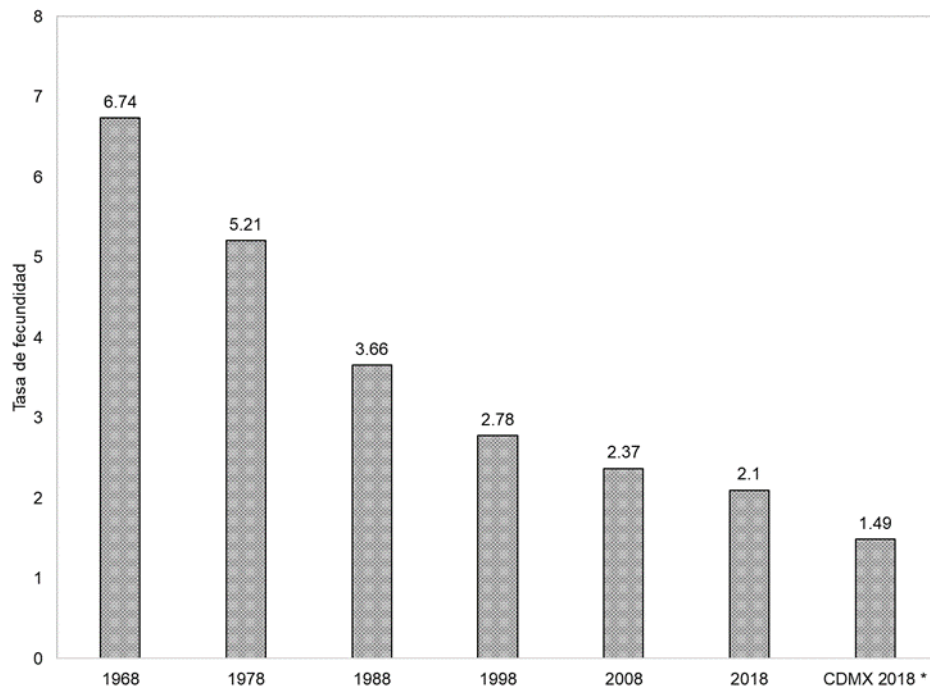


Fig. 1 Tasa Global de Fecundidad en México donde se observa que ha descendido de 6.74 en 1968 a 2.1 en 2018. La Ciudad de México, una de las más bajas con 1.49. CONAPO (2019).

No obstante, poco se ha explorado el impacto de tóxicos en la capacidad reproductiva de los organismos, lo que resulta fundamental para el mantenimiento de las poblaciones. Para continuar explorando la incidencia de compuestos sobre la reproducción es necesario estudiar organismos donde haya un recambio poblacional en un periodo más corto que el del humano y es aquí donde los modelos animales resultan de gran importancia.

## 2. Modelos *in vivo*

Los modelos animales como rata, ratón, perros, cerdos y primates, de los que se conocen ampliamente sus características biológicas, además de la relación genética con los humanos, se han usado para el estudio de genotóxicos, los estudios se hacen en células somáticas, así como células sexuales. No obstante, actualmente el uso de sistemas de mamíferos ha sido restringido y el número de organismos que pueden utilizarse es bajo, además de que el costo del seguimiento de sus descendientes a lo largo de varias generaciones implica costo y espacio considerables (Morgan 1919; Rodríguez-Yunta 2007; Santalla, Portiansky, and Ferrero 2016).

Entre las características de los modelos biológicos que favorecen su uso para el estudio de la actividad reproductiva se encuentran la producción de progenie numerosa que facilite el análisis estadístico robusto, ciclos de vida cortos que aporten información de varias generaciones en períodos razonables y un costo de mantenimiento moderado. El grupo de los insectos reúnen estas características y en particular los pertenecientes al género *Drosophila* (Adams et al. 2000; Avanesian, Semnani, and Jafari 2009; Brusick 1987; Markow and O'Grady 2007).

### ***3. Drosophila melanogaster***

La distribución del género *Drosophila* es cosmopolita y está integrado por numerosas especies que pueden encontrarse desde las altas montañas hasta el nivel del mar y desde los trópicos hasta la tundra. Y aunque la mayoría de los hábitats parecen apropiados para estos dípteros, existe una mayor abundancia y variabilidad en los bosques y selvas (Throckmorton 1982; Markow and O'Grady 2007; Hasson, Naveira, and Fontdevila 1992).

*Drosophila*, es un organismo holometábolo, lo que significa que lleva a cabo una metamorfosis completa que incluye las etapas de huevo, larva, pupa y adulto, por lo que se pueden diferenciar todas las etapas de su desarrollo. Tiene un ciclo de vida corto, que va de diez a quince días a partir de la fertilización del huevo, dividiéndose en dos grandes periodos, la etapa larvaria y la del organismo adulto (figura 2). Su alimentación se basa en materia orgánica en descomposición, principalmente frutos (Adams *et al.* 2000; Guerrero and Lorenzana-Jiménez 2009; Markow and O'Grady 2007; Ramos-Morales and Vega García 2008).

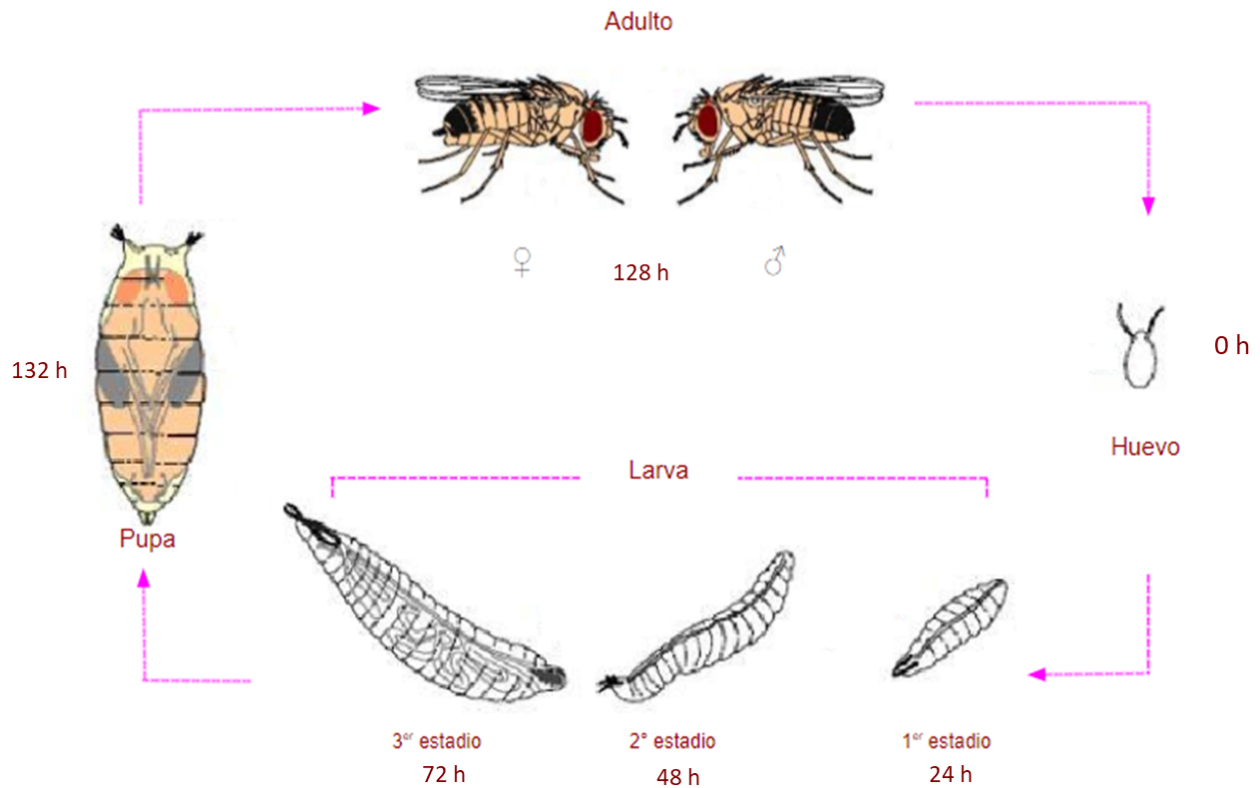


Fig. 2 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (modificada de Ramon Giraldez).

En el caso de la especie *D. melanogaster*, su tamaño va de 2 a 3 mm de largo, tienen ojos rojos y presentan dimorfismo sexual, es decir presentan atributos diferentes hembras y machos, entre ellos el tamaño, lo que facilita su identificación (figura 3). Su abdomen está dividido en ocho segmentos, pero en el caso del macho el séptimo no es evidente porque se ha fusionado con el octavo formando uno solo (Ramos-Morales and Vega García 2008; Markow and O'Grady 2007; Guerrero and Lorenzana-Jiménez 2009).





Fig. 3 Morfología externa de moscas *Drosophila melanogaster* (foto de Rubi Evangelista).

Es un modelo pionero en estudios genéticos y en el área de biología del desarrollo. Se completó la secuencia de su genoma en el año 2000 y se mostró que alrededor del 70% de sus genes son compartidos con los del humano y de éstos, un porcentaje similar se asocia a genes relacionados con enfermedades humanas (Adams et al. 2000; Botas 2007). Este organismo acepta modificaciones importantes en el orden de los genes, es decir, se pueden introducir mutaciones en su genoma, además de grandes rearrreglos en los que cambia el orden o número de genes; esta característica le da ventaja al organismo con respecto a otros modelos (Adams *et al.* 2000; Botas 2007; Ramos-Morales and Vega García 2008; Ramos Morales *et al.* 1993; Brusick 1987).

Se ha mostrado que esta mosca tiene la capacidad de transformar y detoxificar sustancias de manera similar a los mamíferos, esto debido a que tiene sistemas enzimáticos dependientes de citocromos P450, con actividad equivalente a la fracción S9 del hígado de rata (Baars *et al.* 1980; Clark 1982; Giraud *et al.* 2011; Graf, Wild, and Wirgler 1992; Hällström and Blanck 1985; Negishi *et al.* 1991; Shibahara *et al.* 1995). Se ha documentado que la mosca, puede distinguir entre mutágenos y promutágenos, característica esencial para hacer comparación con mamíferos, es decir, compuestos que son activos después de ser transformados por el metabolismo de los organismos, además de discriminar entre diferentes especies químicas (Hällström and Blanck 1985; Yang *et al.* 2007).

Este modelo ha sido fructífero durante más de 100 años en los laboratorios y ofrece ventajas para los estudios de genotóxicos, además de ser un sistema promisorio para el estudio de daño reprotóxico ya que los genes reguladores de la reproducción se encuentran conservados en gran medida y comparten similitudes en la espermatogénesis con el humano (Adams *et al.* 2000; Botas 2007; King, Aggarwal, and Aggarwal 1968).

Una limitante de este modelo es que sus gónadas son hialinas, por lo que la valoración del efecto de genotóxicos en la morfología de las estructuras reproductoras hace necesaria la inspección visual minuciosa a través de la disección. Este aspecto podría superarse si la inspección visual directa (sin necesidad de disectar al organismo) pudiera informar de la presencia y posible funcionalidad de las gónadas, además de que haría posible mantener al organismo vivo para cruza posteriores, esta característica está presente en moscas con gónadas pigmentadas como *Drosophila mulleri*.

#### ***4. Drosophilla mulleri***

El género *Drosophila* se divide en grupos debido a su variabilidad, desde el punto de vista morfológico el grupo Repleta es de los más importantes, se caracteriza por un mesonoto grisáceo o marrón, cada queta se encuentra rodeada de manchas negras o marrón oscuras que en ocasiones se encuentran ausentes o fusionadas formando patrones elaborados. En el grupo se encuentran las especies de mayor tamaño, con gran variabilidad genética, por lo que se forman cinco subgrupos; hydei, mercatorum, repleta, fasciola y mulleri (Durando *et al.* 2000; Richardson 1977; Simpson 2002; Throckmorton 1982; Vilela 1983; M. Wasserman and Koepfer 1979; Marven Wasserman and H. Roberta 1930; Marvin Wasserman 1968; Marvin Wasserman and Koepfer 1977, 1980; Marvin Wasserman and Richardson 1987; Wasserman 1972, 1960; Wasserman, Fontdevila, and Ruiz 1983).

El subgrupo mülleri, es la subunidad mayor con 36 especies, que se agrupan en cinco complejos, donde el complejo mulleri es el más grande. La distribución geográfica del complejo está limitado a los hábitats del desierto (Wasserman, Fontdevila, and Ruiz 1983; Vilela 1983). Se considera que el ancestro del complejo formaba poblaciones semiaisladas que aún tenían intercambio genético y posteriormente se diferenció en subespecies, lo que agrupa a las especies en un nivel por

debajo del complejo o “clusters” dada sus relaciones reproductivas (Hasson, Naveira, and Fontdevila 1992). Lo que deja a *Drosophila mulleri* dentro de la siguiente clasificación:

Reino: Animalia

Fila: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Diptera

Familia: Drosophilidae

Género: *Drosophila*

Grupo: *Repleta*

Subgrupo: *mulleri*

Complex: *mulleri*

Cluster: *D. mulleri*

Especie: *Drosophila mulleri*

Nuestro grupo de trabajo ha observado y registrado el ciclo de vida de *D. mulleri*, obteniendo una duración de dieciocho días a partir de la fertilización del huevo (0 h), la fase larvaria incluye tres estadios, larva de primer estadio (51 h), larva de segundo estadio (102 h) y larva de tercer estadio (164 h), la fase de pupa (269 h), y por último el adulto, que aparece a los 18 días (432 h), como se puede observar en la figura 4.

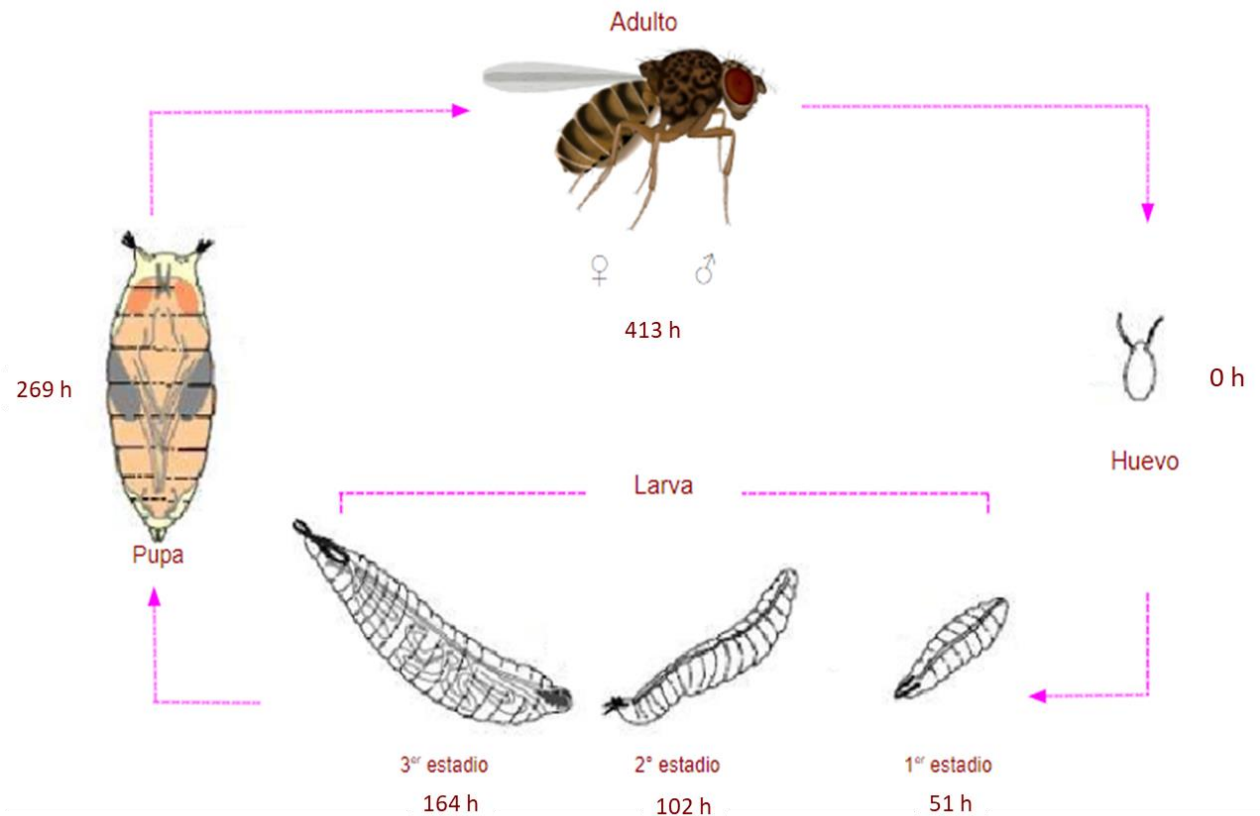


Fig. 4 Ciclo de vida de *Drosophila mulleri* (modificada de Ramon Giraldez)

Su tamaño va de 2.8 a 3 mm, el dimorfismo sexual favorece a la hembra, pero es poco evidente, su coloración es ámbar oscuro, en los costados presenta ocho hileras de cerdas delgadas en posición pre-escutelar, con manchas de color café en el tórax, características del grupo filogenético, presentan antenas de color amarillo-café y ojos rojos como se observa en la figura 5 (Durando *et al.* 2000; Patterson 1943; Patterson and Mainland. 1944).

Los machos de este grupo presentan los testículos pigmentados, color que varía dependiendo de la especie y se acentúa con la edad de la mosca, en el caso de *D. mulleri* tienen coloraciones que van de amarillo a rojo, es decir entre más edad tienen los machos, más rojizos serán los testículos (Patterson and Mainland. 1944). Precisamente esta coloración en los testículos de *D. mulleri* es la que hace al organismo adecuado en este trabajo, ya que las gónadas masculinas son visibles y de gran tamaño como se observa en el esquema mostrado en la figura 6. Esta cualidad facilita la visualización de daños morfológicos en testículos sin que sea necesario disectar al organismo (Hammoud *et al.* 2010; Ianella, Azeredo-Oliveira, and Itoyama 2008; Rajpurohit, Oliveira, Elges, *et al.* 2013).



Fig. 5 Morfología externa de moscas *Drosophila mulleri*: A. posición lateral; B. Macho en posición ventral donde se pueden apreciar los testículos coloreados en tono amarillo (foto de Rubi Evangelista).

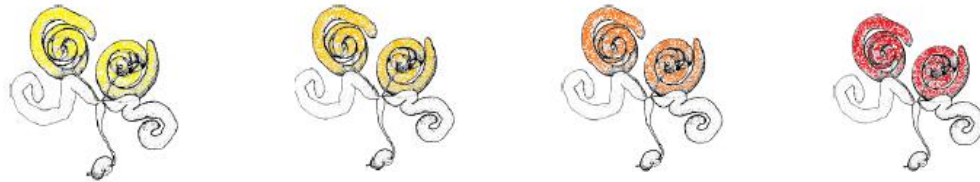


Fig. 6 Cambio de pigmentación en testículos de *D. mulleri* (modificado de Ramirez-Flores 2015).

La distribución de esta mosca va desde el desierto de Sonora hasta el Sur de Estados Unidos y su alimentación es principalmente de plantas de desierto. Se encuentra asociada a ambientes xerófilos, por lo que se alimenta de cactus en descomposición, metabolizando productos de la fermentación (Rajpurohit et al. 2013). En laboratorio se mantiene en medio banana-opuntia ya que existen algunas diferencias en la actividad metabólica de las moscas, por su adaptación a distintos ambientes, pero se ha mostrado que muchos de los genes responsables de la activación de compuestos se han conservado en las moscas y son comunes al humano (Adams et al. 2000; Fischer and Maniatis 1985; Yang et al. 2007).

Por lo que, el ciclo de vida corto (respecto a mamíferos), el poco espacio necesario para su mantenimiento, los rasgos conservados, sumados a la pigmentación de testículos según la madures sexual en machos, *D. mulleri* resulta ser una buena propuesta como modelo complementario a *D. melanogaster* en estudios de daño reprotóxico y transgeneracional (Patterson and Mainland. 1944;

Rajpurohit et al. 2013). Además, al obtener resultados favorables, *D. mulleri* podría brindar información de aquellos ambientes extremos donde es menos frecuente *D. melanogaster*.

La introducción de un modelo alternativo para valorar daño genético implica un proceso de validación para documentar su respuesta al cambio en el ambiente a través de una o varias variables de respuesta (viabilidad, metabolismo, fertilidad, daño genético, etc.). Para lo cual se recurre al uso de sustancias de referencia que han mostrado inducir la respuesta de interés, por ejemplo, rompimiento del ADN, mutación puntual y toxicidad reproductiva, entre otras (Butterworth, Gunatilaka, and Gonsebatt 2001).

Por ejemplo, la N-nitrosodimetilamina (NDMA), es una sustancia de referencia, es decir, ha sido estudiada y catalogada como compuesto alquilante y promutágeno, además ha sido confirmada como un agente carcinógeno. Los estudios se han realizado en insectos, mamíferos e incluso en células humanas (Agency for Toxic Substances and Disease Registry 2005; ATSDR 1999, 2017; EPA 2014a; García, Haza, and Morales 2011; Mesinga, Speijers, and Meulenbelt 2003).

## **5. N-nitrosodimetilamina (NDMA)**

La N-nitrosodimetilamina (NMDA) puede ser sintetizada por bacterias nitrificantes, por lo que podemos encontrar sales como nitratos y nitritos a consecuencia del ciclo del nitrógeno, donde estas bacterias actúan, a pesar de que estas sales no son tóxicas, sus metabolitos, es decir sus derivados, pueden tener esta capacidad. Estos metabolitos podrían llegar a los humanos por la fijación en plantas o animales que consumimos, debido a que el ciclo del nitrógeno, figura 7, es de suma importancia en la productividad de cultivos (Rees et al. 2005; Cerón-Rincón and Aristizábal-Gutiérrez 2012).

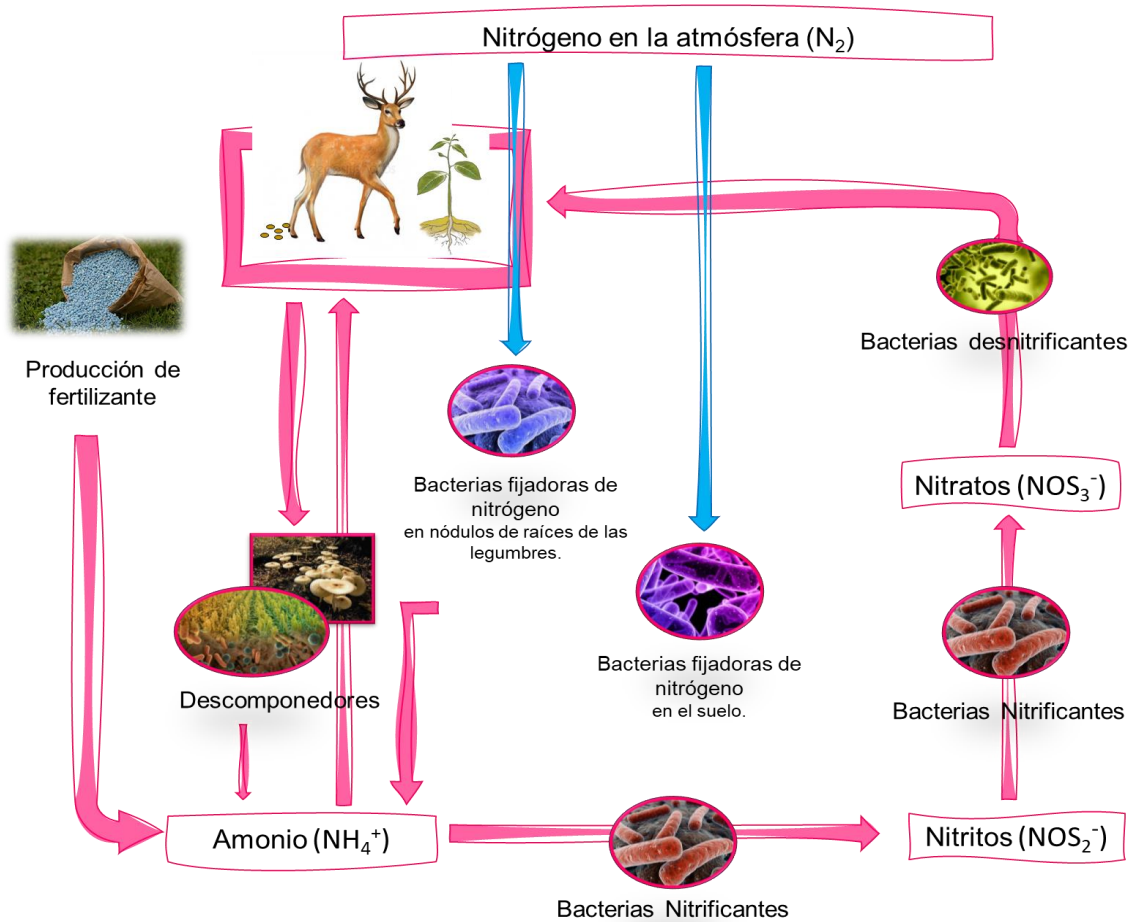


Fig. 7 Ciclo del nitrógeno (modificada de Murray y Murray, 2013)

El ciclo del nitrógeno puede verse afectado por diversas actividades humanas, por ejemplo, la aplicación de fertilizantes nitrogenados que se usan para agricultura, los residuos orgánicos o industriales sin tratamiento que no son sometidos a tratamientos de depuración, los vegetales y los productos cárnicos son de las principales fuentes de exposición de nitratos en humanos. Algunas especies vegetales tienen gran capacidad de acumulación de nitrato, principalmente los productos de hoja. El grado de acumulación no sólo depende del tipo y de la variedad genética, sino también de la temperatura, la luz solar, el nitrógeno disponible, o el modo de cultivo (García, Haza, and Morales 2011).

Algunas bacterias fijan el nitrógeno en las hojas de los vegetales, de donde los animales obtendrán el nitrógeno que por metabolismo eliminarán en forma de urea. Las N-nitrosaminas son

especialmente de interés, una de las más importantes es la N-nitrosodimetilamina, considerada un promutágeno o bien mutágeno indirecto, ya que el compuesto debe ser metabolizado para tener o incrementar su actividad genotóxica y ejercer su efecto, proceso realizado por el complejo de enzimas conocidas como citocromos P450 (Mesinga, Speijers, and Meulenbelt 2003).

La NDMA que es una dialquilnitrosamina, formada por la reacción de la dimetilamina con el ácido nitroso, reacción que se muestra en la figura 8, se forma por ejemplo en zonas industriales, en el aire, el agua y el suelo. En la actualidad solo se usa para investigación debido a su efecto como carcinógeno y teratógeno (ATSDR 1999, 2005, 2017; EMS 1975; EPA 2014a; Gichner, Velemínský, and Underbrink 1980), pero como hemos mencionado, también puede formarse en procesos biológicos que pueden acelerarse por fuentes antropogénicas.

Como ejemplo de los procesos donde se puede formar la NDMA o ponerse en exposición están el procesamiento prolongado de alimentos o el tratamiento de aguas negras, en la exposición al humo del tabaco, el tabaco para mascar, alimentos como las carnes ahumadas, la cerveza, el pescado, quesos, artículos de baño y productos cosméticos (Beland and Poirier 1994; EPA 2014b; EPA United States Environmental Protection Agency 2015a; Lijnsky 1999; Williams, Mori, and McQueen 1989).



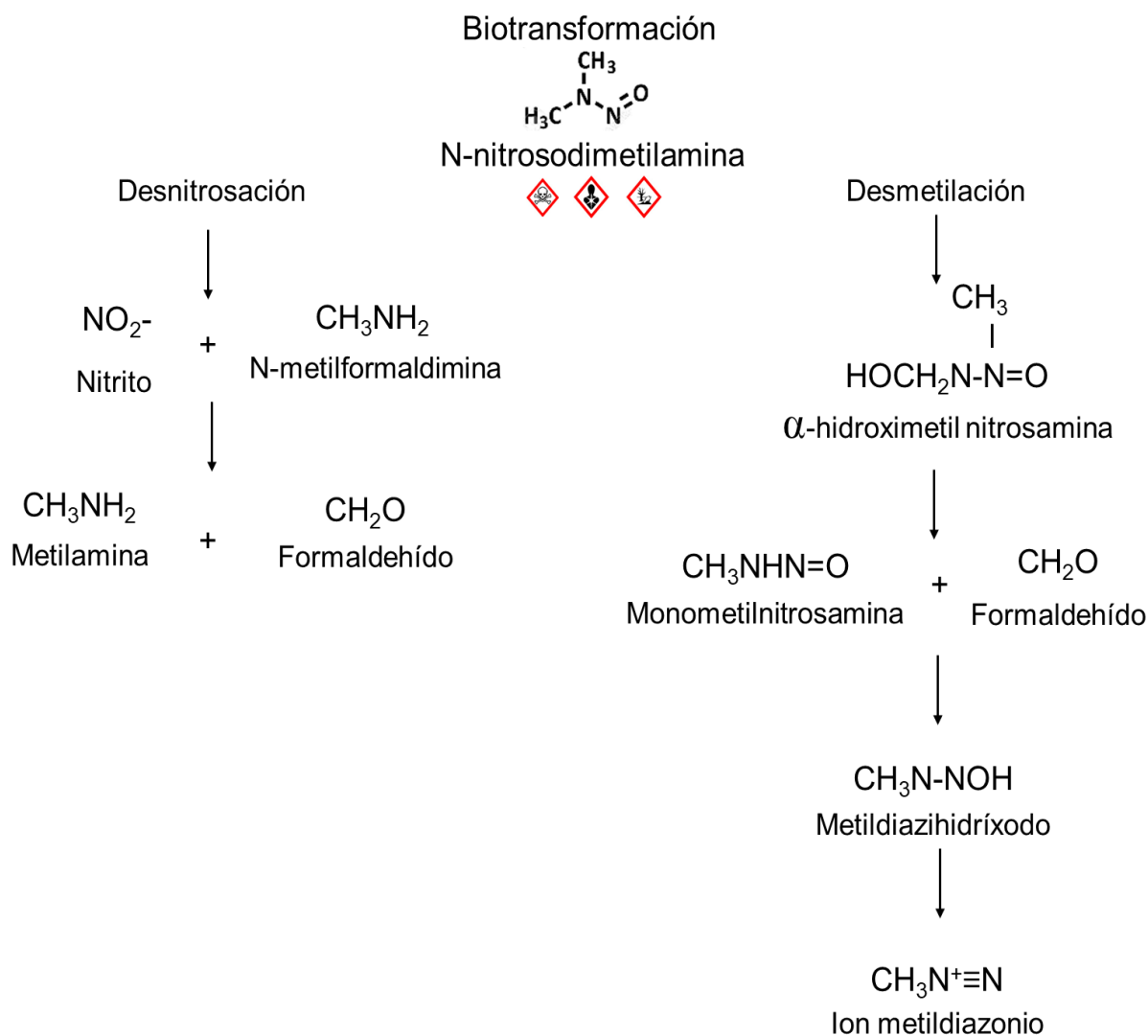


Fig. 8. Biotransformación de la N-nitrosodimetilamina (modificado de WHO, 2008)

Los metabolitos de la NDMA es un agente alquilante monofuncional que se caracteriza por agregar grupos alquilo al DNA, modificando las características fisicoquímicas de las bases involucradas y promoviendo la ruptura de la molécula (ATSDR 1999, 2005, 2017; EMS 1975; EPA 2014a; Gichner, Velemínský, and Underbrink 1980). En mamíferos, su conversión metabólica depende del complejo enzimático P450-CYP2E1 y la función del sistema oxidasa mixto. En *D. melanogaster*, la NDMA altera la diferenciación de las gónadas del macho e induce esterilidad en los organismos expuestos durante la fase larvaria (Ramos-Morales and Vega García 2008). Cuando un tóxico como la NDMA, hace contacto con el organismo y llega a torrente sanguíneo de donde se distribuye a diferentes órganos donde puede causar daños, desecharse o acumularse.

Las sustancias complejas, gracias al catabolismo, se transforman en moléculas más simples a lo que llamamos biotransformación, como resultado de este proceso se obtiene una activación que se puede llamar bioactivación lo que indica que los metabolitos del compuesto tienen algún efecto dañino para el organismo o algún órgano de éste; por otro lado, puede darse un proceso de desintoxicación que lleve a la eliminación de los metabolitos producidos (Peña, Carter, and Ayala-Fierro 2001). Esas sustancias pueden tener efecto aún en generaciones posteriores.

## **6. Daño reprotóxico y transgeneracional**

Podemos hablar de daño reprotóxico cuando un organismo se ve afectado en su fertilidad o fecundidad, efecto causado por un compuesto en específico o como reacción al ambiente. En el caso de los organismos fértiles, que tienen descendencia, llamada generación  $F_1$ , y esta a su vez tiene progenie, llamada  $F_2$ . Si la generación  $F_2$  presenta daños en DNA o morfológicos relacionados a la exposición de los organismos  $F_0$ , podremos asociar la exposición a un daño transgeneracional.

Todas las células somáticas tienen la misma información genética, pero cada tipo celular tiene una estructura y función característica que se debe a la expresión diferencial del genoma, expresión que es regulada principalmente por mecanismos epigenéticos. Estos mecanismos son heredables sin la alteración en la secuencia de nucleótidos del DNA, que funciona activando y desactivando genes funcionales. Además, las modificaciones epigenéticas pueden modificar de diversas maneras al material hereditario, por ejemplo, metilar residuos de citosina en el DNA o bien modificar la estructura de la cromatina (Nakao 2001; Wolffe and Matzke 1999).

La metilación del DNA se ha reportado en bacterias, hongos plantas y otros organismos, como ejemplo claro se ha demostrado de manera experimental la metilación en DNA en los primeros estadios del desarrollo en *Drosophila* (Bird 2002; Paulsen and Ferguson-Smith 2001). En mamíferos se ha visto que la metilación está involucrada en la diferenciación celular, aumento de mutaciones espontáneas y en la inactivación transcripcional. (Bird 2002; Paulsen and Ferguson-Smith 2001; Bird and Wolff 1999).

Los patrones de metilación en las células somáticas son generalmente estables y heredables, pero en células germinales son reprogramados en el desarrollo embrionario temprano y es común que el DNA de las células germinales femeninas se encuentren menos metilada que las masculinas (Bird 2002; Paulsen and Ferguson-Smith 2001; Bird and Wolff 1999). En ratones transgénicos con mutaciones para las DNA metiltransferasas, se ha demostrado que los patrones de metilación son vitales para el desarrollo regular, aunque una de las mayores interrogantes ha sido el dilucidar como se mantiene esta metilación en las células diferenciadas (Bestor 2000; Li, Bestor, and Jaenisch 1992; Okano *et al.* 1999).

Para la replicación del DNA también es indispensable la metilación, en este caso la cadena nueva no se encuentra metilada y así es posible identificar y regular a los transposones y regiones improntadas (Costello and Plass 2001; Paulsen and Ferguson-Smith 2001; Bird and Wolff 1999; Araujo *et al.* 1998). Otras modificaciones epigenéticas importantes, adicionales a la metilación, son la acetilación, fosforilación y ubiquitinación, además puede afectar a las histonas, esto último resulta de vital importancia por el alto número de modificaciones postraduccionales en las histonas (Richards and Elgin 2002; Jenuwein and Allis 2001; Rakyan *et al.* 2001).

Se sugiere que el patrón de modificaciones en las histonas dicta las interacciones que tienen las proteínas asociadas a los cromosomas, lo que modifica el empaquetamiento y la regulación en la expresión del genoma (Richards and Elgin 2002; Jenuwein and Allis 2001; Rakyan *et al.* 2001). Así, los patrones de metilación son de gran importancia para regular de manera adecuada la expresión de los genes y asegurar un desarrollo regular, de lo contrario podría verse afectada la estabilidad del genoma y estos efectos podrían ser heredados a otras generaciones (Barber *et al.* 2006; Costello and Plass 2001; Plass 2002; Yauk *et al.* 2002).

Si bien el daño que un tóxico causa puede ser evidente en el organismo que fue expuesto, existe evidencia de que estos factores también pueden causar efectos de desarrollo o genéticos en generaciones no expuestas, aun cuando la exposición sólo haya ocurrido en uno de los progenitores (Laubenthal *et al.* 2012; Skinner 2008). La estabilidad en el genoma es difícil de analizar en las diferentes generaciones de humanos, debido al tiempo que debe transcurrir para recobrar una nueva generación de individuos.

Y estos efectos se han observado en ratas, ratones, y en moscas, para la exposición en ratones, Skinner (2008) sugiere que la generación F3 sería la primera en dar información sobre el daño transgeneracional, sin embargo, en *Drosophila*, al ser un organismo holometábolo y no desarrollar las células germinales antes podemos ver el efecto desde la generación F2 como se observa en la figura 9.

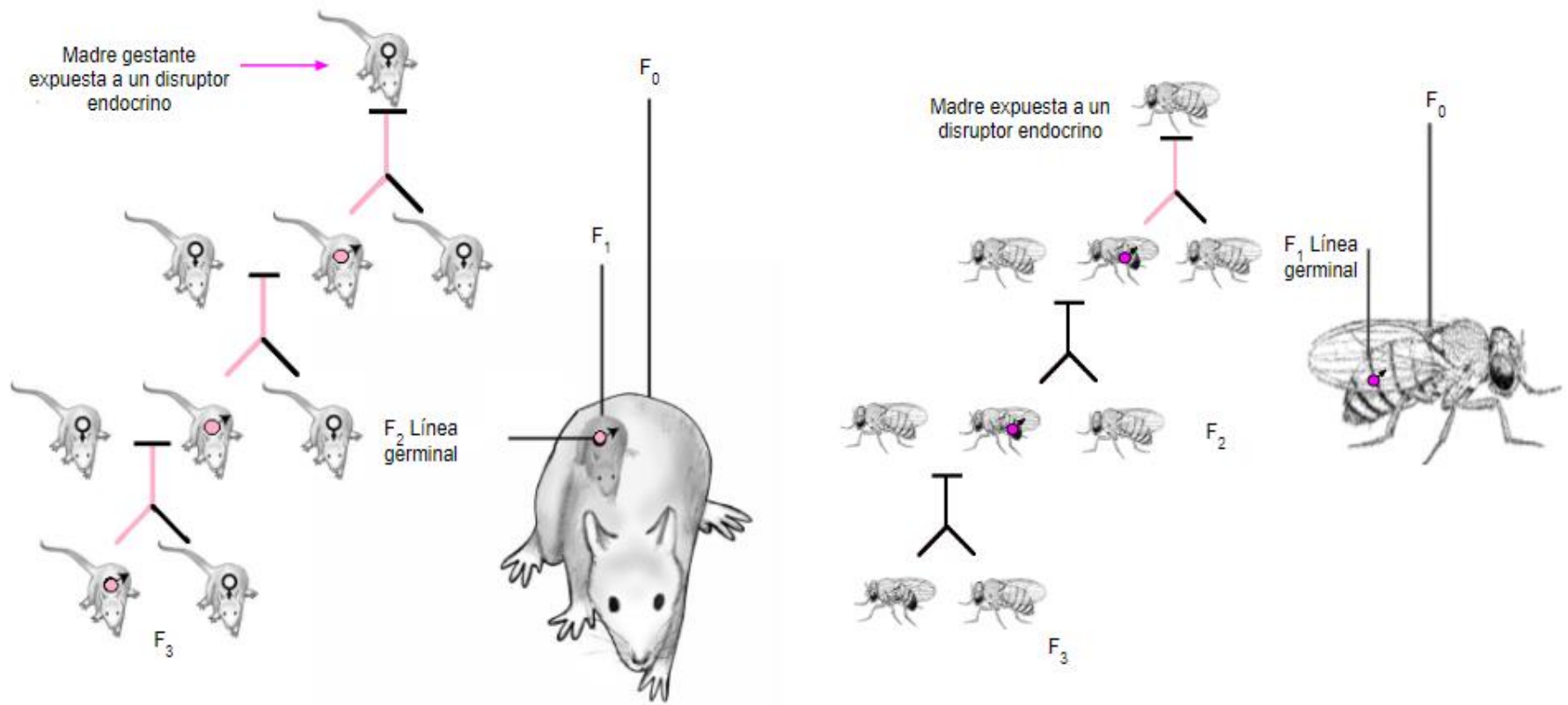


Fig. 9 Efecto transgeneracional en ratones y moscas, podemos observar que en mamíferos el daño transgeneracional se observa hasta la generación F<sub>3</sub> y en organismos como *Drosophila* en la F<sub>2</sub>. (Modificado de Skinner, 2008)

Se ha comprobado en modelos de roedores que se presenta susceptibilidad a enfermedades u otros síntomas, después de la exposición a contaminantes, productos químicos y otros factores ambientales. Podemos mencionar la exposición a radiación o quimioterapia como fuentes de mutaciones y daño en el DNA para humanos (Laubenthal et al. 2012; Merlo et al. 2009; Skinner 2008).

Existe evidencia en roedores e incluso en humanos que la exposición a mutágenos, como podría ser la NDMA, puede generar daño en células germinales y mutaciones en la línea germinal que pueden heredarse (O'Brien et al. 2013). Estudios epidemiológicos informan que el efecto de algunos compuestos sobre células germinales ataca las células de esperma reduciendo su motilidad o afectando de alguna manera su morfología (Kumar 2004; Altamirano-Lozano et al. 2014; Xu et al. 1993).

## II. JUSTIFICACIÓN

---

Debido a que todos los días estamos expuestos a compuestos que pueden afectar nuestra salud. Los compuestos tóxicos pueden generar daño que derive en alergias o enfermedades, ya sean momentáneas o degenerativas como el cáncer, afectar la capacidad reproductiva o bien causar la muerte. Cada vez es más frecuente el reporte de casos de niños con trastornos, síndromes o enfermedades que antes solo se presentaban en adultos, así como se ha incrementado la frecuencia de parejas con problemas para tener hijos.

Los agentes físicos, químicos o biológicos que interfieren con esta actividad se les denomina reprotóxicos por el deterioro que se presenta en la función sexual o en el daño estructural al aparato reproductor. Algunos compuestos con efectos reprotóxicos también se asocian con efectos transgeneracionales, es decir que no solo los individuos expuestos al tóxico reflejan efectos, sino que generaciones posteriores también presentan problemas. Para estudiar este daño en la actividad reproductiva es importante encontrar modelos que muestren los efectos de los diversos compuestos.

Sin embargo, este tipo de estudios son poco frecuentes ya que los organismos que se usan requieren de espacio, tiempo y presupuesto considerable para su manutención. Los insectos son una alternativa en la investigación y, en particular, *Drosophila melanogaster* es una buena opción experimental con un ciclo de vida corto, requiere poco espacio y se necesita de un presupuesto moderado para su mantenimiento, además, es factible analizar el efecto de una exposición en lo organismos directamente expuestos y a lo largo de varias generaciones en un tiempo razonable.

La especie *Drosophila mulleri* pertenece al grupo Repleta y presenta pigmentación en los testículos por lo que se pueden hacer una inspección preliminar de la información de las estructuras y mantener vivas a las moscas para realizar cruces posteriores, lo que la convierte en el organismo idóneo para complementar la información obtenida a partir de *D. melanogaster* en estudios de daño reprotóxico y transgeneracional. Más adelante será necesaria la disección de las moscas para confirmar el diagnóstico inicial y relacionar esta información con la capacidad de producción de progenie y la calidad de ésta.

### III. HIPÓTESIS

---

La N-nitrosodimetilamina es un promutágeno que interfiere con la formación regular de gónadas y la fertilidad de los organismos expuestos en *Drosophila melanogaster*, por su cercanía filogenética, la exposición de moscas *Drosophila mülleri* a la N-nitrosodimetilamina afectará la formación de gónadas y la fertilidad de las moscas tratadas (daño reprotóxico). Además, de afectar en fertilidad y fecundidad a generaciones posteriores que no se encuentren expuestas al promutágeno (daño transgeneracional).



## IV. OBJETIVOS

---

### Objetivo General:

Determinar si las moscas de la especie *Drosophila mülleri* son organismos sensibles al daño reprotóxico y transgeneracional inducido por la NDMA.

### Objetivos Particulares:

- › Comparar la respuesta de *D. melanogaster* y *D. mülleri*, para verificar la similitud.
- › Comprobar que la exposición a NDMA muestra daño morfológico en la formación de gónadas y en la placa genital de *D. mülleri*.
- › Cuantificar la proporción de sexos, fertilidad y cantidad de pro genie en la población tratada con NDMA para observar una diferencia con los organismos no tratados.
- › Observar que la exposición de los progenitores machos a la NDMA tiene efecto reprotóxico y transgeneracional.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron dos especies de moscas, pertenecientes al género *Drosophila*, como modelo biológico en el desarrollo de este trabajo por su ciclo de vida corto y el número de descendientes que produce. Por el amplio conocimiento de su biología, *Drosophila melanogaster*, moscas de la figura 10, fue la línea de moscas de referencia con la que se valorará la respuesta aportada por las moscas de la especie *Drosophila mulleri* observada en la figura 11, especie que se propone incorporar para el análisis de daño reprotóxico y transgeneracional, usando como indicador de daño las gónadas masculinas que presentan pigmentación.



Fig. 10 *Drosophila melanogaster* en posición lateral



Fig. 11 *Drosophila mulleri*: A) Posición lateral; B) Posición ventral.

### 1. Mantenimiento de cultivos

Ambas especies pertenecen al género *Drosophila*, sin embargo, las diferencias en la duración del ciclo de desarrollo, aspecto morfológico y su distribución geográfica modifica el tipo de alimento.



*Drosophila melanogaster* silvestre, cepa Canton S. Las moscas se mantuvieron en un medio de cultivo estándar a base de: agar (0.6%), harina de maíz (6%), sacarosa (7.6%), levadura desamargada (4.1%) y agua (81.7%).



*Drosophila mulleri* silvestre. Las moscas se crecieron en un medio de cultivo banana/opuntia a base de: agar (0.7%), levadura desamargada (2.8%), malta (3.1%), polvo de opuntia (0.2%), plátano (14.2%), miel de maíz (4.8%) y agua (74.2%).

A ambos medios de cultivo se les agregó ácido propiónico y nipagín simple, como conservadores, después se vierten alrededor de 5 ml en tubos homeopáticos (2 cm de diámetro por 9.5 cm de alto). Los cultivos de ambas cepas se mantuvieron a 25°C y 60% de humedad relativa.

## **2. Organismos para tratamiento**

Debido a que la duración del ciclo de desarrollo de las dos especies de *Drosophila* es diferente se adecuó la metodología a cada especie. Un cultivo maduro de cada cepa se transfirió a medio fresco, en frascos de cristal de 4.5 cm de diámetro y 12 cm de alto, para que las hembras ovipositarán. En el caso de *D. melanogaster* se dejó un lapso de ocho horas, mientras que para *D. mulleri*, las moscas permanecieron durante 24 horas. Pasando este tiempo los adultos fueron retirados y los frascos se almacenaron a temperatura ambiente, dejando que las larvas se desarrollaran hasta el tercer estadio larvario.

## **3. Tratamiento**

### **3.1 Concentraciones**

Se utilizó el compuesto N-Nitrosodimetilamina (NDMA) (SIGMA-ALDRICH, Bellefonte, PA USA.) (62-75-9), para preparar una solución de NDMA a 1.50E+00 mM, esta concentración sería la más alta y a partir de ella también se prepararon 19 diluciones sucesivas, utilizando como disolvente agua destilada, hasta llegar a la concentración más baja 7.63E-05 mM, el agua destilada también fue usada como testigo negativo, lo que da un total de 21 concentraciones experimentales. Previamente se prepararon tubos de vidrio de 2 cm de diámetro por 9.5 cm de alto que contenían 1 gramo de medio instantáneo para *Drosophila* (Carolina Biological Supply, Formula 4-24) al que se agregaron 4.5 ml de la solución a probar o de agua destilada.

### **3.2. Obtención de larvas**

Cuando los organismos alcanzaron el tercer estadio de desarrollo larvario, 72 h para *D. melanogaster* y 164 h para *D. mulleri*, se extrajeron con una solución de sacarosa al 20 o 30 % para *D. melanogaster* y *D. mülleri*, respectivamente. La solución de sacarosa se vertió en los tubos que contenían las larvas, las cuales flotaron por diferencia de densidad (Nöthiger 1970). La solución de sacarosa y las larvas se vertieron a un embudo de separación, se retiraron los restos de medio de cultivo y se enjuagaron con solución de sacarosa. Una vez sin residuos, se enjuagaron con agua corriente con lo que se rompió el gradiente de densidad y las larvas se recibieron en una malla de nylon.

Con ayuda de una espátula pequeña se pusieron grupos homogéneos de larvas (80-100 para *D. melanogaster* y 50-70 para *D. mulleri*) en cada tubo que ya contenía el medio instantáneo para mosca enriquecido con la solución de NDMA a probar o agua destilada. Se colocó un tapón de hule-espuma para evitar que las larvas escaparan. A partir de este momento las larvas se alimentaron del medio hidratado y se mantuvieron a 25°C y 60% de humedad relativa. Para cada especie se hicieron dos réplicas por experimento y el experimento completo se repitió en tres ocasiones.

### **3.3. Determinación de toxicidad**

Una vez que emergieron los adultos se cuantificó y registró el número de moscas, separando por hembras y machos. Se revisó la morfología externa de las moscas, poniendo especial atención a la placa genital de ambas especies, y en el caso de *D. mulleri* también se visualizaba la presencia y forma de los testículos, ayudándonos de su pigmentación de acuerdo con Ramos et al (1993) y Markow y O'Grady (2005).

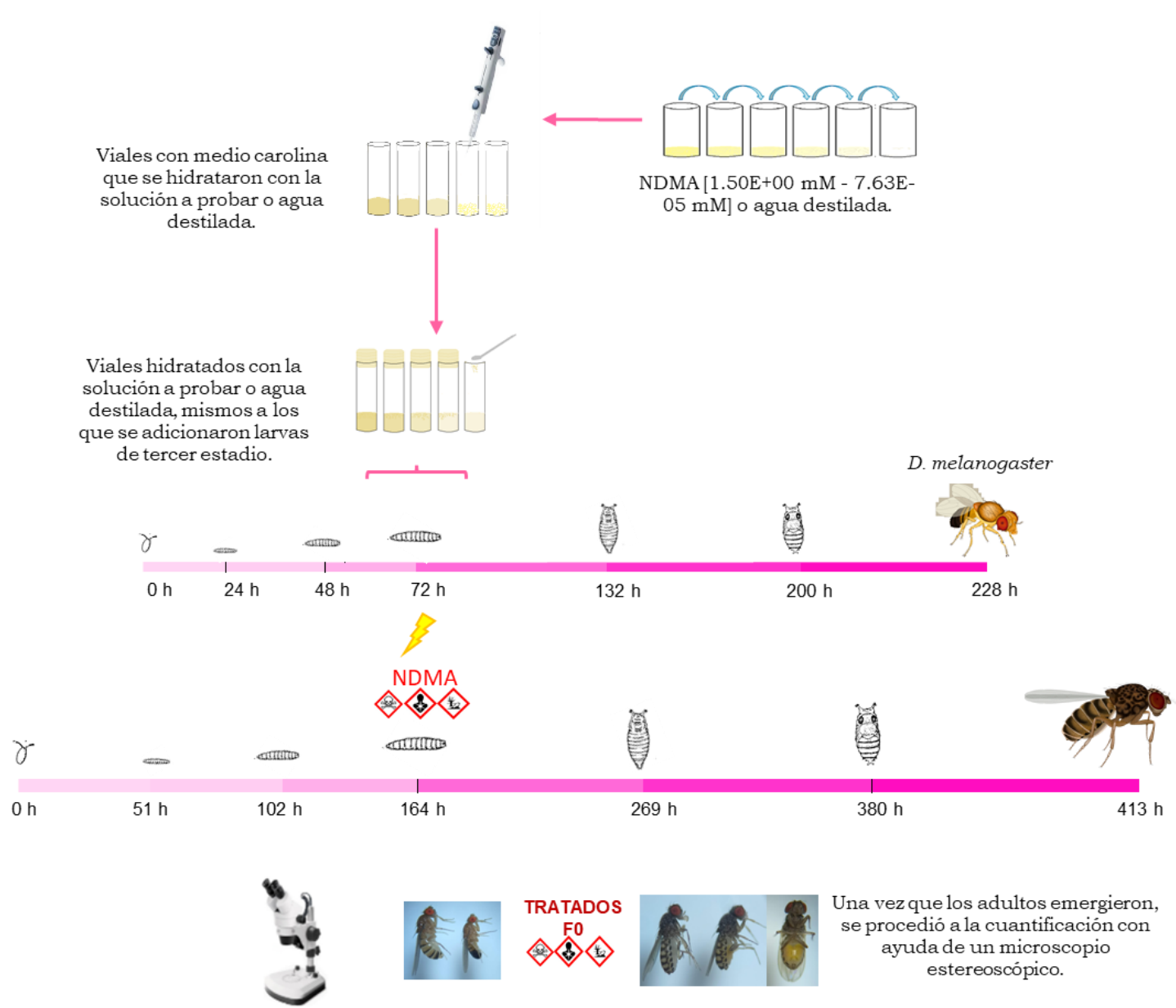


Fig. 12 . Exposición de moscas *D. melanogaster* y *D. mulleri* a NDMA

#### **4. Cruzas para evaluar fertilidad y la cantidad de la progenie de organismos tratados (efecto reprotóxico y transgeneracional).**

Se realizaron treinta cruzas individuales con una hembra no tratada (NT) y un macho tratado (T) (parentales expuestos directamente) con NDMA o con agua destilada, en tubos homeopáticos con medio de cultivo fresco. Se retiró a los progenitores cinco y siete días después, para *D. melanogaster* y para *D. mulleri* respectivamente. Después de doce días de realizar la cruce para *D. melanogaster* y dieciocho para *D. mulleri*, se registró la cantidad de hembras y machos recobrados.

Por cada concentración se sembraron nuevamente treinta parejas de cada concentración ( $F_1 \times F_1$ ). Se considera que las moscas de la generación  $F_1$ , tienen una exposición indirecta al tratamiento ya que, en los organismos expuestos, en este caso los machos, ya estaban presentes las células precursoras de las células germinales. Una vez que emergió la siguiente generación, se registró la cantidad de hembras y machos recobrados en la  $F_2$  y se revisó su morfología y la coloración de los testículos en el caso de *D. mulleri*.

El proceso se repitió nuevamente para sembrar treinta parejas ( $F_2 \times F_2$ ) de cada concentración, retirando y analizando cada pareja al encontrar larvas en los tubos, al emerger los adultos se cuantificó y revisó la morfología de la progenie  $F_3$ . Se considera que las moscas de la  $F_2$  ya no tienen ningún tipo de exposición, ni directa ni indirecta, por lo que, si se presentan diferencias en los biomarcadores evaluados entre las moscas descendientes de moscas expuestas originalmente a la NDMA, con respecto a las moscas descendientes del lote testigo, se tendrá un efecto transgeneracional.

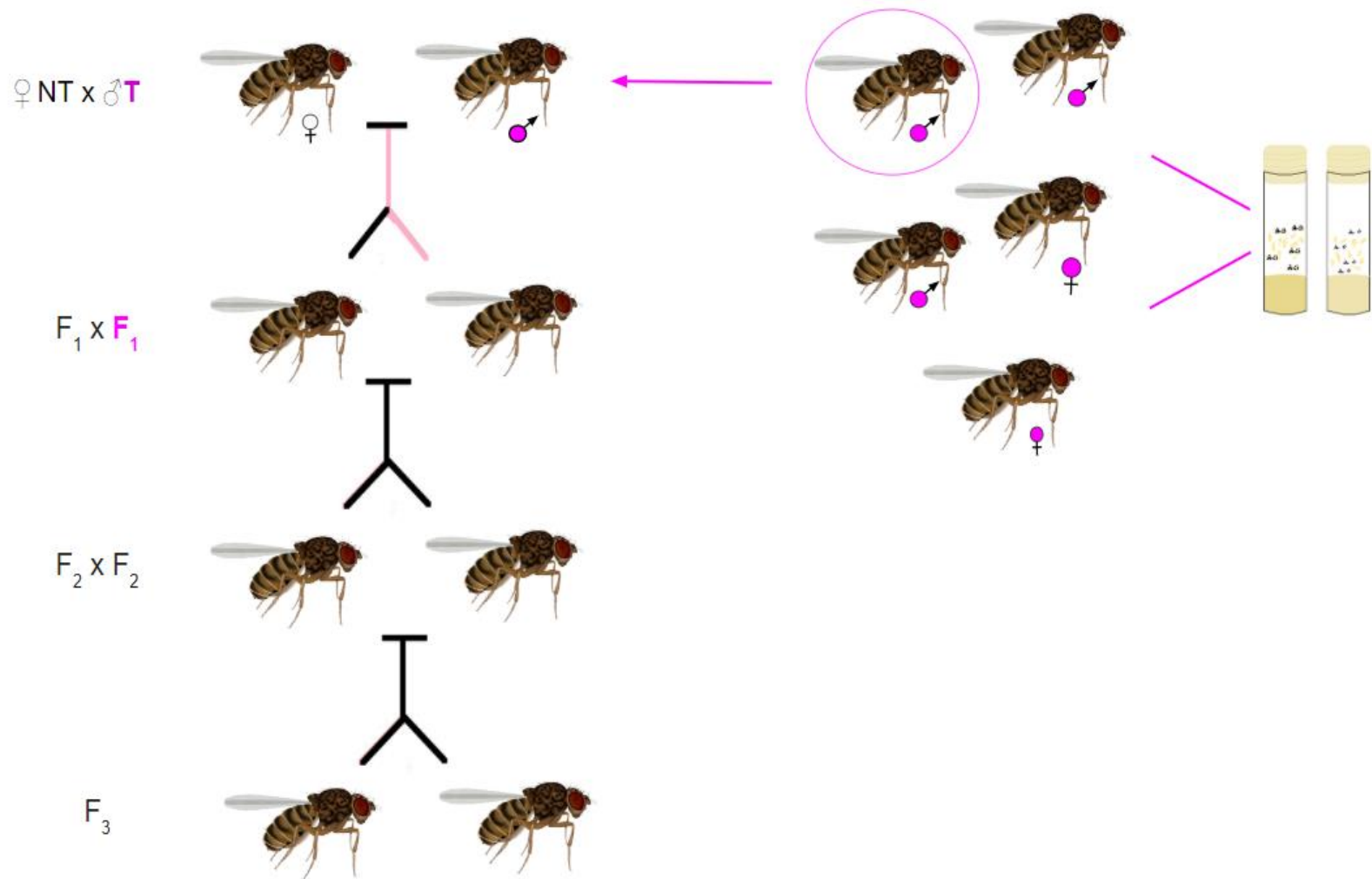


Fig. 13 Cruza de machos tratados (T) con hembras no tratadas (NT) y generaciones posteriores, se marca con rosa los organismos tratados de forma directa (T) e indirecta (F1).

## 5. Disección de aparato reproductor

Una vez que la cruce se realizó y pasaron los días señalados en cada especie, las moscas fueron anestesiadas con éter etílico para la revisión externa de las gónadas de los machos tratados en un microscopio estereoscópico. Con ayuda de pinzas para relojero y agujas de disección se verificó que la estructura observada a nivel externo coincidiera con lo observado una vez que se disectó al organismo. Los daños a nivel de placa genital o anal, así como cambios visibles, respecto a organismos tratados, se registraron para su posterior análisis. Para las generaciones F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> y F<sub>3</sub> ambos organismos de cada cruce fueron revisados. Todos los organismos con daño morfológico aparente fueron disectados.

## 6. Análisis estadístico

Para estimar la toxicidad en las diferentes líneas se cuantificó la sobrevivencia por unidad experimental (tubo homeopático) y se realizó un promedio, además de obtener el error estándar. Para analizar el daño reprotóxico se determinó la fertilidad y progenie promedio por familia. Para poder hacer una comparación entre *D. melanogaster* y *D. mulleri*, la progenie por familia de cada concentración se dividió entre la progenie promedio del testigo de cada especie, de manera que la sobrevivencia del lote testigo fue de 1 (progenie promedio corregida). Adicionalmente se cuantificó la proporción sexual para ver si alguno de los sexos estaba siendo más afectado a causa del tratamiento.

Ecuación 1.

$$\text{Sobrevivencia (S)} = \frac{\sum_{i=1}^n \text{moscas del lote experimental}}{\sum_{i=1}^n \text{moscas del lote control}}$$

Ecuación 2.

$$\text{Fertilidad} = \frac{\text{Tubos con progenie}}{\text{Tubos sembrados}}$$



Ecuación 3.

$$\text{Progenie promedio por familia} = \frac{\sum_{i=1}^n \text{total de progenie por tubos sembrados}}{\text{Número total de tubos con progenie}}$$

Ecuación 4.

$$\text{Progenie promedio corregida} = \frac{\sum_{i=1}^n \text{moscas del lote experimental}}{\sum_{i=1}^n \text{moscas del lote control}}$$

Ecuación 5.

$$\text{Proporción sexual} = \frac{\sum_{i=1}^n \text{número total de } \varphi \text{ o } \sigma}{\sum_{i=1}^n \text{número total de organismos}}$$

Los promedios de la sobrevivencia de las moscas tratadas y de la cantidad de progenie por tubo de las moscas tratadas se comparó con los valores promedio de las moscas testigo mediante un ANOVA de una vía ( $\alpha=0.05$ ) en GraphPad Prism 6. Para comparar la fertilidad de las moscas tratadas y su testigo correspondiente se utilizó la prueba de z para proporciones ( $\alpha=0.05$ ) (Moore 2005). Para la proporción sexual se calculó el intervalo de confianza del 95% con base en los valores del lote testigo.

## VI. RESULTADOS

---

La respuesta de *Drosophila* a la N-nitrosodimetilamina se presenta en dos etapas:

La primera se compone del análisis de toxicidad que las moscas *D. melanogaster* y *D. mulleri* presentan ante la NDMA, conjuntamente se analizó la proporción de sexos en cada concentración. Aunado a esto se hizo el análisis del daño reprotóxico en machos, es decir machos recuperados se cruzaron con hembras no expuestas, para establecer si se afectó la fertilidad y la cantidad de progenie. Para esta etapa también se consideró la morfología de los organismos y se realizaron disecciones para confirmar el estado de las gónadas.

Para una segunda etapa se comparó la fertilidad y el promedio de hijos descendientes de las series testigo y tratadas con NDMA para establecer un efecto transgeneracional, así mismo, se registró y analizó la proporción de sexos. Para esta etapa también se examinó la morfología de las moscas y se realizó la disección de gónadas.

### A) Organismos tratados

#### 1. Toxicidad

En la tabla 1 se muestra la sobrevivencia (promedio  $\pm$  error estándar) de las moscas tratadas con la NDMA. Para *D. melanogaster*, la sobrevivencia en las series experimentales mantiene fluctuaciones (figura 14) y después decae desde la concentración 1.56E-01, presentando diferencias significativas en 1.25E-00 y 1.50E-00 (ANOVA,  $p > 0.05$ ; Dunnett,  $p < 0.05$ ). *D. mulleri*, es una cepa menos prolífica comparada con *D. melanogaster*, sin embargo, el efecto del tratamiento fue más evidente, desde la concentración 2.44E-03, siendo significativamente menor en las concentraciones 1.56E-01, 2.35E01E-01, 3.13E-01 y 4.69E-01 (ANOVA,  $p < 0.05$ ; Dunnett,  $p < 0.05$ ).

La figura 15 nos muestra la proporción de sexos obtenida en ambas especies. Donde, *D. mulleri* presenta mayor dispersión en cuanto a la proporción de sexos, con diferencias significativas en 7.63E-05, 7.81E-02, 3.13E-01 y 4.69E-01 ( $Z, p < 0.05$ ) en la que se recobró mayor proporción de hembras. *D. melanogaster* presenta diferencias significativas en las concentraciones 1.53E-04, 3.01E-04 y 8.33E-01 ( $Z, p < 0.05$ ), donde solo en la primera se recobró un mayor número de machos.

Tabla 1. Moscas del género *Drosophila* tratadas en tercer estadio larvario con NDMA

[ ]	<i>Drosophila melanogaster</i>					<i>Drosophila mülleri</i>				
	Número de moscas	Promedio ± ee	Proporción sexual ± ee		Número de moscas	Promedio ± ee	Proporción sexual ± ee			
			H	M			H	M		
dH2O	436	54.500 ± 8.910	0.473 ± 0.022	0.527 ± 0.022	138	17.250 ± 5.049	0.543 ± 0.068	0.457 ± 0.022		
7.63E-05	306	38.250 ± 10.097	0.447 ± 0.076	0.553 ± 0.076	100	12.500 ± 4.322	0.676 ± 0.097	0.324 ± 0.076 *		
1.53E-04	306	38.250 ± 8.485	0.413 ± 0.065	0.587 ± 0.065 *	120	15.000 ± 6.386	0.658 ± 0.092	0.342 ± 0.065		
3.01E-04	345	43.125 ± 10.609	0.577 ± 0.075	0.423 ± 0.075 *	111	13.875 ± 5.768	0.478 ± 0.114	0.522 ± 0.075		
6.10E-04	480	60.000 ± 8.326	0.438 ± 0.038	0.562 ± 0.038	115	14.375 ± 4.694	0.463 ± 0.085	0.537 ± 0.038		
1.22E-03	354	44.250 ± 7.986	0.470 ± 0.055	0.530 ± 0.055	164	20.500 ± 7.481	0.580 ± 0.074	0.420 ± 0.055		
2.44E-03	395	49.375 ± 9.173	0.458 ± 0.033	0.542 ± 0.033	55	6.875 ± 1.563	0.612 ± 0.096	0.388 ± 0.033		
4.88E-03	389	48.625 ± 8.328	0.483 ± 0.024	0.517 ± 0.024	58	7.250 ± 2.042	0.579 ± 0.090	0.421 ± 0.024		
9.77E-03	317	39.625 ± 7.063	0.508 ± 0.036	0.492 ± 0.036	75	9.375 ± 2.078	0.642 ± 0.038	0.358 ± 0.036		
1.95E-02	243	30.375 ± 7.528	0.425 ± 0.043	0.575 ± 0.043	56	7.000 ± 2.605	0.597 ± 0.034	0.403 ± 0.043		
3.91E-02	327	40.875 ± 6.427	0.438 ± 0.033	0.562 ± 0.033	52	6.500 ± 2.903	0.579 ± 0.083	0.421 ± 0.033		
7.81E-02	294	36.750 ± 8.059	0.457 ± 0.037	0.543 ± 0.037	40	5.000 ± 3.047	0.752 ± 0.114	0.248 ± 0.037 *		
1.56E-01	441	55.125 ± 6.815	0.462 ± 0.045	0.538 ± 0.045	23	2.875 ± 1.076 *	0.461 ± 0.114	0.539 ± 0.045		
2.35E-01	355	44.375 ± 6.827	0.504 ± 0.033	0.496 ± 0.033	18	2.250 ± 1.449 *	0.563 ± 0.000	0.438 ± 0.000		
3.13E-01	312	39.000 ± 5.312	0.492 ± 0.023	0.508 ± 0.023	17	2.125 ± 1.329 *	0.886 ± 0.000	0.114 ± 0.000 *		
4.69E-01	302	37.750 ± 8.207	0.452 ± 0.040	0.548 ± 0.040	1	0.125 ± 0.125 *	1.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000 *		
6.25E-01	242	30.250 ± 4.479	0.453 ± 0.056	0.547 ± 0.056	-					
8.33E-01	200	25.000 ± 5.096	0.578 ± 0.069	0.422 ± 0.069 *	-					
1.04E+00	193	24.125 ± 5.055	0.481 ± 0.054	0.519 ± 0.054	-					
1.25E+00	139	17.375 ± 5.113 *	0.518 ± 0.038	0.482 ± 0.038	-					
1.50E+00	117	14.625 ± 3.438 *	0.512 ± 0.070	0.488 ± 0.070	-					

\*Diferencias significativas de las moscas tratadas con respecto a su testigo P>0.05

\*Diferencias significativas de la proporción de sexos de las moscas tratadas respecto a su testigo.

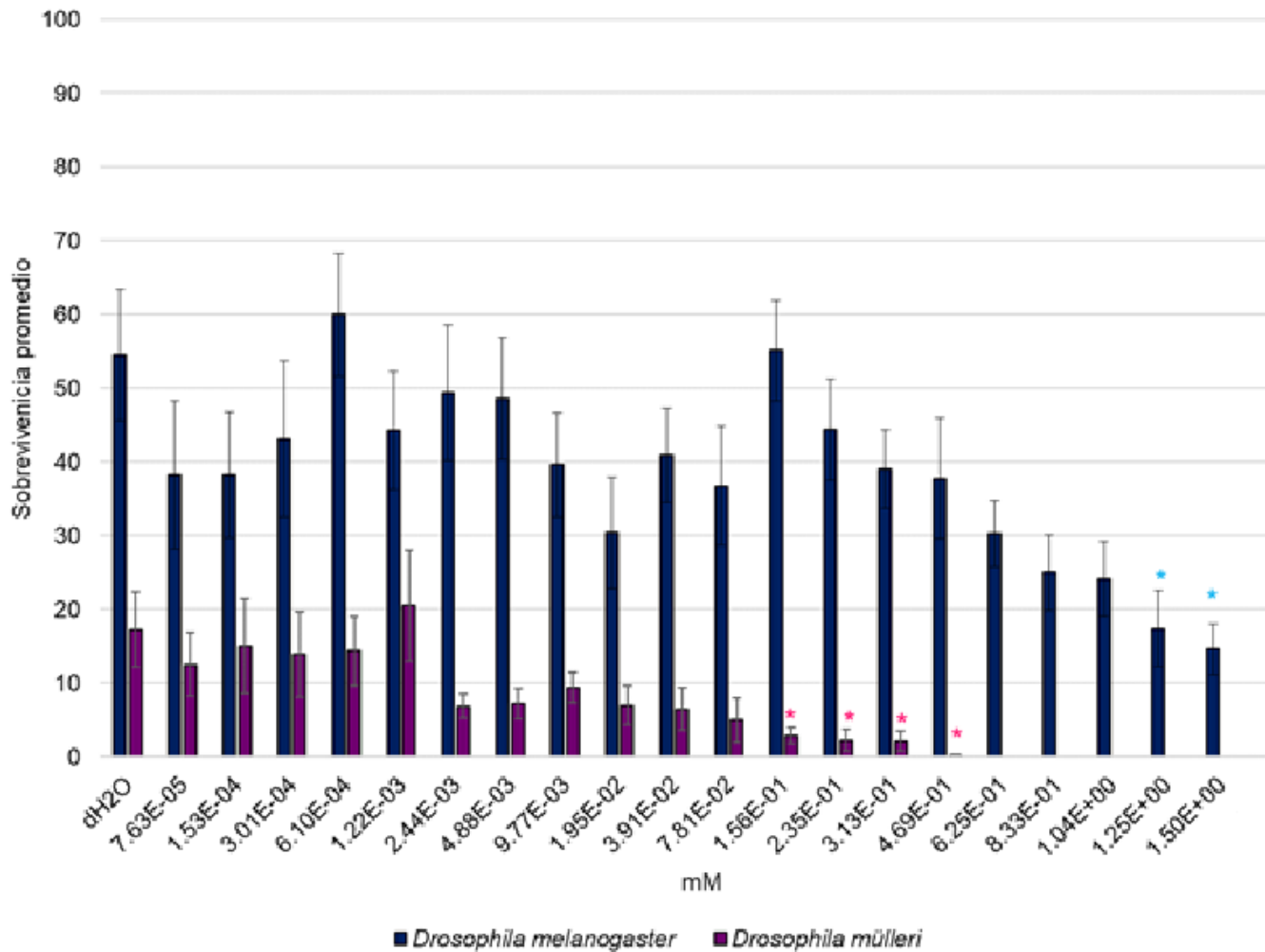


Fig. 14 Sobrevivencia de *Drosophila melanogaster* en azul y *Drosophila mulleri* en morado, (promedio  $\pm$  error estándar).

\*Diferencias significativas en *Drosophila melanogaster* respecto a su testigo.

\*Diferencias significativas en *Drosophila mulleri* respecto a su testigo.

P<0.05

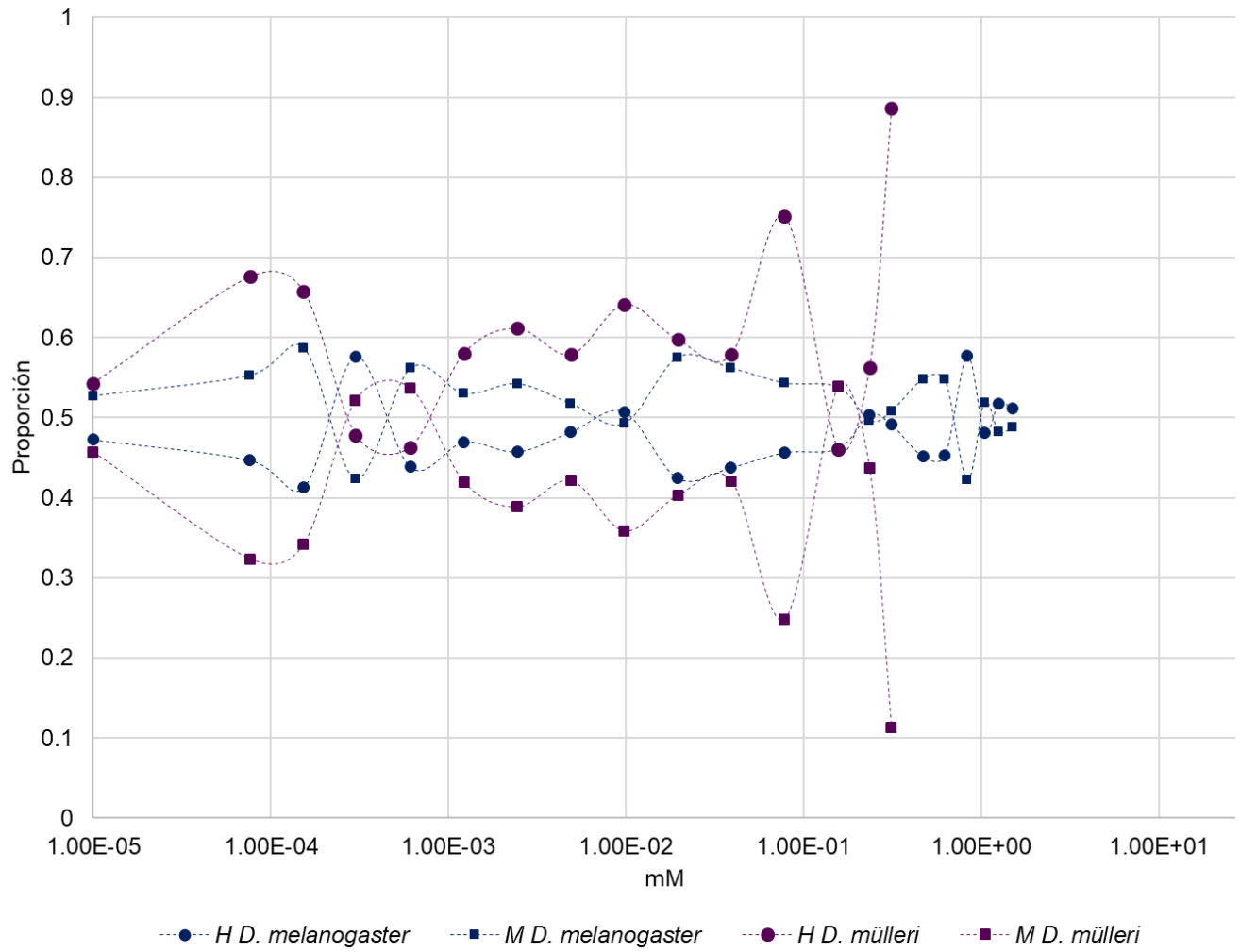


Fig. 15 Índice de proporción sexual de *Drosophila melanogaster* ( azul) y *Drosophila mülleri* (morado) (H, hembras; M, machos).

## 2. ¿Cómo se ven estas moscas?

Se revisaron los tubos de cristal donde se administró el tratamiento y en el caso de *D. mulleri* se observó que en la concentración 1.50E+00 los organismos no llegaron a pupar, sino que aun en larva murieron por la toxicidad del compuesto (figura 16).

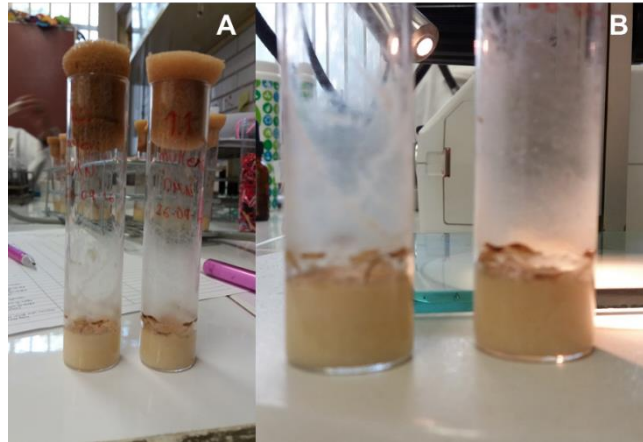


Fig. 16 Tubos homeopáticos de cristal con medio instantáneo para mosca, hidratados con la concentración 1.50E+00 con larvas muertas de *D. mulleri* (fotografías Rubi Evangelista).

En la figura 17 se presentan fotografías de moscas que eclosionaron y murieron al momento (faratos) o bien que murieron en estadio pupal. Al mismo tiempo que se cuantificaba la sobrevivencia se revisaba externamente a los organismos y se encontraron daños a nivel de placa genital tanto en *D. melanogaster* como *D. mülleri*, daño que puede observarse señalado con flechas en la figura número 18.

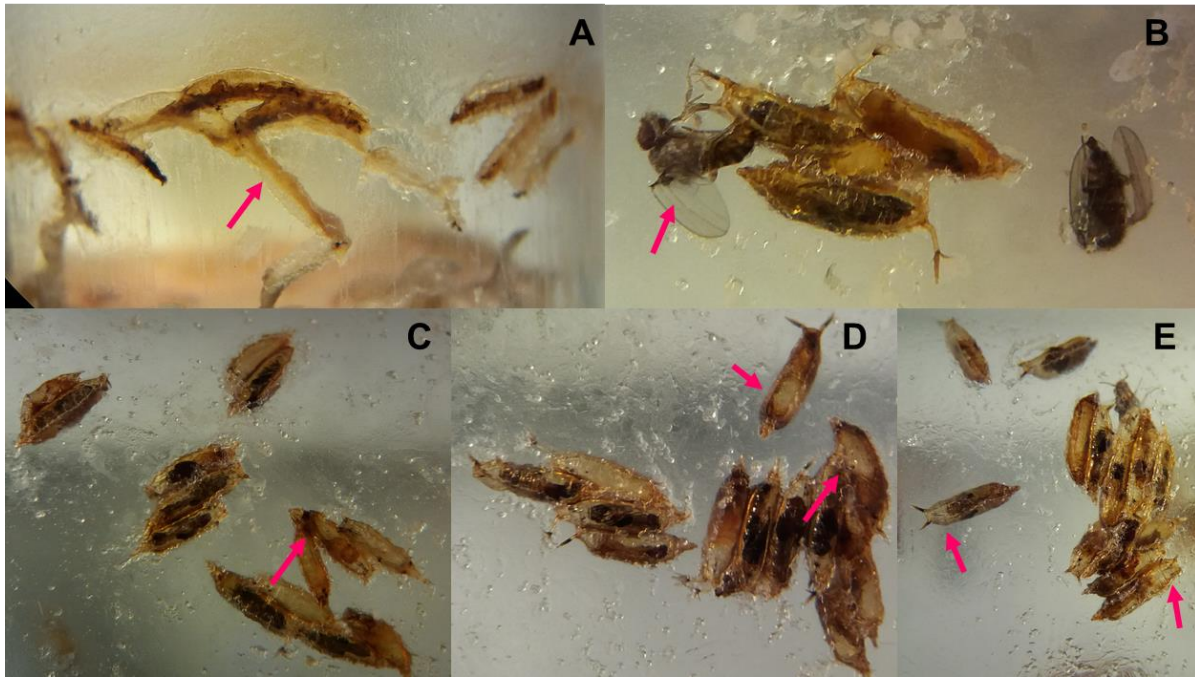


Fig. 17 A. Larvas que no sobrevivieron a la concentración  $1.50E+00$ ; B. Faratos en la concentración  $1.25E+00$ ; C. Pupas con huecos en la parte del tórax concentración  $1.25E+00$ ; D. Pupas con huecos en el tórax y cabeza concentración  $8.33E-01$ ; E. Pupas con huecos en tórax y sin cabeza, así como organismos que no eclusieron en la concentración  $1.50E+00$  (fotografías Rubi Evangelista).



Fig. 18. A) *D. melanogaster* macho con placa genital evertida; B) *D. mulleri* 1. Hembra con daño en placa genital; 2. Macho de *D. mulleri* con placa genital evertida (fotografías Rubi Evangelista).



### 3. Daño reprotóxico

#### 3.1. Machos tratados

Se realizaron treinta cruza individuales con una hembra no tratada (NT) y un macho tratado (T) con NDMA o con agua destilada. La tabla 2 y la figura 19 muestran el registro de las diferencias significativas de fertilidad en *D. mulleri* para las concentraciones 6.10E-04, 1.95E-02 y 2.35E-01 (Z,  $p < 0.05$ ), coincidiendo 1.95E-02 con la concentración en la que más alteraciones de placa genital se presentaron. La fertilidad de las moscas *D. melanogaster* fue significativamente diferente en las concentraciones 7.63E-05, 3.91E-02, 7.81E-2 y 1.56E-01 (Z,  $p < 0.05$ ).

Tabla 2. Resultados de fertilidad de cruce NTxT de moscas *Drosophila*

[]	<i>Drosophila melanogaster</i>		<i>Drosophila mulleri</i>			
	Número de moscas	Fertilidad	Número de moscas	Fertilidad	Placa genital afectada	
					Moscas	Frecuencia
dH2O	436	0.933	138	0.625	3	0.022
7.63E-05	306	0.533 *	100	0.700	1	0.010
1.53E-04	306	0.933	120	0.700	1	0.008
3.01E-04	345	0.900	111	0.650	6	0.054
6.10E-04	480	0.867	115	0.296 *	8	0.070
1.22E-03	354	0.933	164	0.640	7	0.043
2.44E-03	395	0.893	55	0.462	5	0.091
4.88E-03	389	0.833	58	0.636	3	0.052
9.77E-03	317	0.867	75	0.429	5	0.067
1.95E-02	243	0.920	56	0.263 *	8	0.143
3.91E-02	327	0.667 *	52	0.500	3	0.058
7.81E-02	294	0.333 *	40	0.300	4	0.100
1.56E-01	441	0.033 *	23	0.500	1	0.043
2.35E-01	355	0.000	18	0.167 *	0	0.000
3.13E-01	312	0.000	17	0.000	0	0.000
4.69E-01	302	0.000	-			
6.25E-01	242	0.000	-			
8.33E-01	200	0.000	-			
1.04E+00	193	0.000	-			
1.25E+00	139	0.000	-			
1.50E+00	117	0.000	-			

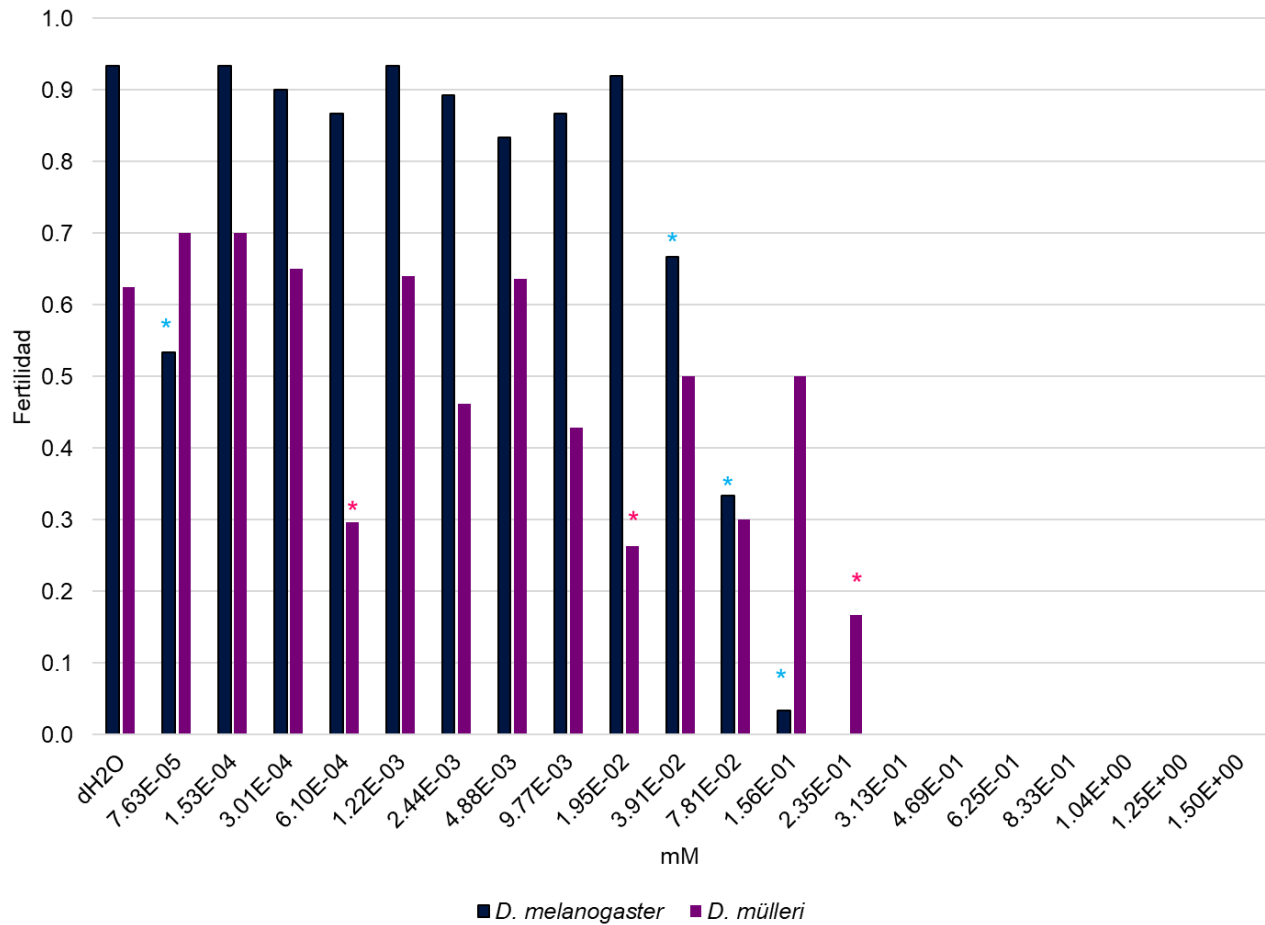


Fig. 19 Fertilidad de moscas NTxT, *Drosophila melanogaster* y *Drosophila mulleri*.

\*Diferencias significativas en *Drosophila melanogaster* respecto a su testigo.

\*Diferencias significativas en *Drosophila mulleri* respecto a su testigo.

$P < 0.05$

### 3.2. Cruza F<sub>1</sub> x F<sub>1</sub>

Posteriormente se realizó la cruza de treinta parejas individuales F<sub>1</sub> x F<sub>1</sub> y una vez que las moscas emergieron se registró la progenie recobrada, cuantificando hembras y machos de cada concentración (Tabla 3). Para esta generación se encontraron diferencias significativas en las concentraciones 7.81E-02 y 1.56E-01 para *D. melanogaster* y para *D. mulleri* solo en 1.56E-09 para la progenie promedio (figura 20).

En el caso de la Proporción sexual, *D. melanogaster* presentó diferencias significativas en la concentración 1.95E-02, en la que también se recobraron más hembras. En el caso de *D. mulleri* se presentan diferencias en las ocho concentraciones siguientes: 7.63E-05, 1.53E-04, 3.01E-04, 1.22E-03, 9.77E-03, 1.95E-02, 7.81E-02 y 1.56E-01, en todas las concentraciones mencionadas se presenta una mayor cantidad de machos.

La frecuencia de daño en placa genital en las concentraciones antes mencionadas se cuantifica en la Tabla 4, el tipo de daño encontrado se presenta en la figura 21, señalándolas con una flecha rosa. En la figura 22 se registraron las diferencias significativas de fertilidad en las concentraciones 3.91E-02, 7.81E-02 y 1.56E-01 ( $Z, p < 0.05$ ) en *D. melanogaster*. La fertilidad de las moscas *D. mülleri* fue significativamente diferente respecto a su testigo en las concentraciones 7.63E-05, 1.53E-02, 9.77E-03 y 1.95E-02 ( $Z, p < 0.05$ ).

Tabla 3. Progenie de cruce NT x T de moscas *Drosophila*.

[]	<i>Drosophila melanogaster</i>					<i>Drosophila mülleri</i>				
	Número de moscas	Promedio ± ee	Proporción sexual ± ee		Número de moscas	Promedio ± ee	Proporción sexual ± ee			
			H	M			H	M		
	<i>Drosophila melanogaster</i>					<i>Drosophila mülleri</i>				
dH <sub>2</sub> O	2504	89.429 ± 8.404	0.527 ± 0.012	0.473 ± 0.012	486	32.400 ± 7.237	0.594 ± 0.046	0.406 ± 0.046		
7.63E-05	1738	108.625 ± 9.905	0.532 ± 0.015	0.468 ± 0.015	404	33.667 ± 6.063	0.500 ± 0.050	0.500 ± 0.050 *		
1.53E-04	2764	98.714 ± 6.053	0.530 ± 0.011	0.470 ± 0.011	257	21.417 ± 3.905	0.439 ± 0.070	0.561 ± 0.070 *		
3.01E-04	2534	97.462 ± 7.324	0.525 ± 0.009	0.475 ± 0.009	456	38.000 ± 6.428	0.457 ± 0.043	0.543 ± 0.043 *		
6.10E-04	2378	95.120 ± 8.312	0.532 ± 0.013	0.468 ± 0.013	201	25.125 ± 9.286	0.589 ± 0.057	0.411 ± 0.057		
1.22E-03	2934	104.786 ± 5.388	0.548 ± 0.013	0.452 ± 0.013	376	28.923 ± 6.232	0.465 ± 0.053	0.535 ± 0.053 *		
2.44E-03	2459	98.360 ± 8.291	0.526 ± 0.009	0.474 ± 0.009	121	24.200 ± 12.318	0.536 ± 0.059	0.464 ± 0.059		
4.88E-03	2374	94.960 ± 7.379	0.529 ± 0.013	0.471 ± 0.013	212	30.286 ± 4.809	0.534 ± 0.062	0.466 ± 0.013		
9.77E-03	2083	80.115 ± 5.360	0.553 ± 0.014	0.447 ± 0.014	317	35.222 ± 10.243	0.429 ± 0.026	0.571 ± 0.026 *		
1.95E-02	1763	80.136 ± 8.414	0.582 ± 0.014	0.418 ± 0.014 *	95	23.750 ± 9.446	0.447 ± 0.046	0.553 ± 0.046 *		
3.91E-02	1464	73.200 ± 7.002	0.549 ± 0.009	0.451 ± 0.009	249	49.800 ± 4.454	0.539 ± 0.041	0.461 ± 0.041		
7.81E-02	351	43.875 ± 13.699 *	0.551 ± 0.040	0.449 ± 0.040	51	17.000 ± 6.083	0.494 ± 0.006	0.506 ± 0.006 *		
1.56E-01	19	19.000 ± 0.000 *	0.526 ± 0.000	0.474 ± 0.000	4	4.000 ± 0.000 *	0.250 ± 0.000	0.750 ± 0.000 *		
2.35E-01	-				-					
3.13E-01	-				-					
4.69E-01	-									
6.25E-01	-									
8.33E-01	-									
1.04E+00	-									
1.25E+00	-									
1.50E+00	-									

\*\*Diferencias significativas con respecto a su testigo  $P < 0.05$

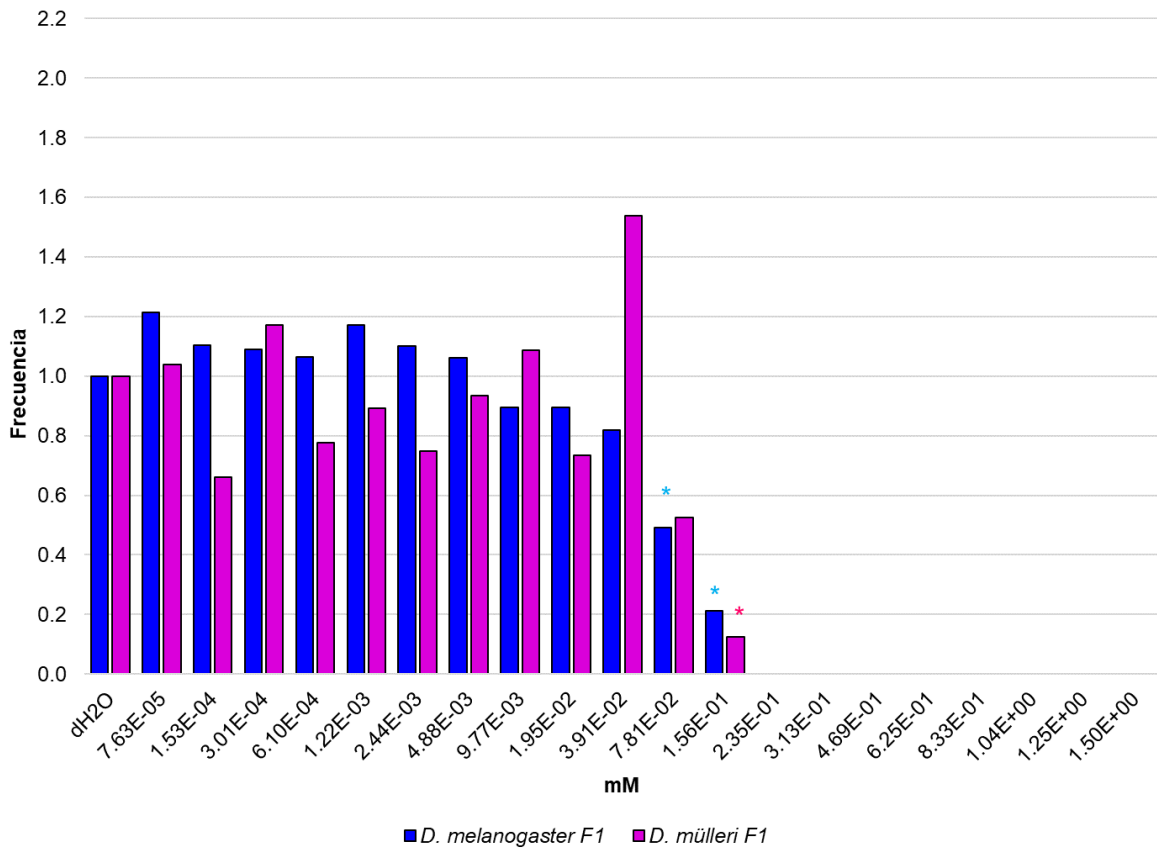


Fig. 20. Progenie promedio F<sub>1</sub> de *Drosophila melanogaster* y *Drosophila mulleri*

\*Diferencias significativas en *D. melanogaster* respecto a su testigo.

\*Diferencias significativas en *D. mulleri* respecto a su testigo.  $P < 0.05$

Tabla 4. Fertilidad cruce  $F_1 \times F_1$  y frecuencia de daño en placa genital.

[ ]	<i>Drosophila melanogaster</i>		<i>Drosophila mulleri</i>		Placa genital afectada	
	Número de moscas	Fertilidad	Número de moscas	Fertilidad	Moscas	Frecuencia
dH2O	2504	0.900	486	0.577	0	0.000
7.63E-05	1738	0.933	404	0.263 *	96	0.238
1.53E-04	2764	0.967	257	0.250 *	74	0.288
3.01E-04	2534	0.933	456	0.316	86	0.189
6.10E-04	2378	0.933	201	0.278	38	0.189
1.22E-03	2934	0.867	376	0.579	76	0.202
2.44E-03	2459	0.767	121	0.000	9	0.074
4.88E-03	2374	0.800	212	0.429	10	0.047
9.77E-03	2083	0.800	317	0.240 *	107	0.338
1.95E-02	1763	0.733	95	0.111 *	29	0.305
3.91E-02	1464	0.567 *	249	0.300	8	0.032
7.81E-02	351	0.375 *	51	0.500	14	0.275
1.56E-01	19	0.556 *	4	0.000	2	0.500

\*Diferencias significativas  $P > 0.05$

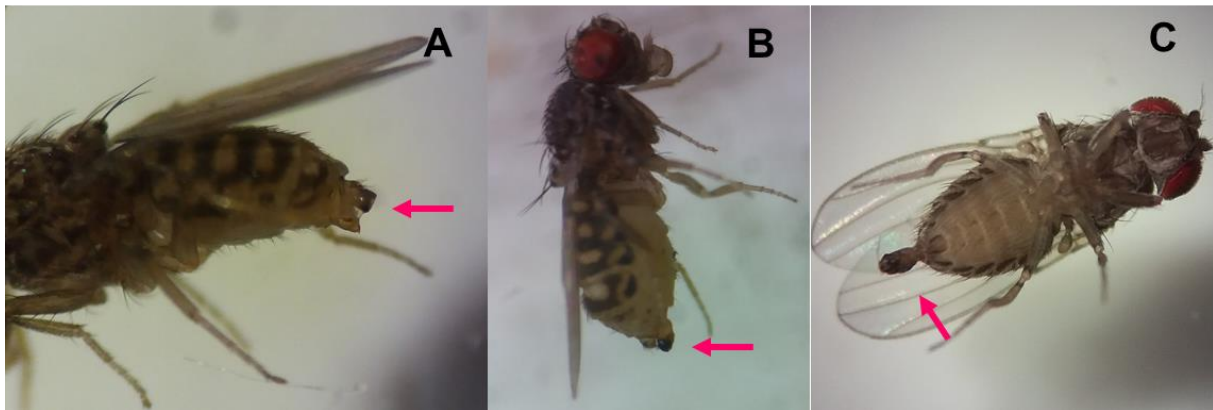


Fig. 21. Moscas *D. mulleri*  $F_1$  con placa genital alterada: A. Macho con placa anal evertida de la concentración 7.63E-05; B. Hembra de la concentración 9.77E-03; C. Macho de la concentración 1.95E-02.

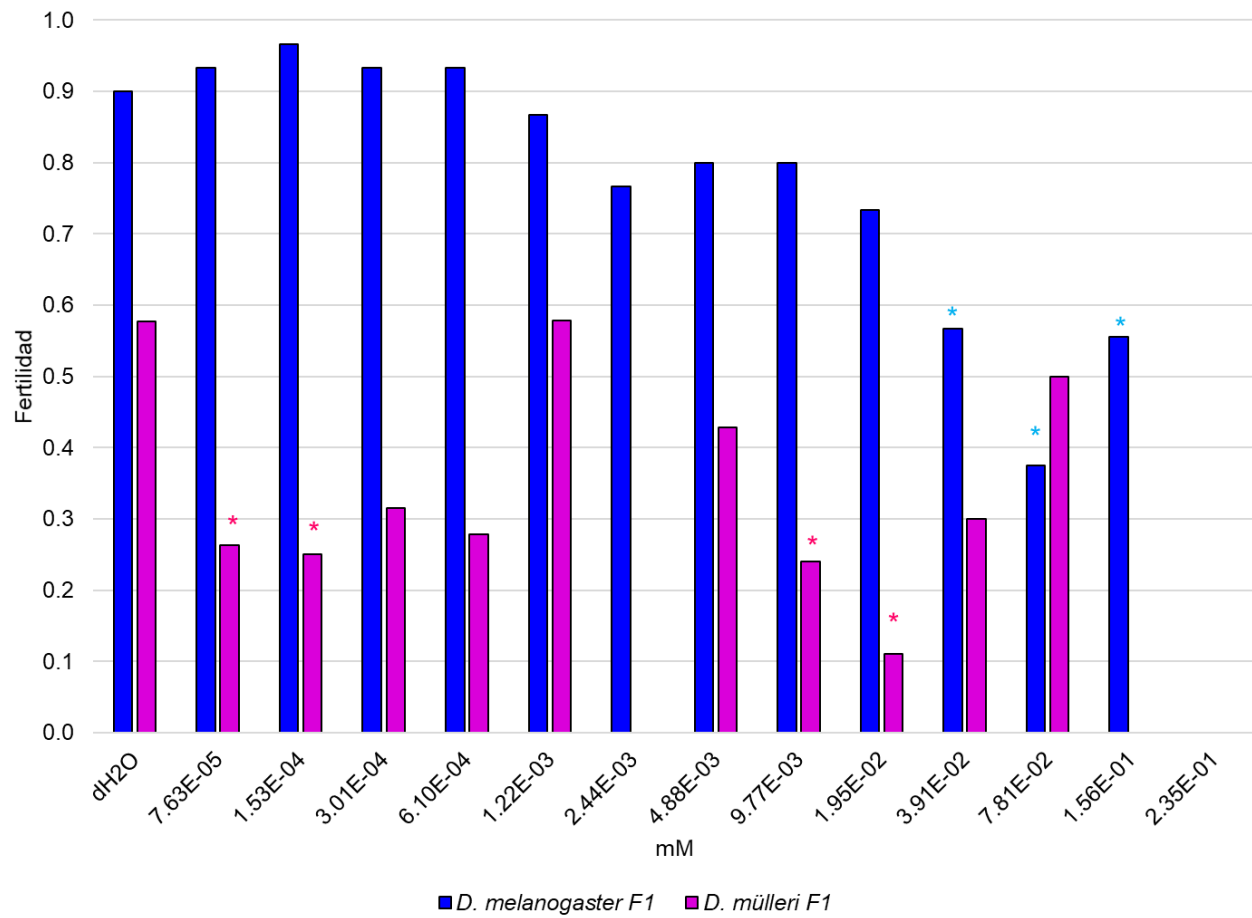


Fig. 22. Fertilidad de generación F<sub>1</sub> *Drosophila melanogaster* y *Drosophila mulleri*

\*Diferencias significativas en *D. melanogaster* respecto a su testigo.

\*Diferencias significativas en *D. mulleri* respecto a su testigo.  $P < 0.05$

## **B) Cruzas de organismos no tratados (efecto transgeneracional).**

### **1. Progenie F<sub>2</sub> (Cruza F<sub>1</sub> x F<sub>1</sub>)**

Los resultados de la progenie promedio F<sub>2</sub> se presentan en la tabla 5 y figura 23. Se obtuvieron diferencias significativas en las concentraciones 1.22E-03, 2.44E-03 y 4.88E-03, para *D. melanogaster* y para *D. mülleri* en las concentraciones 1.53E-04, 6.10E-04, 3.91E-02 y 7.81E-02. En cuanto a la proporción sexual se encontraron diferencias significativas para *D. melanogaster* en 1.53E-04, 3.01E-04 y 4.88E-03 y 3.01E-04, 6.10E-04, 4.88E-03, 3.91E-02 y 7.81E-02 para *D. mülleri*. En casi todos los casos para ambas líneas se recobró una mayor cantidad de hembras.



Tabla 5. Progenie promedio F<sub>2</sub> de moscas *Drosophila*

[]	<i>Drosophila melanogaster</i>				<i>Drosophila mülleri</i>			
	Número de moscas	Promedio ± ee	Proporción sexual ± ee		Número de moscas	Promedio ± ee	Proporción sexual ± ee	
			H	M			H	M
	<i>Drosophila melanogaster</i>				<i>Drosophila mülleri</i>			
dH <sub>2</sub> O	946	35.037 ± 5.015	0.532 ± 0.019	0.468 ± 0.019	598	39.867 ± 5.591	0.477 ± 0.020	0.523 ± 0.020
7.63E-05	1114	39.786 ± 4.765	0.550 ± 0.019	0.450 ± 0.019	188	37.600 ± 9.125	0.492 ± 0.027	0.508 ± 0.027
1.53E-04	1287	44.379 ± 4.142	0.574 ± 0.014	0.426 ± 0.014 *	421	84.200 ± 15.765 *	0.502 ± 0.018	0.498 ± 0.018
3.01E-04	1191	42.536 ± 4.146	0.587 ± 0.028	0.413 ± 0.028 *	110	36.667 ± 16.697	0.394 ± 0.107	0.606 ± 0.107 *
6.10E-04	1187	42.393 ± 4.613	0.553 ± 0.019	0.447 ± 0.019	16	8.000 ± 4.000 *	0.542 ± 0.042	0.458 ± 0.042 *
1.22E-03	1505	57.885 ± 4.077 *	0.524 ± 0.017	0.476 ± 0.017	263	23.909 ± 3.706	0.453 ± 0.046	0.547 ± 0.046
2.44E-03	1236	53.739 ± 3.672 *	0.507 ± 0.010	0.493 ± 0.010	-			
4.88E-03	1316	54.833 ± 6.251 *	0.477 ± 0.018	0.523 ± 0.018 *	156	52.000 ± 13.317	0.523 ± 0.031	0.477 ± 0.031 *
9.77E-03	961	40.042 ± 3.659	0.516 ± 0.018	0.484 ± 0.018	135	27.000 ± 3.619	0.495 ± 0.016	0.505 ± 0.016
1.95E-02	602	27.364 ± 3.230	0.518 ± 0.031	0.482 ± 0.031	-			
3.91E-02	460	27.059 ± 4.454	0.527 ± 0.024	0.473 ± 0.024	17	8.500 ± 4.500 *	0.558 ± 0.058	0.442 ± 0.058 *
7.81E-02	308	34.222 ± 6.467	0.508 ± 0.016	0.492 ± 0.016	94	18.800 ± 6.336 *	0.626 ± 0.092	0.374 ± 0.092 *
1.56E-01	138	34.500 ± 4.444	0.521 ± 0.036	0.479 ± 0.036	-			

\*\*Diferencias significativas con respecto a su testigo  $P > 0.05$

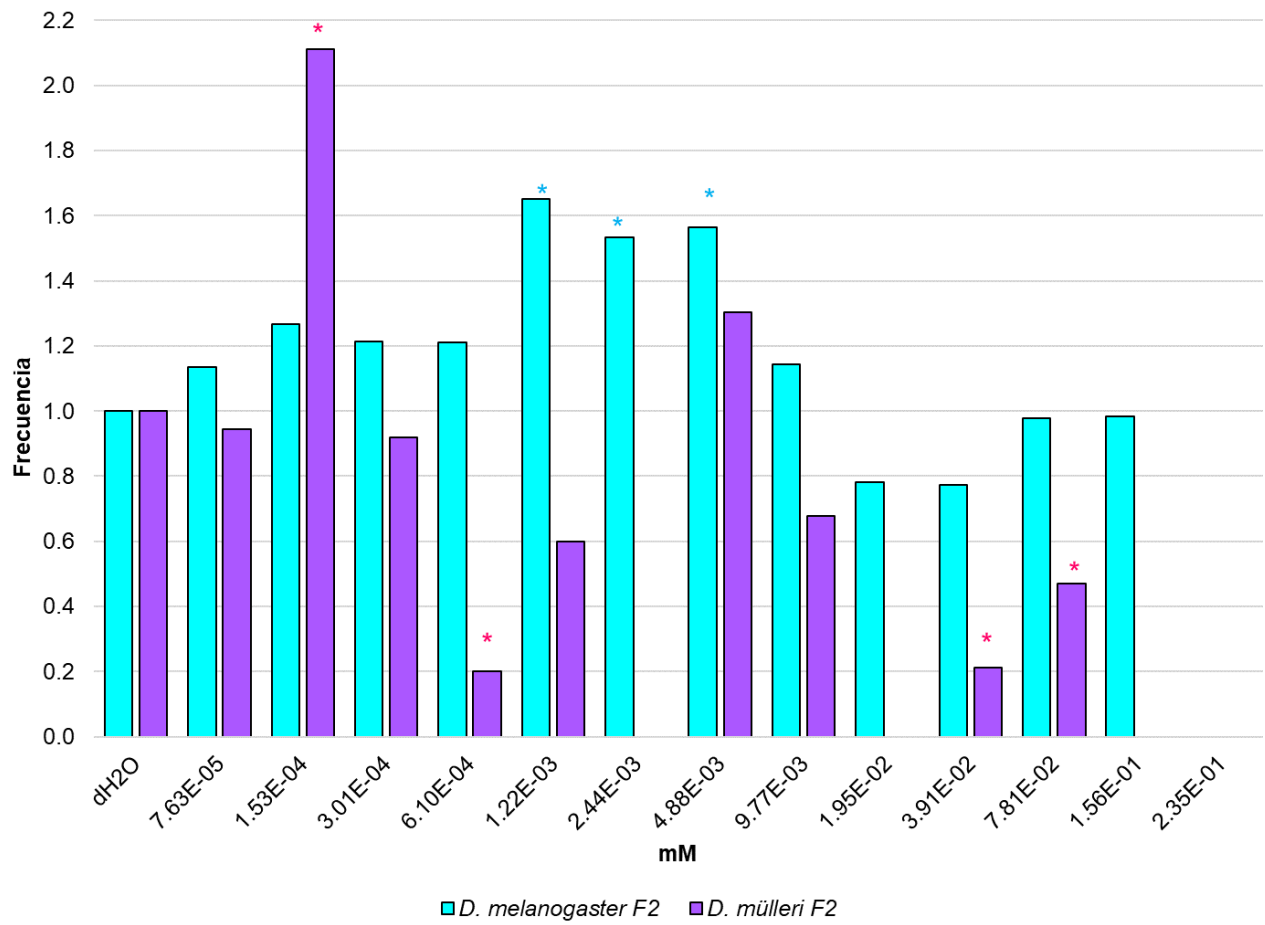


Fig. 23. Progenie promedio F<sub>2</sub> (Cruza F<sub>1</sub> x F<sub>1</sub>) *Drosophila melanogaster* y *Drosophila mulleri*

\*Diferencias significativas en *D. melanogaster* respecto a su testigo.

\*Diferencias significativas en *D. mulleri* respecto a su testigo.  $P < 0.05$

La tabla 6 muestra el efecto del tratamiento en la fertilidad de los organismos, así como la proporción de moscas que muestran daño en la placa genital. La figura 24 compara la fertilidad de ambas especies en la generación F<sub>2</sub>. Las moscas *D. mülleri* F<sub>3</sub> (proviene de la cruce F<sub>2</sub> x F<sub>2</sub>) descendientes de las expuestas a las concentraciones 6.10E-04 y 3.91E-02 fueron estériles. Es importante destacar que esta generación no estuvo expuesta al compuesto, ni de forma directa ni indirectamente, sin embargo, se recobraron moscas con la placa genital afectada, además de daño morfológico a diferente nivel como se aprecia en las figuras sucesivas (figuras, 25, 26, 27, 28).

Tabla 6. Resultado de fertilidad de cruce F<sub>2</sub>xF<sub>2</sub>

[]	<i>Drosophila melanogaster</i>		<i>Drosophila mülleri</i>			
	Número de moscas	Fertilidad	Número de moscas	Fertilidad	Placa genital afectada	
					Moscas	Frecuencia
dH <sub>2</sub> O	946	0.833	598	0.481	8	0.013
7.63E-05	1114	0.867	188	0.500	23	0.122
1.53E-04	1287	0.733	421	0.450	0	0.000
3.01E-04	1191	0.862	110	0.600	23	0.209
6.10E-04	1187	0.767	16	0.000	3	0.188
1.22E-03	1505	0.767	263	0.500	62	0.236
2.44E-03	1236	0.900	-	-	-	-
4.88E-03	1316	0.900	156	0.300	25	0.160
9.77E-03	961	0.733	135	0.481	43	0.319
1.95E-02	602	0.733	-	-	-	-
3.91E-02	460	0.893	17	0.000	2	0.118
7.81E-02	308	0.727	94	0.400	8	0.085
1.56E-01	138	0.900	-	-	-	-

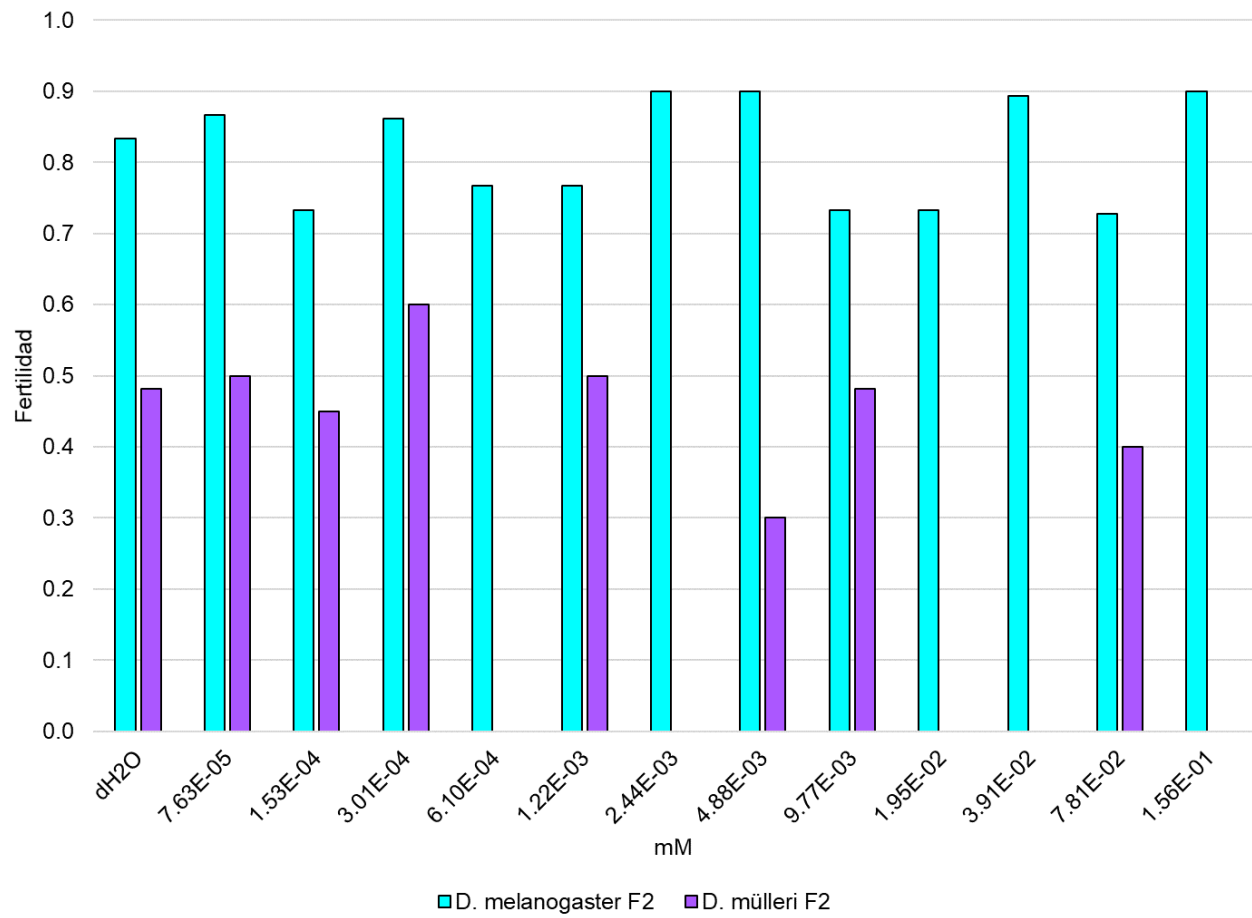


Fig. 24. Fertilidad de generación F<sub>2</sub> *Drosophila melanogaster* y *Drosophila mülleri*

\*Diferencias significativas en *D. mülleri* respecto a su testigo.  $P < 0.05$



Fig. 25. *D. melanogaster*: A. Macho con placa genital no diferenciada de la concentración 1.53E-04, B. Daño morfológico en ala de la concentración 3.01E-04; C. Hembra con placa anal evertida ovipositando de la concentración 3.01E-04 (fotografías Rubi Evangelista).



Fig. 26. Macho de *D. mulleri* con la placa genital girada 90 grados a la izquierda de la concentración 3.01E-04 (fotografías Rubi Evangelista).

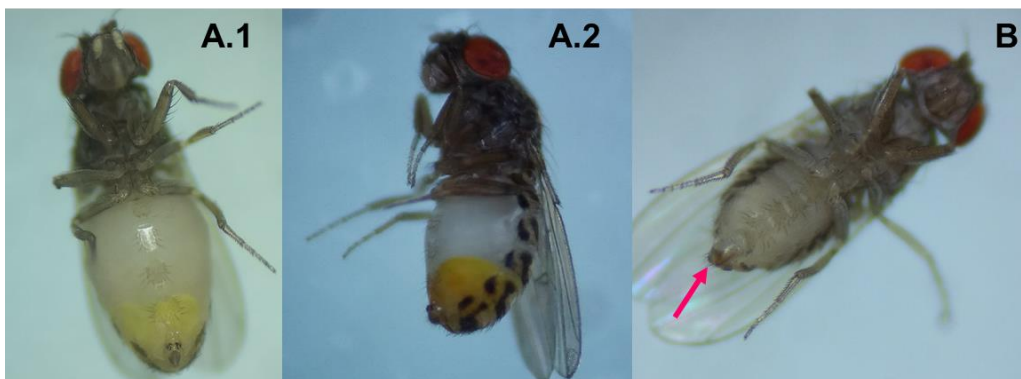


Fig. 27. *D. mülleri*: A. Machos con los testículos en posición baja de la concentración 3.01E-04; B. Macho con placa genital evertida de la concentración 3.91E-02 (fotografías Rubi Evangelista).



Fig. 28. Daño morfológico de moscas F<sub>2</sub>: *D. mülleri*, A. Hembra con tórax alterado de la concentración 1.53E-04; B. Hembra con abdomen más corto de la concentración 1.53E-04 (1) comparada con una regular (2); C. *D. melanogaster* sin dos terguitos (lado derecho) de la concentración 4.88E-03; D. Macho de la concentración 1.56E-01 con un ala dañada (fotografías Rubi Evangelista).

## 2. Progenie F<sub>3</sub> (Cruza F<sub>2</sub> x F<sub>2</sub>)

Los resultados de progenie promedio y proporción sexual que se presentan en la tabla 7, no muestran diferencias significativas en la proporción sexual de la F<sub>3</sub>. En la figura 29 se muestra que *D. melanogaster* conserva progenie en todas las concentraciones desde la F<sub>1</sub> sin embargo *D. mülleri* presenta esterilidad en concentraciones diversas con diferencias significativas en la concentración 1.56E-01 con respecto a su testigo.

Tabla 7. Progenie promedio de cruce F<sub>2</sub>xF<sub>2</sub>

[]	<i>Drosophila melanogaster</i>				<i>Drosophila mülleri</i>			
	Número de moscas	Promedio ± ee	Proporción sexual ± ee		Número de moscas	Promedio ± ee	Proporción sexual ± ee	
			H	M			H	M
dH <sub>2</sub> O	2073	82.920 ± 7.089	0.506 ± 0.013	0.494 ± 0.013	380	47.500 ± 10.087	0.553 ± 0.034	0.447 ± 0.034
7.63E-05	2350	90.385 ± 8.724	0.534 ± 0.015	0.466 ± 0.015 *	381	47.625 ± 8.773	0.564 ± 0.028	0.436 ± 0.028
1.53E-04	1688	76.727 ± 11.783	0.566 ± 0.019	0.434 ± 0.019 *	306	38.250 ± 6.108	0.564 ± 0.033	0.436 ± 0.033
3.01E-04	1850	74.000 ± 11.485	0.534 ± 0.017	0.466 ± 0.017 *	160	26.667 ± 8.147	0.497 ± 0.053	0.503 ± 0.053
6.10E-04	1826	79.391 ± 10.341	0.518 ± 0.012	0.482 ± 0.012	-			
1.22E-03	1605	69.783 ± 10.017	0.484 ± 0.014	0.516 ± 0.014	339	30.818 ± 5.679	0.557 ± 0.025	0.443 ± 0.025
2.44E-03	1506	57.923 ± 9.053	0.454 ± 0.015	0.546 ± 0.015 *				
4.88E-03	1371	50.778 ± 9.781	0.500 ± 0.021	0.500 ± 0.021	119	39.667 ± 11.465	0.671 ± 0.044	0.329 ± 0.044 *
9.77E-03	1240	56.364 ± 9.708	0.509 ± 0.021	0.491 ± 0.021	343	26.385 ± 5.483	0.521 ± 0.016	0.479 ± 0.016
1.95E-02	1441	65.500 ± 10.055	0.529 ± 0.013	0.471 ± 0.013 *				
3.91E-02	1292	58.727 ± 9.255	0.540 ± 0.020	0.460 ± 0.020 *	-			
7.81E-02	1178	73.625 ± 12.282	0.509 ± 0.014	0.491 ± 0.014	52	13.000 ± 3.808 *	0.606 ± 0.017	0.394 ± 0.017
1.56E-01	1194	132.667 ± 12.063 *	0.522 ± 0.022	0.478 ± 0.022 *				

\*\*Diferencias significativas con respecto a su testigo  $P > 0.05$

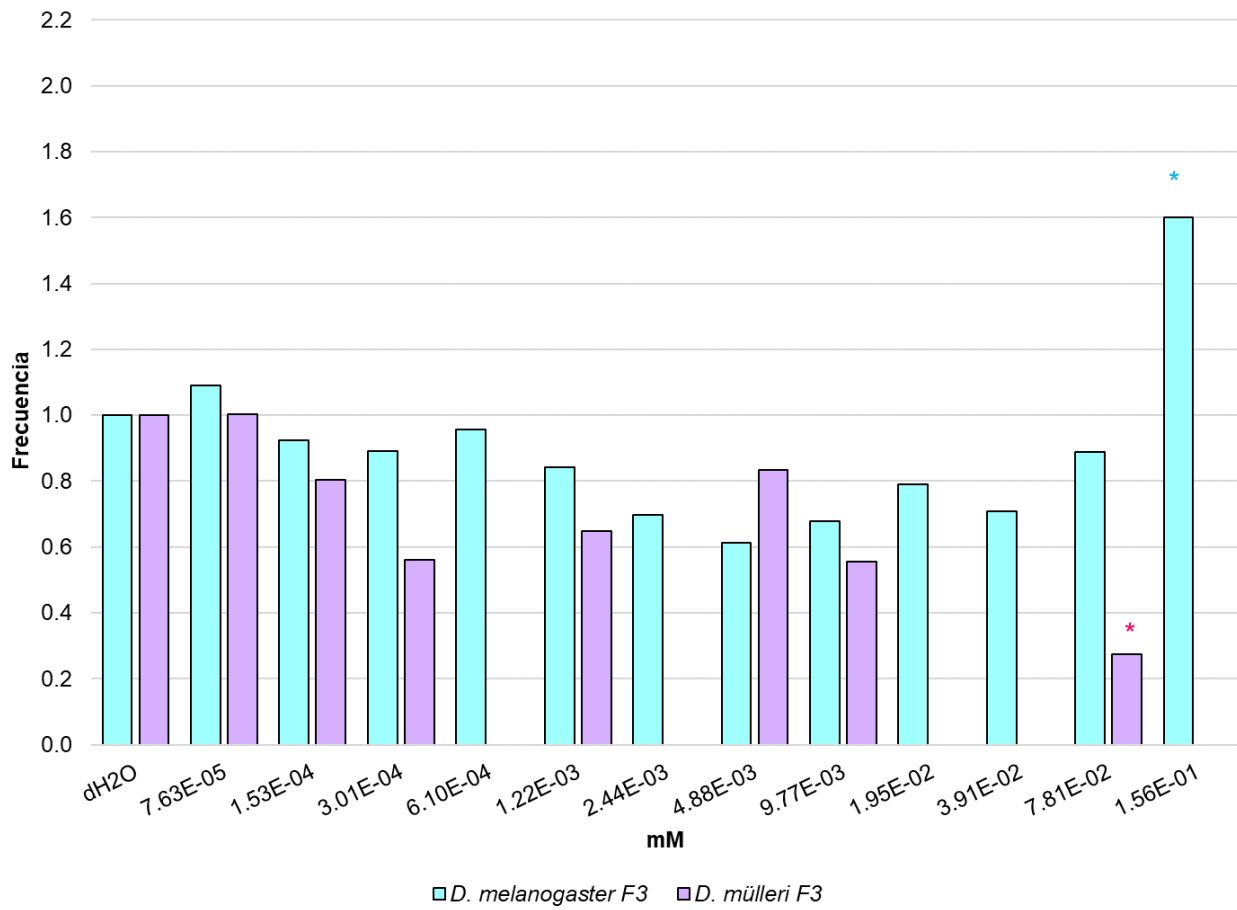


Fig. 29 Progenie promedio corregida en la F<sub>3</sub> de *D. melanogaster* y *D. mülleri*

\*Diferencias significativas en *D. melanogaster* respecto a su testigo.

\*Diferencias significativas en *D. mülleri* respecto a su testigo.

$P < 0.05$



La frecuencia de placa genital afectada se mantiene aún en la F3 (figura 30 y tabla 8). En las concentraciones 9.77E-03 y 7.81E-02 contienen un 20% de su población con alteraciones.

Tabla 8. Frecuencia de Placa genital afectada de la generación F<sub>3</sub> de *D. mülleri*

[ ]	Número de moscas	Placa genital afectada	
		Moscas	Frecuencia
dH2O	380	2	0.005
7.63E-05	381	27	0.071
1.53E-04	306	42	0.137
3.01E-04	160	12	0.075
6.10E-04	-		
1.22E-03	339	46	0.136
2.44E-03			
4.88E-03	119	11	0.092
9.77E-03	343	75	0.219
1.95E-02			
3.91E-02	-		
7.81E-02	52	12	0.231
1.56E-01			

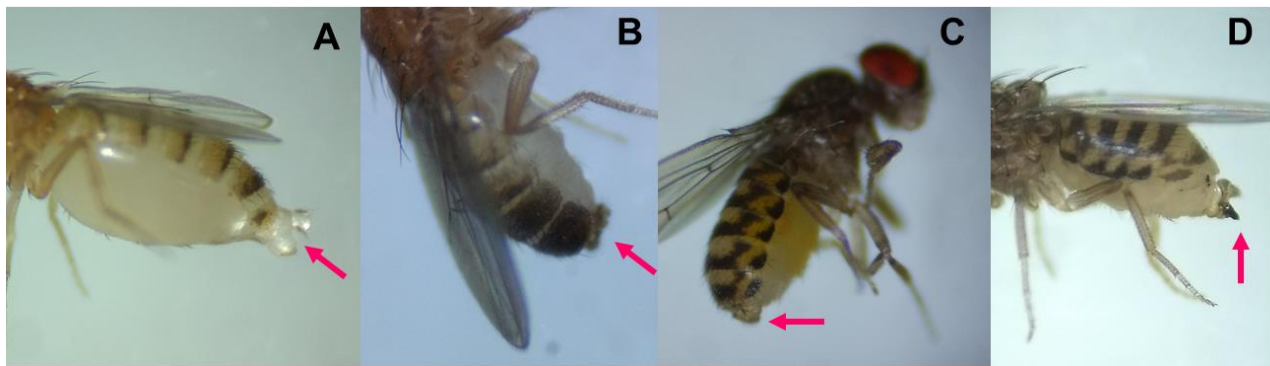


Fig. 30 Moscas de la F<sub>3</sub> con alteraciones en placa genital o anal. A. Hembra de *D. melanogaster* con placa genital y anal evertida de la concentración 1.56E-01; B. Macho con placa genital no diferenciada de la concentración 1.56E-01; *D. mülleri*; C. Macho con placa genital evertida de la concentración 4.88E-03; D. Macho con placa genital y anal evertida de la concentración 7.81E-02 (fotografías Rubi Evangelista).

## VII. DISCUSIÓN

---

El tercer estadio larvario representa una etapa importante para la actividad enzimática ya que es parecida a la actividad que expresa la mosca adulta, además, las células, tejidos y órganos completan su diferenciación en la metamorfosis, por lo que es el estadio adecuado para someter a los organismos al tratamiento y analizar la actividad de un compuesto a nivel de desarrollo. En este trabajo se usaron concentraciones analizadas en proyectos anteriores (Ramirez Flores 2015; Ramos-Morales and Vega García 2008) en los que se estudió y obtuvo respuesta al efecto de la NDMA en *D. melanogaster*, *D. mulleri* y *D. mojavensis*.

### 1. Toxicidad a la NDMA

Se ha mostrado que las moscas del género *Drosophila* comparten gran parte de los genes involucrados en el metabolismo con el humano, aunque existen diferencias en la expresión de las proteínas involucradas en la respuesta genotóxica asociadas con la adaptación de las especies de este género a los ambientes en los que habitan, factores que pueden modificar la toxicidad de un compuesto y que dependen tanto del agente químico como del modelo biológico (Repetto & Repetto, 2009; Yang et al., 2007).

La NDMA es un promutágeno que alcanza su actividad genotóxica al metabolizarse por una isoforma del citocromo CYP2E1 en *Drosophila* (CYP18A1) (Le Goff et al. 2006; Anderson et al. 1992; Williams, Mori, and McQueen 1989). Debido a su cercanía filogenética podemos especular que *D. mulleri* cuenta con esta isoforma, lo que se confirma con la respuesta en fertilidad y fecundidad. Ambas especies fueron sensibles a la NDMA, en concentraciones altas, ambas especies tuvieron una tasa de mortalidad alta, además se presentó una variación en concentraciones bajas, lo cual deja ver que la exposición a una cantidad mínima de compuesto causa efectos adversos (Lovell 2000). No se encuentra una relación lineal entre concentración y efecto, más bien esta es muy variable, lo que es característico de las dosis bajas (Mattson 2008; Fagin 2012; Calabrese 2003, 2008).

Las dos especies de moscas presentan variaciones en su alimentación, por lo que su metabolismo también es diferente, esto podría explicar que las moscas *D. mülleri* tratadas mantienen la fertilidad en concentraciones mayores que *D. melanogaster*, dado que el compuesto es un promutágeno que para activarse requiere del metabolismo de los organismos expuestos y, en este

sentido, las moscas *D. mulleri* podrían ser menos eficientes en transformar al compuesto, por lo que los metabolitos causantes del daño se encontrarían en menor cantidad para ese momento del desarrollo, comparada con *D. melanogaster* y en consecuencia, se verían menos afectadas.

Se ha reportado que la proporción sexual de *D. melanogaster* se ve afectada por exposición a NDMA, lo que sugiere que el compuesto se inclina hacia un sexo que podría asociarse con la pérdida de organismos (Ramos 2006), se observa una fluctuación en la proporción de sexos, donde se obtienen pocas diferencias significativas presentándose un mayor número de hembras en *D. mulleri* por más concentraciones, lo que sugiere que el compuesto afecta la sobrevivencia de los machos.

Este tipo de respuesta también fue encontrada en trabajos anteriores como el de Ramirez-Flores en 2015. En ese trabajo, se probaron concentraciones diferentes, pero se encuentra una tendencia de respuesta al acercarse a concentraciones bajas. En el caso de este proyecto se prueban concentraciones más bajas y se aprecia un patrón, que podríamos llamar umbrales, donde se genera una especie de curva donde baja la fertilidad o fecundidad y nuevamente se fortalece.

## **2. Daño reprotóxico y transgeneracional**

Con respecto al daño reprotóxico, los factores que modifican la respuesta ante un compuesto pueden recaer tanto en el agente químico como en el modelo biológico (Repetto Jiménez and Repetto Kuhn 2009). En este trabajo las dos especies de *Drosophila* reúnen a moscas con diferencias en cuanto a la viabilidad y número de progeñe, pero, una vez que se exponen al promutágeno se observa que la respuesta de genotoxicidad es similar.

*D. mülleri* ha sido poco usada en este tipo de ensayos, comparada con *D. melanogaster* mostró ser una especie sensible a la NDMA, con un metabolismo diferente ya que produjo una respuesta con diferencia cuantitativa más visible a la NDMA. Como en los efectos de fecundidad, que se observan en la generación F<sub>1</sub> para *D. mülleri* y en la F<sub>2</sub> para *D. melanogaster*.

El efecto en la fertilidad es uno de los bioindicadores más importantes para comparar la actividad de la NDMA, debido a que interfiere con la formación de los testículos, no solo en las moscas expuestas, si no también en la progeñe F<sub>1</sub> (Ramirez Flores 2015; Ramos-Morales and Vega

García 2008). En este proyecto se observó una disminución marcada en la fertilidad de *D. mulleri* y de fecundidad para *D. melanogaster*, no solo en los organismos tratados sino en las generaciones posteriores, esto indica que no solo estamos en presencia de un daño directo si no también indirecto o transgeneracional.

Tanto en *D. melanogaster* como en *D. mulleri*, se confirmó el efecto tóxico y reprotóxico de la NDMA, el cual se ubicó principalmente en las moscas expuestas en estadio larvario, exposición directa, y en la progenie F<sub>1</sub>, progenie con exposición indirecta dado que las células precursoras que les darían origen ya se encontraban en el organismo tratado (Ramos Morales et al. 1993). Para el efecto transgeneracional se sigue a la progenie F<sub>2</sub> y F<sub>3</sub>, progenie que no presentan contacto alguno con el agente causal y el efecto antes analizado (Hanson and Skinner 2016).

Ambas cepas presentaron diferencias significativas para la fertilidad y esterilidad desde la concentración 2.35E-01, dejando claro que la esterilidad es provocada por el compuesto y al menos uno de sus blancos, el aparato reproductor. Además, se presenta una baja en la progenie promedio por tubo (por pareja) en generaciones de la F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub> de ambas cepas y esterilidad en distintas concentraciones de *D. mulleri* en F<sub>2</sub>, lo que indica que el efecto de la NDMA es transgeneracional.

Es importante considerar que la NDMA es un agente alquilante que dona grupos alquilo a las bases del DNA, lo que podría sugerir un cambio en el patrón de metilación que puede perdurar por más de una generación, implicando la participación de mecanismos epigenéticos (Skinner 2008).

### **3. Cruza NT x T**

El presente proyecto se desarrolló con la crusa de hembras no tratadas y machos tratados (NT x T) sabiendo que los aportes paternos se encuentran la contribución del genoma y los centriolos (Sutovsky and Schatten 2000). La contribución de genoma por parte del macho es muy interesante dado que, en la espermiogénesis las histonas se intercambian por protaminas, que son proteínas especializadas y generan una mayor compactación del DNA lo que le brinda mayor protección ante factores exógenos (Barratt et al. 2010).

Pero debido a su alta compactación no solo brinda una gran protección al daño sino que tampoco permite que la maquinaria de reparación detecte algún daño causado mientras el esperma se almacena o cuando se eyacula (Casas and Vavouri 2014; González Marín, Gosálvez, and Roy 2012), por lo que el daño causado en los organismos tratados no será reparado previo a la fecundación. Es precisamente esta premisa lo que explicaría que los organismos estudiados sean menos fértiles al ser afectados en etapas tempranas.

#### **4. *Drosophila mulleri* como modelo alternativo**

##### **4.1. Morfología de gónadas**

Todos los organismos se observaron al microscopio para observar algún efecto en la morfología y se encontraron efectos en el desarrollo en todas las generaciones de ambas cepas, los efectos se observan en la morfología de las moscas y con una alta frecuencia de anormalidades en la placa sexual de *D. mulleri*. Al disectar a los organismos se encontró que el tejido era más frágil o con poca consistencia en las gónadas masculinas de los organismos tratados y posteriores generaciones, con respecto a sus testigos correspondientes.

Esta fragilidad encontrada en la estructura general de las gónadas deja al descubierto una fragilidad estructural en la protección de las células germinales, que también puede reflejarse en la sensibilidad o daño que los espermatozoides tienen lo que explica de forma cuantitativa la baja fertilidad y fecundidad en los organismos tratados y sus descendientes.

##### **4.2. Organismo modelo**

*Drosophila mulleri* es un organismo con características biológicas de interés, sus gónadas pigmentadas nos permiten detectar el daño estructural en testículos sin necesidad de disectar al organismo, y aunque el daño en las gónadas no fue numéricamente representativo, podemos argumentar que el compuesto está afectando la viabilidad en el esperma ya que la fertilidad se ve disminuida en ambas especies.

El daño morfológico de la placa genital, también contribuye a la disminución en fertilidad que se presentó en los organismos tratados de ambas especies, así como en las generaciones posteriores a partir de la generación F<sub>1</sub> para *D. mülleri* y F<sub>2</sub> para *D. melanogaster*. Los resultados recobrados en este estudio constituyen un aporte importante porque facilita el seguimiento longitudinal del efecto de la exposición de los organismos a genotóxicos con resultados similares a los obtenidos por la cepa de referencia *D. melanogaster*, que ha sido extensivamente estudiada.

## VIII. CONCLUSIONES

---

- La diferencia observada en la proporción de sexos para la generación tratada deja ver que los machos resultan más afectados que las hembras, siendo más visible en la especie de *D. mülleri*.
- Las gónadas de *D. mülleri* no fueron visiblemente afectadas, sin embargo, se presente esterilidad en los organismos tanto tratados (daño reprotóxico) como los no tratados (daño transgeneracional)
- Ambas cepas presentan variación en las mismas concentraciones lo que implica que *D. mülleri* representa a un organismo igual de sensible y posible complemento a los estudios de daño reprotóxico y transgeneracional para *D. melanogaster*.
- El efecto de esterilidad se ve presente en todas las generaciones tanto de *D. melanogaster* como *D. mulleri*, siendo más evidente en los organismos tratados.
- Para ambas cepas se muestran más fluctuaciones en la progenie promedio de 1 F<sub>2</sub> lo que hace más visible el daño transgeneracional en esta generación.
- *Drosophila mülleri* muestra ser un modelo confiable, que aún debe estudiarse para comparar su respuesta con relación a otras especies del genero *Drosophila*.
- Se propone exponer a *D. mulleri* a más compuestos pertenecientes a diferentes familias químicas para ver su similitud con *D. melanogaste*.

Es importante que, en la evaluación de la actividad genotóxica de los contaminantes se incluya el efecto reprotóxico en los organismos expuestos y que se amplíe el estudio hacia las siguientes generaciones. El uso de *D. mulleri* es una ayuda importante porque con su característica de testículos pigmentados, es posible valorar el daño morfológico en una primera aproximación, lo que permite obtener cruza adicionales para el seguimiento de la progenie. Es necesario continuar con la validación del modelo de *D. mulleri* para probar su sensibilidad ante sustancias pertenecientes a otros grupos químicos y también para establecer la correlación entre el diagnóstico de alteraciones en las gónadas masculinas por inspección visual y por disección directa.

## REFERENCIAS

---

Adams, M. D., S. E. Celniker, R. A. Holt, C. A. Evans, J. D. Gocayne, P. G. Amanatides, S. E. Scherer, et al. 2000. "The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*." *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2185>.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2005. "ATSDR - Public Health Statement: Lead." Toxic Substances Portal. 2005.

Altamirano-Lozano, M. A., L. Álvarez-Barrera, R. A. Mateos-Nava, T. I. Fortoul, and J. J. Rodríguez-Mercado. 2014. "Potential for Genotoxic and Reprotoxic Effects of Vanadium Compounds due to Occupational and Environmental Exposures: An Article Based on a Presentation at the 8th International Symposium on Vanadium Chemistry, Biological Chemistry, and Toxicology, Washin." *Journal of Immunotoxicology* 11 (1):19–27. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2013.791734>.

Anderson, L. M., R. Koseniauskas, E. S. Burak, T. J. Moskal, C. T. Gombar, J. M. Phillips, E. B. Sansone, et al. 1992. "Reduced Blood Clearance and Increased Urinary Excretion of AT-Nitrosodimethylamine in Patas Monkeys Exposed to Ethanol or Isopropyl Alcohol." *Cancer Research* 52 (6):1463–68.

Araujo, FD, JD Knox, M Szyf, GB Price, and M Zannis-Hadjopoulos. 1998. "Concurrent Replication and Methylation at Mammalian Origins of Replication." *Mol Cell Biol* 18:3475–82.

ATSDR. 1999. "ToxFAQs™: N-Nitrosodimetilamina."

ATSDR. 2005. "ToxFAQs™: Níquel." *ATSDR*, 0–1.

ATSDR. 2017. "Public Health Statement: Nickel." EPA Inc., 2017. <https://doi.org/10.1109/IROS.2014.6943118>.

Avanesian, A., S. Semnani, and M. Jafari. 2009. "Can *Drosophila Melanogaster* Represent a Model System for the Detection of Reproductive Adverse Drug Reactions?" *Drug Discovery Today*. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.05.010>.

Baars, A.J., W.G.H Blijleven, G.R. Mohn, A. T. Natarajan, and D.D. Breimer. 1980. "Preliminary studies on the ability of drosophila microsomal preparations to activate mutagens and carcinogens" 72:257–64.

Barber, R. C., P. Hickenbotham, T. Hatch, D. Kelly, N. Topchiy, G. M. Almeida, G. D.D. Jones, et al. 2006. "Radiation-Induced Transgenerational Alterations in Genome Stability and DNA Damage." *Oncogene* 25 (56):7336–42. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209723>.



Barratt, C, R Aitken, L Björndahl, D Carrel, P de Boer, U Kvist, S Lewis, et al. 2010. “Sperm DNA: Organization, Protection and Vulnerability: From Basic Science to Clinical Applications - A Position Report.” *Human Reproduction* 25:824–38.

Beland, F. A., and M. Poirier. 1994. “5 DNA Adducts and Their Consequences.” *Methods to Assess DNA Damage and Repair: Interspecies Comparison*, 29–55.

Bestor, TH. 2000. “The DNA Methyltransferases of Mammals.” *Hum Mol Genet* 9:2395–2402.

Bird, A. 2002. “DNA Methylation Patterns and Epigenetic Memory.” *Genes Dev* 16:6–21.

Bird, A., and A. P. Wolff. 1999. “Methylation Induces Repression-Belts, Braces and Chromatin.” *Cell* 99:451–54.

Botas, J. 2007. “Drosophila Researchers Focus on Human Disease” 39 (5):1–3. [papers://7099978e-8acd-471e-91cc-40e05c1777dc/Paper/p114](https://doi.org/10.1093/genetics/141.5.1).

Brusick, D. J. 1987. “Implications of Treatment-Condition-Induced Genotoxicity for Chemical Screening and Data Interpretation.” *Mutation Research/Genetic Toxicology* 189 (1):1–6. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(87\)90026-7](https://doi.org/10.1016/0165-1218(87)90026-7).

Butterworth, F. M., A. Gunatilaka, and M. E. Gonshe. 2001. *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change 2*.

Calabrese, E. J. 2003. “The Maturing of Hormesis as a Credible Dose-Response Model.”

Calabrese, E. J. 2008. *An Assessment of Anxiolytic Drug Screening Tests: Hormetic Dose Responses Predominate. Critical Reviews in Toxicology*. Vol. 38. <https://doi.org/10.1080/10408440802014238>.

Casas, E, and T. Vavouri. 2014. “Sperm Epigenomics: Challenges and Opportunities.” *Frontiers in Genetics*: 1–7.

Castoldi, A. F., N. Onischenko, C. Johansson, T. Coccini, E. Roda, M. Vahter, S. Ceccatelli, and L. Manzo. 2008. “Neurodevelopmental Toxicity of Methylmercury: Laboratory Animal Data and Their Contribution to Human Risk Assessment.” *Regulatory Toxicology and Pharmacology*:215–29.

Cerón-Rincón, L. E and F. A. Aristizábal-Gutiérrez. 2012. “Dinámica Del Ciclo Del Nitrógeno Y Fósforo En Suelos.” *Revista Colombiana de Biotecnología* XIV No. 1:285–95.

Choy, W. N. 2001. *Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment. Hardcover Publisher*.

Clark, A. M. 1982. “The Use of Larval Stages of *Drosophila* in Screening for Some Naturally

Occurring Mutagens” 2:89–97.

Costello, J. F. and C, Plass. 2001. “Methylation Matters.” *J Med Genet* 38: 285–303.

Derijick, A, G Van der Heijden, M Giele, M Philippens, and P de Boer. 2008. “DNA Double-Strand Break Repair in Parental Chromatin of Mouse Zygotes, the First Cell Cycle as an Origin of the Novo Mutation.” *Human Molecular Genetics* 17:1922–37.

Durando, C. M., R. H. Baker, W. J. Etges, W. B. Heed, M. Wasserman, and R. Desalle. 2000. “Phylogenetic Analysis of the Repleta Species Group of the Genus *Drosophila* Using Multiple Sources of Characters.” *Molecular Phylogenetics and Evolution* 16 (2):296–307. <https://doi.org/10.1006/mpev.2000.0824>.

EMS, Environmental Mutageno - Society. 1975. “Environmental Mutagen Hazar.” *Science* 186:504–14.

EPA. 2014a. “ATSDR Technical Fact Sheet – N-Nitroso-Dimethylamine (NDMA),” no. January:1–6. [https://www.epa.gov/sites/production/files/201403/documents/ffrrofactsheet\\_contaminant\\_ndma\\_january2014\\_final.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/201403/documents/ffrrofactsheet_contaminant_ndma_january2014_final.pdf).

EPA. 2014b. “Climate Change Indicators in the United States.” *U.S. Environmental Protection Agency*. <https://doi.org/10.1063/1.3652715>.

EPA United States Environmental Protection Agency. 2015a. “Basic Information | EPA Research | EPA.” <http://www3.epa.gov/pm/basic.html>. 2015. <http://www3.epa.gov/pm/basic.html>.

EPA United States Environmental Protection Agency. 2015b. “Sustainability Information | EPA Research | EPA.” [Epa.gov](http://www.epa.gov/sustainability/basicinfo.htm). 2015. <http://www.epa.gov/sustainability/basicinfo.htm>.

Fagin, D. 2012. “The Learning Curve.” *Nature*, 462–65.

Fischer, J. A., and T. Maniatis. 1985. “Structure and Transcription of the *Drosophila Mulleri* Alcohol Dehydrogenase Genes.” *Nucleic Acids Research* 13 (19):6899–6917. <https://doi.org/10.1093/nar/13.19.6899>.

García, A, AI Haza, and P. Morales. 2011. “N-Nitrosopiperidina Y N-Nitrosodibutilamina (I): Formación, Exposición Humana Y Metabolismo.” *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 5 (1):27–47. <https://revistas.ucm.es/index.php/RCCV/article/viewFile/RCCV1111120027A/22278>.

Genesca, A, M Caballin, R Miro, J Benet, J Germa, and J Egozcue. 1992. *Human Genetics* 89:181–86.

Gichner, T., J. Velemínský, and A. G. Underbrink. 1980. "Induction of Somatic Mutations by the Promutagen Dimethylnitrosoamine in Hairs of *Tradescantia Stamen*." *Mutation Research - Genetic Toxicology* 78 (4):381–84. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(80\)90045-2](https://doi.org/10.1016/0165-1218(80)90045-2).

Giraud, Maeva, G. Chandran Unnithan, Gaëlle Le Goff, and René Feyereisen. 2011. "Regulation of Cytochrome P450 Expression in *Drosophila*: Genomic Insights" 97 (2):115–22. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.06.009>.Regulation.

Goff, G. Le, F. Hilliou, B.D. Siegfried, S. Boundy, E. Wajnberg, L. Sofer, P. Audant, R. H. ffrench-Constant, and R. Feyereisen. 2006. "Xenobiotic Response in *Drosophila Melanogaster*: Sex Dependence of P450 and GST Gene Induction." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36 (8):674–82. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.05.009>.

González Cervera, Alfonso S. 2006. "Subfecundidad e Infertilidad en Mujeres Mexicanas.," 1–9.

González Marín, C, J. Gosálvez, and R. Roy. 2012. "Types, Causes, Detection and Repair of DNA Fragmentation in Animal and Human Sperm Cells." *International Journal of Molecular Sciences*, 1426–52.

Graf, Ulrich, Dieter Wild, and Friedrich E Wiirgler. 1992. "Genotoxicity of 2-Amino-3-Methylimidazo [4,5-F] Quinoline (IQ) and Related Compounds in *Drosophila*" 7 (2):145–49.

Guerrero, GAM, and M Lorenzana-Jiménez. 2009. "Las Fases En El Desarrollo de Nuevos Medicamentos." *Rev Fac Med UNAM* 3 (April):108. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00108>.

Hällström, I., and Agneta Blanck. 1985. "Genetic Variation in Cytochrome -p450 in Xenobiotic Metabolism in *Drosophila melanogaster*" 56:157–71.

Hammoud, A., D. T. Carrell, M. Gibson, M. Sanderson, K. Parker-Jones, and C. M. Peterson. 2010. "Decreased Sperm Motility Is Associated with Air Pollution in Salt Lake City." *Fertility and Sterility* 93 (6):1875–79. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.12.089>.

Hanson, M. A, and M. K Skinner. 2016. "Developmental Origins of Epigenetic Transgenerational Inheritance," no. November 2015:1–9. <https://doi.org/10.1093/eep/dvw002>.

Hasson, E, H Naveira, and A Fontdevila. 1992. "The Breeding Sites of Argentinean Cactophilic Species of the *Drosophila-Mulleri* Complex (Subgenus *Drosophila-Repleta* Group)." *Revista Chilena De Historia Natural* 65 (3):319–26.

Ianella, P., M.T.V. Azeredo-Oliveira, and M.M. Itoyama. 2008. "Programmed Cell Death in Salivary Glands of *Drosophila Arizonae* and *Drosophila Mulleri*." *Genetics and Molecular Research* 7 (2):476–86. <https://doi.org/10.4238/vol7-2gmr412>.

- IARC. 1998. "International Program on Chemical Safety." 17.
- Jenuwein, T, and C.D Allis. 2001. "Translating the Histone Code." *Science* 293:1074–80.
- King, Robert C., Surinder K. Aggarwal, and Urmila Aggarwal. 1968. "The Development of the Female *Drosophila* Reproductive System." *Journal of Morphology* 124 (2):143–65. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051240203>.
- Kniewald, Jasna, Ivana Kmetić, Visnja Gaurina-Srček, and Zlatko Kniewald. 2005. "Alternative Models for Toxicity Testing of Xenobiotics." *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju* 56 (2):195–204. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.021>.
- Kumar, Sunil. 2004. "Occupational Exposure Associated with Reproductive Dysfunction." *J Occup Health* 46:1–19. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/joh/46/1/46\\_1\\_1/\\_pdf/-char/en](https://www.jstage.jst.go.jp/article/joh/46/1/46_1_1/_pdf/-char/en).
- Laubenthal, J., O. Zlobinskaya, K. Poterłowicz, A. Baumgartner, M. R. Gdula, E. Fthenou, M. Keramarou, et al. 2012. "Cigarette Smoke-Induced Transgenerational Alterations in Genome Stability in Cord Blood of Human F1 Offspring." *FASEB Journal* 26 (10):3946–56. <https://doi.org/10.1096/fj.11-201194>.
- Li, E, TH Bestor, and R Jaenisch. 1992. "Targeted Mutation of the DNA Methyltransferase Gene Results in Embryonic Lethality." *Cell* 69:915–26.
- Lijnsky, W. 1999. "N-Nitroso Compuestos En La Dieta. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutágeno." 34:129–38. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(99\)00015-0](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(99)00015-0).
- Lodola, A., and J. Stadler. 2011. *Pharmaceutical Toxicology in Practice: A Guide for Non-Clinical Development*. *Pharmaceutical Toxicology in Practice: A Guide for Non-Clinical Development*. <https://doi.org/10.1002/9780470909911>.
- Lovell, D.P. 2000. "Dose-Response and Threshold-Mediated Mechanisms in Mutagenesis: Statistical Models and Study Design." *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 464 (1):87–95. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(99\)00169-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(99)00169-2).
- Markow, T. A., and P. M. O'Grady. 2007. "Drosophila Biology in the Genomic Age." *Genetics*. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.074112>.
- Marshall, D.J., and T. Uller. 2007. "When Is a Maternal Effect Adaptive?" *Oikos* 116 (12):1957–63. <https://doi.org/10.1111/j.2007.0030-1299.16203.x>.
- Mattson, W. 2008. "Hormesis Defined." *Ageing Res Rev*, 1–7.
- Merlo, D. F., C. P. Wild, M. Kogevinas, Soterios Kyrtopoulos, and J. Kleinjans. 2009. "NewGeneris: A European Study on Maternal Diet during Pregnancy and Child Health." *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 18 (1):5–10. <https://doi.org/10.1158/1055->

9965.EPI-08-0876.

Mesinga, T. T., G. J. A. Speijers, and J. Meulenbelt. 2003. "Health Implications of Exposure to Environmental Nitrogenous Compounds." *Toxicology Reviews* 22:41–51.

Moore, D. S. 2005. *Estadística Aplicada Básica*. Antoni Bos.

Morgan, T. 1919. The Physical Basis of Heredity. *The Journal of Philosophy, Psychology and Scientific Methods* 1920, issued 1919.

Nakao, M. 2001. "Epigenetics: Interaction of DNA Methylation and Chromatin." *Gene* 278:25–31.

Negishi, T, T. Shiotani, K. Fujikawa, and H. Hayatsu. 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*, 119–28.

Nöthiger, R. 1970. "Sucrose Density Separation - a Method for Collecting Large Numbers of *Drosophila* Larvae.," no. February:1970.

O'Brien, J. M., A. Williams, J. Gingerich, G. R. Douglas, F. Marchetti, and C. L. Yauk. 2013. "No Evidence for Transgenerational Genomic Instability in the F1 or F2 Descendants of Muta™ Mouse Males Exposed to N-Ethyl-N-Nitrosourea." *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 741–742. Elsevier B.V.:11–17. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2013.02.004>.

Okano, H, D. W. Bell, D. A Haber, and E. Li. 1999. "DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for the Novo Methylation and Mammalian Development." *Cell* 99:247–57.

Patterson, J. T. 1943. *Drosophilidae of the Southwest*. University of Texas.

Patterson, J. T., and G. B. Mainland. 1944. *Drosophilidae of the Southwest*. University of Texas.

Paulsen, M., and A. C. Ferguson-Smith. 2001. "DNA Methylation in Genomic Imprinting, Development, and Disease." *J Pathol* 195:97–110.

Peña, C., D. Carter, and F. Ayala-Fierro. 2001. "Evaluación de Riesgos Ambientales." *Clinical Infectious Diseases* 22:1–94. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8824972](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8824972).

Plass, C. 2002. "Cancer Epigenomics." *Hum Mol Genet* 11:2479–88.

Rajpurohit, S., C. C. Oliveira, W. J. Etges, and A. G. Gibbs. 2013. “Functional Genomic and Phenotypic Responses to Desiccation in Natural Populations of a Desert *Drosophila*.” *Molecular Ecology* 22 (10):2698–2715. <https://doi.org/10.1111/mec.12289>.

Rakyan, V.K., J Preis, H.D. Morgan, and E. Whitelaw. 2001. “The Marks, Mechanism and Memory of Epigenetic States in Mammals.” *Biochem J* 356:1–10.

Ramirez Flores, Maria Fernanda. 2015. “Uso de *Drosophila Mojavensis* Para Evaluar Daño Reprotoxico Y Transgeneracional.pdf.”

Ramos-Morales, P., and C. C. Vega-García. 2008. “DMN Disturbs Sex Differentiation and Induces Transgenerational Damage from Affected Males.” *Environmental and Molecular Mutagenesis* pp 49.

Ramos, P. 2006. “N-Nitrosodimethylamine: From Lethal Concentrations to NOEC. Survival and Genotoxic Activity-Concentration Curve: Effects on Fertility and Transgenerational Inductin of Somatic Mutation.” *Journal of Enviromental and Molecula Mutagenesis Society* 47(6):437.

Ramos-Morales, P., MHM Abundis, OJC Gaytan, TMG Ordaz, SPD Orozco, LJ Maldonado, JA Hernández, et al. 1993. “Manual de Laboratorio de Genética de *Drosophila Melanogaster*.” McGraw-Hill, ISBN: 970-10-0222-9, México, D.F.

Rees, D.C., A. Tezcan, C.A. Haynes, M.Y. Walton, S. Andrade, O. Einsle, and J.B. Howard. 2005. “Structural Basis of Biological Nitrogen Fixation.” *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 363:(1829): 971-984.

Repetto Jiménez, M., and G. Repetto Kuhn. 2009. *Toxicología Fundamental*. Edited by Díaz de Santos. 4a ed.

Richards, EJ, and SCR Elgin. 2002. “Epigenetic Codes for Heterochromatin Formation and Silencing: Rounding up the Usual Suspects.” *Cell* 108:489–500.

Richardson, M. E. 1977. “Electrophoretic mobility and larval substrate within species o f the drosophzla mullerz complex1,” 141–54.

Rodríguez-Yunta, E. 2007. “Ética de La Investigación En Modelos Animales de Enfermedades Humanas.” *Acta Bioetica* 13 (1):26–40.

Roldan, Reyes E. 2016. *Estudio De Casos De Toxicidad. Introducción a La Toxicología*. <https://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/publicaciones/libros/cbiologicas/libros/Toxico-ago18.pdf>.

Santalla, M., E. L. Portiansky, and P. V. Ferrero. 2016. “*Drosophila Melanogaster* , Un Modelo Animal Emergente En El Estudio de Enfermedades Cardíacas Humanas” 84:424–30.

Shibahara, Toshikazu, H. Iyehara Ogawa, Haruko Ryo, and Kazuo Fujikawa. 1995. "DNA-Damaging Potency and Genotoxicity of Aflatoxin M1 in Somatic Cells in Vivo of *Drosophila Melanogaster*." *Mutagenesis* 10 (3):161–64. <https://doi.org/10.1093/mutage/10.3.161>.

Silbergeld, Ellen. n.d. "Toxicología Herramientas Y Enfoques: Definiciones Y Conceptos." *Enciclopedia de La Salud Y Seguridad En El Trabajo*, 82. <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tom1/33.pdf>.

Silbergeld, Ellen. 2000. "Toxicología, Principios Generales de La Toxicología." *Enciclopedia de Salud Y Seguridad En El Trabajo*, 84.

Silbergeld, Ellen K. 2000. "Toxicología, Principios Generales de La Toxicología." *Enciclopedia de Salud Y Seguridad En El Trabajo poner el número del trabajo*, 1–84.

Simpson, Pat. 2002. "EVOLUTION OF DEVELOPMENT IN CLOSELY RELATED SPECIES OF FLIES AND WORMS." *Genetics* 3 (December):1–11. <https://doi.org/10.1038/nrg947>.

Skinner, M. K. 2008. "What Is an Epigenetic Transgenerational Phenotype ? F3 or F2" 25:2–6. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.09.001>.

Smart, C., and E. Hodgson. 2008. *Molecular and Biochemical Toxicology*. Edited by Willey. New Jersey. 4a ed. New Jersey.

Sutovsky, P., and G. Schatten. 2000. "Paternal Contributions to the Mammalian Zygote: Fertilization after Sper-Egg Fusion." *International Review of Cytology*, 1–65.

Throckmorton, L. H. 1982. *The Virilis Spevies Group*. In: M. Asburner, H. Carson and J. Thompson. *The Geentics and Biologyof Drosophila*. Academic p. Vol. 3. New York.

Vilela, Carlos Ribeiro. 1983. "A Revision of the *Drosophila Repleta* Species Group (Diptera, Drosophilidae)."

Wasserman, M., and H. R. Koepfer. 1979. "Cytogenetics of the South American *Drosophila Mulleri* Complex: The Martensis Cluster. More Interspecific Sharing of Inversions." *Genetics*.

Wasserman, M., and K. H. Roberta. 1930. "Cytogenetics of the South American *Drosophila Mulleri* Complex: The Martensis Cluster. More Interspecific Sharring of Inversions." *Wildlife Research* 3157 (I 996):747–56. <https://doi.org/10.1109/ICTD.2009.5426693>.

Wasserman, M. 1968. "Recombination-induced chromosomal heterosis." *Genetics* 58 (January):125–39.

Wasserman, M., and H. R. Koepfer. 1977. "Character Displacement for Sexual Isolation

Between *Drosophila Mojavensis* and *Drosophila Arizonensis*.” *Evolution* 31 (4):812–23.

Wasserman, M. 1980. “Does asymmetrical mating preference show the direction of evolution?” *Evolution* 34 (6):1116–24.

Wasserman, Marvin, and R H Richardson. 1987. “Evolution of Brazilian *Drosophila Mulleri* Complex Species.” *The Journal of Heredity*, 283–86.

Wasserman, Marvin. 1960. “Cytological and phylogenetic relationships in the repleta group of the genus *drosophila*” 459 (1951):387–89.

Wasserman, Marvin. 1972. “FACTORS INFLUENCING FITNESS I N CHROMOSOMAL STRAINS IN *DROSOPHILA SUBOBSCURA*,” December:691–708.

Wasserman, Marvin. A. Fontdevila, and A. Ruiz. 1983. “Potential Gene Exchange Between South American *Drosophila* Species, with Description of a New Species in the *D. Repleta* (Diptera : *Drosophilidae* ) Group” 76:675–77.

WHO. 2008. “N-Nitrosodimethylamine in Drinking-Water.” *WHO Guidelines for Drinking-Water Quality*.

Williams, G. M., H. Mori, and C. A. McQueen. 1989. “Structure-Activity Relationships in the Rat Hepatocyte DNA-Repair Test for 300 Chemicals.” *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 221 (3):263–86. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(89\)90039-0](https://doi.org/10.1016/0165-1110(89)90039-0).

Wolffe, A. P., and M. A. Matzke. 1999. “Epigenetics: Regulation through Repression.” *Science* 286:481–86.

Xu, B, S. E. Chia, M. Tsakok, and C. N. Ong. 1993. “Trace Elements Inblood and Seminal Plasma and Their Relationship to Sperm Quality.” *Reprod Toxicol* 7:613–18.

Yang, J., C. Mccart, D. J Woods, S. Terhzaz, K. G Greenwood, H. Richard, and J. A. T. Dow. 2007. “Comparative Genomics A *Drosophila* Systems Approach to Xenobiotic Metabolism,” no. 26:223–31. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00018.2007>.

Yauk, C. L., A.Polyzos, A. Rowan-Carroll, C. M. Somers, R.W. Godschalk, F. J. Van Schooten, M. L. Berndt, et al. 2002. “Germ-Line Mutations, DNA Damage, and Global Hypermethylation in Mice Exposed to Particulate Air Pollution in an Urban/industrial Location.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (6):2103–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2103>.