



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LA N-DIMETILNITROSAMINA (NDMA) EN EL  
DESARROLLO PUPAL DE *Drosophila melanogaster*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

GABRIELA MARGARITA JIMÉNEZ MARTÍNEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DOCTORA PATRICIA RAMOS MORALES

2011





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

1. Datos del alumno

Jiménez

Martínez

Gabriela Margarita

57378311

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

300129885

2. Datos del tutor

Dra.

Ramos

Morales

Patricia

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Riesgo

Escovar

Juan Rafael

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Altamirano

Lozano

Mario Agustín

5. Datos del sinodal 3

M. en C.

Torres

García

María del Pilar

6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Muñoz

Martínez

Adriana

7. Datos del trabajo escrito

Efecto de la N-dimetilnitrosamina (NDMA) en el desarrollo pupal de *Drosophila melanogaster*.

55 p

2011

## DEDICATORIA

A mi Mamá eres todo para mí, te amo.

A mi Tío Bito estas siempre en mi corazón.

A mi Tia Martha, fuiste mi calma al verte siempre tan fuerte.

A Mamá Bitá gracias por tus cuidados.

A Pedro lo esencial es que estás.

A Oscar mi apoyo en algún momento.

A Juan y al Abuelo siempre están acompañándome en mis retos.

A mi Tía Marisela, primo y primas, creciendo paso a paso.

Tal vez solo sea una hoja o mi tesis de Licenciatura pero estamos juntos...

¡Gracias por hacer de mí quien soy!

---

## Agradecimientos

A mi tutora Paty:

Gracias Doctora por tu apoyo académico, motivación y tu pasión por la biología, la genética, y las moscas.

A Hugo Rivas:

Por cuestionarme.

A los profesores Adriana , Blanca y Armando:

Por el apoyo en la toma de las fotos para esta tesis, por sus comentarios y sugerencias en el desarrollo de la tesis y por experimentar con Experimenta.

A mis amigas y compañeros del Laboratorio de Genética y toxicología ambiental/Banco de moscas y carrera:

Kahorik , Linda, Yaneli, Ramsés, Lety, Diana, Tulio y Clau.

Es muy gratificante estar a lado de cada una (o), sigo aprendiendo de ustedes...

Master Cesar Fdez. Montiel por su apoyo incondicional.

Gracias por formar parte de nuestro instante de vida, en el inmenso universo.

A nuestra máxima casa de estudios:

U.N.A.M.

Por permitirme establecer un proyecto de vida desde que entré al CCH-Vallejo y así decidir .Y en la carrera por medio de las prácticas de campo conocer tan sólo un poco más de esta tierra Mexicana.

Por el apoyo del Banco de Moscas que me proporcionó el material biológico para el desarrollo de esta tesis y además al PAPIME EN206803 por el apoyo económico.

A mis sinodales

Dr. Juan Rafael Riesgo

Dr. Mario Agustín Altamirano

M. en C. María del Pilar Torres

Y a la M. en C. Adriana Muñoz

México, D.F., Ciudad Universitaria, 2011.

# Índice

Resumen

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
Toxicología y toxicología genética.....	3
Principios y protocolos de investigación.....	6
Modelo biológico: <i>Drosophila melanogaster</i> .....	8
Ciclo de vida: Biología del desarrollo de <i>D. melanogaster</i> .....	8
Químico de referencia: N-dimetilnitrosamina (NDMA).....	15
<b>II. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>18</b>
Hipótesis.....	19
Objetivos.....	19
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
Diseño experimental.....	21
Análisis de resultados.....	23
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>41</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>43</b>
<b>VII. REFERENCIAS.....</b>	<b>44</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>50</b>

## Resumen

El desarrollo es una etapa crucial para la organización de las estructuras básicas del plan corporal de los organismos. En tratamientos previos en los que larvas de *Drosophila melanogaster* han sido alimentadas crónicamente con concentraciones bajas de N-dimetilnitrosamina (NDMA) se han registrado individuos que mueren durante la metamorfosis y en los que se aprecia la ausencia de cabeza, pero sí presentan estructuras pertenecientes al tórax y al abdomen (Ramos et al, 2006). En este trabajo se estableció un protocolo para documentar la inducción de alteraciones en la región cefálica de moscas *D. melanogaster*, expuestas durante el desarrollo al promutágeno de referencia (NDMA). Larvas de tercer estadio ( $72 \pm 4$  de edad) de tipo silvestre fueron expuestas por 48 horas (tratamiento subcrónico) a diferentes concentraciones de NDMA en diluciones sucesivas a partir de 5 mM hasta 0.038 mM en medio instantáneo, además de un testigo negativo (agua destilada) y como diluyente para la NDMA se utilizó agua destilada en todos los casos. Al iniciar la pupación las larvas migraron hacia la parte superior del tubo homeopático por lo que a cada una se le identificó con un número. Durante las siguientes horas se realizó el registro y seguimiento, hasta por seis días, a partir de la formación de la pupa, para determinar la etapa pupal en la que se encontraban (Bainbridges y Bownes, 1981). Se obtuvo la proporción promedio de alteraciones (PPA) de acuerdo a la región afectada de las pupas: cabeza (SC), tórax (ST), abdomen (SA) y patas (SP). También, la sobrevivencia (IS), la proporción de organismos adultos (POA2), la proporción del estadio pupal (PEP) y la viabilidad de Larvas (L3)-Prepupas(P1-P5)-Pupas(P6-P15)-Adultos(A2). La NDMA provocó que en concentraciones altas, (2.5 y 5mM) con significancia estadística (ANOVA  $P \leq 0.05$  y Kastembaum-Bowman,  $\alpha = 0.05$ ) se presentará la mayor mortalidad de organismos. Además coinciden con la mayor proporción de organismos afectados. En éstos se observó la diferenciación y gradual reversión del tejido cefálico y torácico incluyendo las patas, así como la modificación del tiempo de desarrollo regular de la metamorfosis. Por lo que respecta a la viabilidad de larvas de tercer estadio (L3) y a la obtención de adultos respecto al tiempo (PA2), en general, concentraciones bajas del compuesto aceleraron el desarrollo mientras que en concentraciones altas el desarrollo se retrasó, respecto al testigo (prueba de dos colas,  $\alpha = 0.05$ ). Se confirmó la actividad teratógena de la NDMA, pues modifica la secuencia y el patrón de desarrollo de *D. melanogaster*. Se concluye también que este modelo (mosca de la fruta) es útil para realizar estudios de alteraciones postembrionarias.

## I. INTRODUCCIÓN

En México, el 2.7% de la población femenina es susceptible de parir hijos con algún defecto del desarrollo. Las causas son multifactoriales y entre ellas la calidad del ambiente es relevante. En nuestro país desde hace casi 30 años la incidencia de malformaciones es considerada un problema epidemiológico (CONAVE, 2005).

Toxicología y toxicología genética.

La toxicología estudia la interacción entre las sustancias y los sistemas biológicos (Timbrell, 2002); comprende desde la etiología de las enfermedades, la plausibilidad de las asociaciones entre éstas y la exposición a factores potencialmente peligrosos (como ocurre en la exposición laboral), hasta la elaboración e interpretación de pruebas estandarizadas para determinar las propiedades tóxicas de los agentes (Silgerberd et al, 2001).

Un tóxico es cualquier sustancia nociva para un biosistema. A las sustancias externas que interactúan con un organismo se les denomina xenotóxicos. Para que una sustancia provoque un efecto tóxico debe encontrarse en la cantidad suficiente, alcanzar un lugar específico del cuerpo (órgano blanco o diana) y permanecer disponible el tiempo necesario para inducir dicho efecto.

Con respecto a la forma y duración de la exposición, las principales vías por las que las sustancias ingresan al cuerpo son: intravenosa, inhalatoria oral y dérmica; sin embargo también son relevantes la intraperitoneal, la subcutánea, la intramuscular y la intradérmica. La duración de la exposición es relativa al tipo de organismo del que se trate: en mamíferos, la exposición puede ser aguda (hasta 24 horas), subcrónica (más de 24 horas a 3 meses) ó crónica (por más de 3 meses) (Klaassen y Watkins, 2005).

Una vez en el interior de las células, los xenotóxicos son metabolizados por medio de reacciones enzimáticas que modifican su solubilidad en agua e incrementan o disminuyen su excreción, de acuerdo a sus propiedades físico-químicas. El metabolismo está dividido en reacciones de Fase I (reacciones de oxidación), en el que se agrega un grupo funcional por medio de oxidación, reducción o hidrólisis; el producto entonces puede ser conjugado en la Fase 2 (reacciones de conjugación), en las

que un metabolito con enlaces de alta energía cede un grupo funcional polar con lo que se facilita su excreción (Silgerberd, 2001). A este conjunto de reacciones se les llama biotransformación. Las enzimas de la biotransformación tienen localizaciones subcelulares particulares; algunas en el retículo endoplásmico o en el citosol y unas pocas en otros organelos como las mitocondrias (Timbrell, 2002).

La capacidad que tienen agentes físicos, químicos o biológicos para dañar al material genético se establece mediante el uso de estrategias metodológicas que acorde al organismo utilizado como modelo (bacterias, insectos o mamíferos), la información obtenida se analiza con una base probabilística, por ejemplo: una sustancia que daña el material genético de bacterias, levaduras, plantas y mamíferos (roedores), probablemente dañará también al material genético de los seres humanos.

Los agentes químicos que son capaces de modificar la calidad o cantidad del ADN, así como su expresión o regulación, son llamados genotóxicos y la ciencia que estudia estas interacciones es la toxicología genética (Brusick, 1987; Heflich, 1991; Klassen y Watkins, 2005). Algunos genotóxicos reaccionan directamente con el ADN, otros no. Estos últimos adquieren la actividad genotóxica como producto de las reacciones de biotransformación que ocurren en los organismos expuestos, por lo que son denominados progenotóxicos (Takehisha, et al., 1988; Veleminsky y Gichner, 1988; Silgerberd, 2001; Misra y Waalkes, 2001).

Los metabolitos (especies químicas reactivas) comúnmente se unen a centros altamente nucleofílicos, como por ejemplo, la posición N<sup>7</sup> de la guanina (Nakayama, et al, 2002; Klaassen, 2005), o bien con los oxígenos de las guaninas y las citosinas. Este tipo de alteraciones forman aductos que en algunos casos pueden ser altamente inestables en el ADN pero en ocasiones éstos pueden ser radicales metilos o etilos, que también son reconocidas como señales que regulan la expresión del material genético durante las diversas etapas de la vida de los organismos (Meehan, 2002). Por otra parte, algunos aductos, como los formados por las aminas aromáticas, pueden ser voluminosos e interferir o bloquear la síntesis de ADN, lo que induce a su vez mecanismos de reparación (Klaassen y Watkins, 2005) como la reparación por O<sup>6</sup>-metilguanina-DNA metiltransferasa (MGMT), que elimina la metilación errónea del ADN (Christmann et al, 2007). Si el daño no es superado o el producto de la reparación no es viable, las células sufren apoptosis (Klaassen y Watkins, 2005).

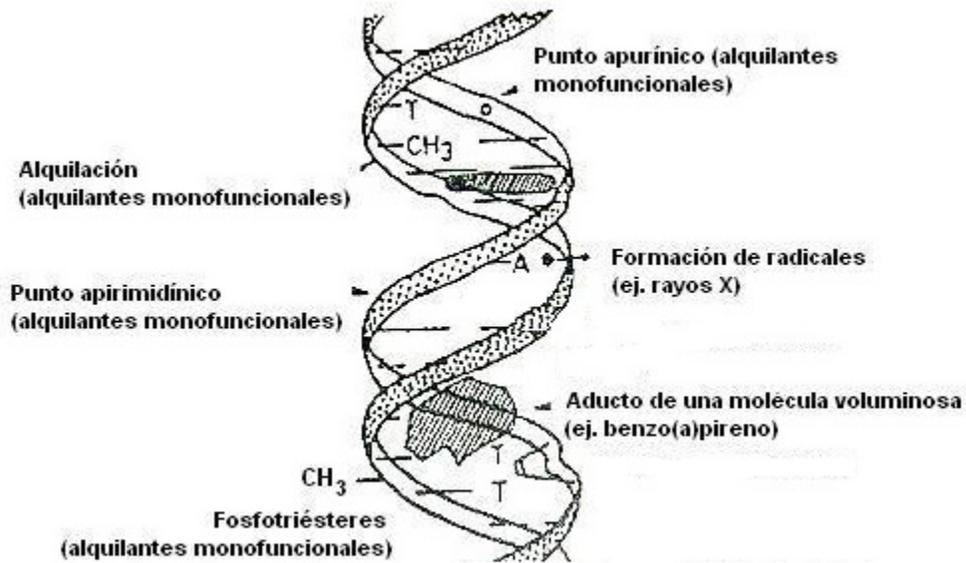


Figura 1. Tipos de daño al ADN provocado por algunos agentes químicos y físicos (tomado de Klaassen y Watkins, 2005).

Toda alteración en el proceso de división y organización celular puede derivar, de acuerdo con el linaje celular afectado, en eventos de mutagénesis, carcinogénesis o teratogénesis. Las alteraciones pueden presentarse en el proceso de la formación de las células germinales así como en la maduración del individuo, desde etapas embrionarias hasta la edad adulta. Los organismos entonces pueden representar anomalías funcionales o estructurales que modifican el patrón de desarrollo normal y, dependiendo del avance de las células en el desarrollo, alteran procesos de diferenciación o determinación celular (ICBD, 1991). A través del desarrollo, hay diferentes tipos de patrones de expresión de genes en conjuntos de células que son heredados establemente a través de divisiones celulares (Meehan, 2002). Entre otros mecanismos, los patrones de desarrollo dependen de la metilación previa a la transcripción de genes. Estos patrones son dinámicos durante el desarrollo de mamíferos y otros organismos. Por ejemplo, en ranas, el patrón de metilación del ADN cambia durante el desarrollo. Al inicio la metilación es alta, disminuye cerca del 40% en estadio de blástula y es mayor en gástrula (Meehan, 2002). La interacción entre las ADN metiltransferasas (Dnmt) y la remodelación de la cromatina son responsables de la generación de patrones de expresión; esta relación ha sido descrita en un amplio rango de organismos eucariontes (Meehan, 2002; Salzberg et al, 2004). Así mismo, se ha reportado que ratones con deficiencia en enzimas como las Dnmt mueren a media-gestación con fenotipos complejos y altos niveles de apoptosis. Otras anomalías citológicas que han sido asociadas con la

hipometilación en el genoma de ratones tratados con inhibidores de la metilación como, la 5-azacitidina, resulta en anomalías estructurales en los cromosomas 1, 9 y 16 (Meehan, 2002).

Principios y protocolos de investigación.

Para llevar a cabo la evaluación de un factor que altere el desarrollo en un biosistema (actividad teratogénica) es necesario que se consideren: la cinética del tóxico, la distribución, almacenamiento, metabolismo, y excreción; su interacción con un componente molecular de una célula o del proceso del desarrollo; la consecuencia de la interacción para la función del componente; y la consecuencia de la función alterada para la operación celular y el proceso de desarrollo (patogénesis). Este compuesto genera un defecto en el desarrollo funcional y/o estructural, para su comprensión es necesario investigar y ofrecer la descripción del mecanismo de toxicidad a nivel molecular, celular y del desarrollo (Faustman, 2000).

La evaluación estándar en periodos de desarrollo sigue seis Principios de Teratología (Anexo 1) determinados por James G. Wilson (Klaseen y Watkins, 2005). Para identificar dichos efectos, el primer acercamiento ha sido la descripción morfológica de la alteración estructural o fisiológica. Estas evaluaciones están estandarizadas por normas internacionales para pruebas *in vivo*, que tienen como base la identificación del nivel sin efecto adverso observable (NOAEL, por sus siglas en inglés) (Anexo 2). Además, existen algunos sistemas y organismos modelo para la evaluación de la toxicidad en el desarrollo (cuadro I). Entre los organismos modelo se encuentra la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*.

Cuadro I. Algunos métodos de evaluación, su descripción y evaluación.

Prueba	Descripción breve y criterios evaluados
FETAX, Frog Embryo Teratogenesis Assay- <i>Xenopus</i>	Los embriones de <i>Xenopus</i> en la etapa intermedia de blástula se exponen durante 96 horas y se evalúa la viabilidad, el crecimiento y la morfología.
Mesénquima del paladar de embrión humano	Crecimiento de células mesenquimales del paladar de embrión humano en un medio de cultivo sólido. Se valora el número de células al cabo de 3 días.
Cultivo de célula de la neurorretina de embrión de pollo	Se extrae la neurorretina de embriones de pollo de 6.5 días de vida y se hacen crecer en un cultivo de suspensión rotatorio durante 7 días. Los criterios de valoración son la agregación celular, el crecimiento, la diferenciación y los biomarcadores bioquímicos.
Tumor ovárico de ratón	Se cultivan células marcadas de tumor de ovario previamente expuestas al químico a probar en discos recubiertos de concavalina A durante 20 minutos. El criterio es la inhibición de la unión de las células a los discos.
Prueba de Chernoff y Kavlock	A los productos de ratones y ratas preñadas expuestas durante la organogénesis, se les valora el crecimiento postnatal, la viabilidad y la morfología macroscópica.
<i>Drosophila</i>	Se hacen crecer larvas de mosca desde la ovoposición del huevo hasta la emergencia del adulto. En los adultos se examinan efectos estructurales específicos (cerdas dobladas y alas con muescas) (Lynch, 1991)

(Tomado de Klassen y Watkins, 2005).

### Modelo biológico: *Drosophila melanogaster*

En este modelo se han desarrollado múltiples estrategias metodológicas que han generado un amplio conocimiento en diversas áreas de la biomedicina, incluso casi un siglo antes de la publicación de la secuencia completa de su genoma (Adams et al, 2000). En la actualidad, se reconoce que el 60% de sus genes mantienen homología con los de humanos entre los cuales se encuentran genes relacionados con enfermedades (Schneider, 2000; Botas, 2007).

Por lo anterior y entre otras ventajas para el desarrollo de este trabajo, destaca el ciclo de vida de corta duración (Ramos et al., 1993), así como la diferenciación de fases en los estadios de la metamorfosis (Bainbridge y Bownes, 1981). Además posee complejos enzimáticos semejantes a los presentes en la fracción S9 del hígado de mamíferos (Hällström et al., 1981, a, b, 1982; Vogel, 1975) por lo que es sensible al efecto de sustancias que requieren activación metabólica, sin la necesidad de adicionar un sistema enzimático exógeno (Vogel, 1988 a,b).

### Ciclo de vida de *D. melanogaster*

En la figura 2 se muestra la secuencia y duración del ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. El ciclo parte de un periodo de embriogénesis dentro del huevo fecundado. A partir de la formación del cigoto ocurren varias divisiones nucleares formándose un sincisio, ya que no existe citocinesis. Lo anterior provoca que la migración de proteínas de origen materno que ocurre dentro del huevo impacte de manera particular a cada uno de los núcleos o a grupos de éstos que comparten una posición cercana. Esta interacción proteína – núcleo será determinante de la posición, expresión y regulación genética del tejido y órganos que deriven de ellos. Conforme avanza el desarrollo, la expresión de los genes maternos se enriquecerá con la de los genes del embrión y es durante la metamorfosis cuando se completa la formación de la mosca adulta (Figura 3). El cuadro II muestra algunos tipos de genes que participan en el desarrollo de *Drosophila*.

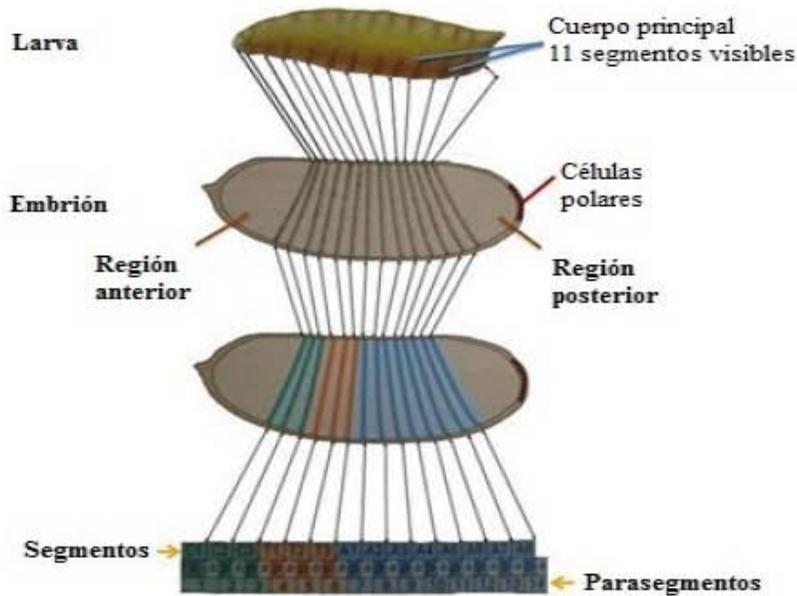
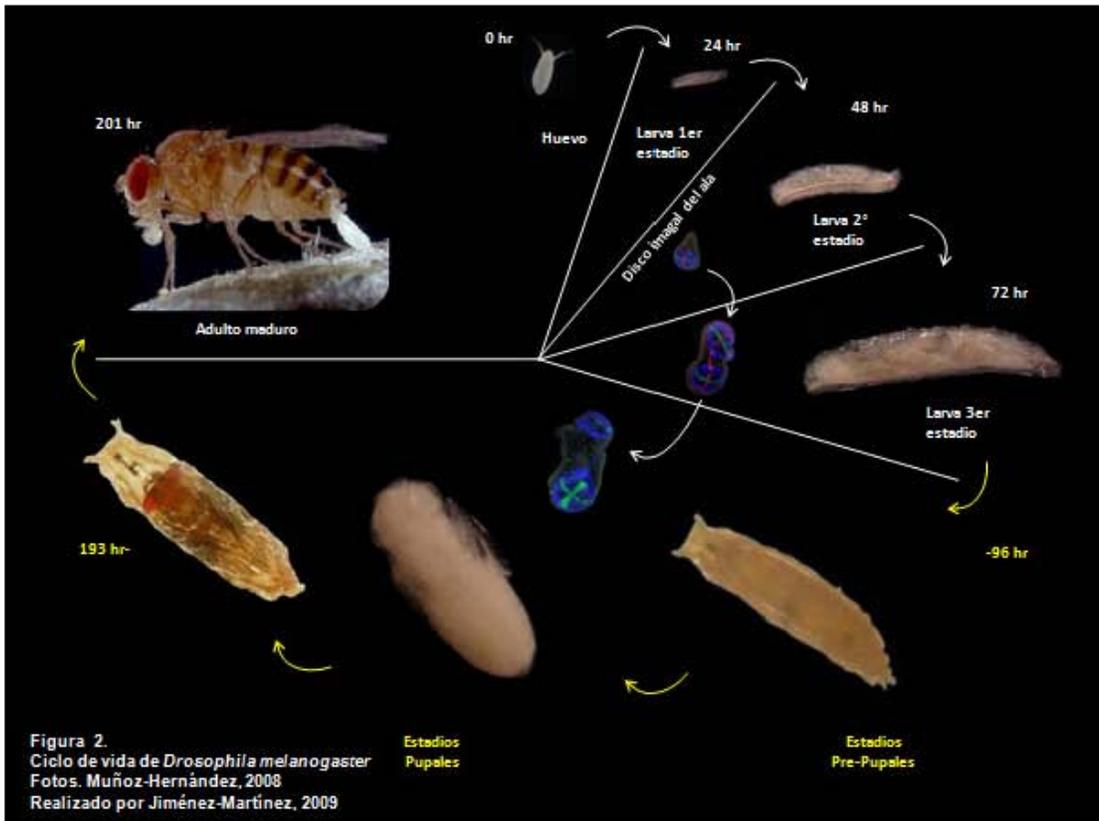


Figura 3. Determinación de los segmentos en el embrión y en la larva de *D. melanogaster* (Tomado de Pierce, 2008).

Cuadro II. Genes que determinan el patrón y simetría anteroposterior corporal durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster* (Pierce, 2008).

Etapa de desarrollo	Descripción de la función de algunos genes	Ejemplos de algunos genes
Establecimiento de los ejes principales del cuerpo	Determinación de los ejes del desarrollo. Además, ciertos genes gobiernan la formación de las regiones terminales (anterior y posterior).	Anterior: bicoid, hunchback, Posterior: nanos, caudal, oskar, Terminal: torso, torsolike. Dorso-ventral: cactus, dorsal, , gürken,
Determinación del número y la polaridad de los segmentos del cuerpo	Subdivisión del embrión en segmentos. Son llamados genes de segmentación, los tres tipos son genes gap, pair rule y genes de polaridad de segmento.	Genes gap: empty spiracles, hunchback, tailless Pair rule: even skipped, hairy, runt Polaridad de segmento: engrailed, hedgehog, wingless,
Establecimiento de la identidad de cada segmento	Identidad de segmentos particulares, son conocidos como genes homeóticos y <i>Drosophila</i> tiene 2 grupos.	Complejo Antenapedia: labial, sex combs reduced, antenapedia Complejo Bitórax: <i>ultrabitórax</i>

El desarrollo postembrionario inicia con la eclosión de la larva. Ésta presenta dos linajes celulares, las células larvales y las células imagales. Las primeras forman el cuerpo de la larva, se caracterizan por perder la capacidad de división (citocinesis) y sólo aumentan su volumen, son poliploides y están determinadas y diferenciadas genéticamente. Las segundas se distinguen porque tienen tamaño pequeño, constitución cromosómica diploide, retienen la capacidad de división (citocinesis), están determinadas genéticamente pero se diferencian hasta que la larva entra a la metamorfosis; estas células se encuentran generalmente en estructuras denominadas discos imagales, los cuales son primordios celulares que incrementan su tamaño al multiplicarse el número de células que los forman mediante divisiones mitóticas que ocurren en momentos particulares durante el desarrollo larvario. Así mismo, se encuentran células que dan origen a otros tejidos del adulto como el abdomen, que se denominan histoblastos (Ramos et al, 1993).

En la última muda larvaria, la cutícula de la larva se endurece y se torna de color beige oscuro formándose el pupario. En general, durante esta etapa la hormona ecdisona desencadena una serie de cambios en el organismo, los cuales involucran la destrucción de ciertos tejidos y órganos larvarios (histólisis) y la organización de las estructuras del adulto generalmente a partir de los discos imagales (Ramos et al, 1993; Atkinson, 1994) (Figura 4). Los órganos completamente histolizados son: glándulas salivales, intestino, cuerpos grasos y la mayoría de los músculos. La mayor parte de los órganos del adulto se forman a partir de los discos imagales ya presentes en la larva o por células larvarias que se diferencian al ocurrir la reorganización del estado pupal; los tubos de Malpighi se alteran poco durante la metamorfosis aunque sí sufren algunos cambios en su composición estructural. El tórax se forma por la combinación de varios discos imagales. Las extremidades locomotoras, los ojos, las antenas, las alas y el aparato genital se diferencian a partir de su disco imagal respectivo, que sufren histogénesis durante el desarrollo pupal dando origen a las distintas partes del cuerpo del adulto. El estado pupal toma de 3 a 5 días y ha sido dividido en estadios prepupales y pupales, las cuales en total suman 15 estadios (Cuadro III). Al término de los días mencionados emerge el adulto (Ramos et al, 1993).

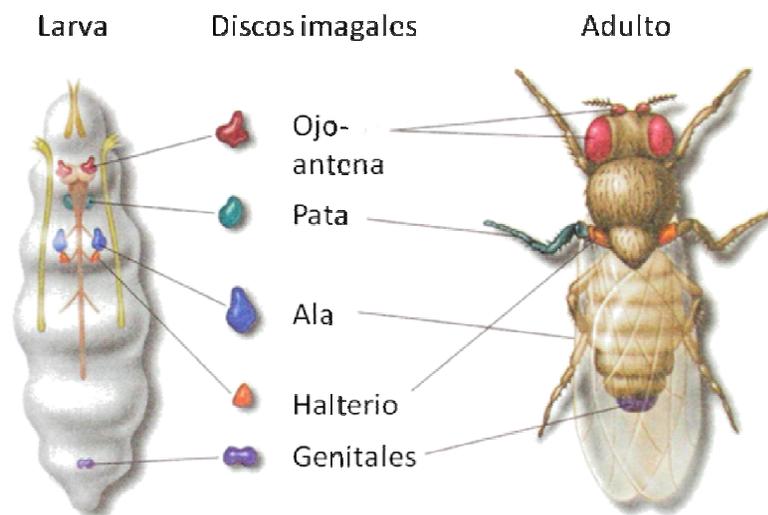


Figura. 4. Discos imagales de la larva de *Drosophila* y las estructuras adultas que derivan de ellos (Tomado de Klug y Spencer, 2006).

Al final del ciclo de vida, el organismo adulto abre el extremo anterior del pupario, por donde sale. Al principio el cuerpo de la mosca es alargado (farato), sin el pigmento característico y tiene las alas plegadas, y durante una hora aproximadamente la mosca inyecta linfa a las alas, cuya superficie, en contacto con el aire se seca. A medida que pasan las horas el adulto adquiere su color característico.

Aproximadamente a las ocho horas después de la eclosión, los organismos alcanzan la madurez sexual (imago) (Ramos et al., 1993).

En conclusión, el modelo biológico *Drosophila melanogaster* ha demostrado tener ventajas a nivel genético, molecular, conductual, fisiológico y finalmente morfológico. Por ello es una herramienta accesible para observar diferentes momentos de su desarrollo. Es un organismo holometábolo, relativamente independiente del factor materno para el desarrollo pupal en comparación con modelos mamíferos (ej. ratas).

Cuadro III. Estadios del desarrollo pupal (metamorfosis) de *D. melanogaster*

Estadio		Tiempo (hrs)*	Descripción
LARVA	L3	72-96	La cutícula es blanquecina y transparente. Su locomoción es por medio de ondas en extensión y contracción.
PREPUPA	P1	96-97	El individuo eierte sus espiráculos y se pone inmóvil. La cutícula del pupario sigue siendo blanca.
	P2	97-100	La pigmentación café del pupario aparentemente inicia en la superficie de la cutícula y procede hacia el interior. Se notan los cordones nerviosos.
	P3	100-106.5	Se puede observar una burbuja en la parte central del pupario.
	P4	106.5-112.5	Inicia la separación de la epidermis del insecto del pupario y comienza la eversión de la cabeza.
PUPA	P5	112.5-126	Las alas y las patas comienzan a diferenciarse.
	P6	126-144	Las alas del insecto se ven despegadas del cuerpo y éste es de coloración más clara.
	P7	144-147	La coloración de la copa de los ojos es amarilla.
	P8	147-157	La coloración de la copa de los ojos llega a ser ámbar.
	P9	157-169	La coloración de la copa de los ojos llega a ser ámbar oscuro.
	P10	169-173	La coloración de la copa de los ojos es roja.
	P11	173-178	Las alas comienzan a colorearse de gris.
	P12	175-178	Los peines sexuales de los machos se diferencian. Las hembras no los presentan y las alas se encuentran mayormente coloreadas de un gris oscuro a negro.
	P13	178-187	Se pueden observar las uñas oscuras de las seis patas.
	P14	187-190	Las cerdas que se encuentran a los lados de la probóscide son evidentes.
P15	190-193	Las patas tienen movimientos vibratorios.	
ADULTO	A1	193-201	Conocido como farato, se caracteriza por ser un insecto en proceso de emersión, tener las alas plegadas y ser un adulto sexualmente inmaduro.
	A2	A partir de 201	Conocido como imago, es caracterizado porque el individuo es un adulto sexualmente maduro.

L3, Larva de tercer estadio; P1-P4, estadios prepupa; P5-P15, estadios de pupa y A1-A2, estadios de adulto. El tiempo inicia a partir de la fecundación del huevo. \* Horas de edad del individuo a  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  (Modificado de Bainbridge-Bownes, 1981; citado en Tyler y Kozlowski, 2003)

En el desarrollo de nuevas metodologías para evaluar daño genético, tanto utilizando a *Drosophila* como a otros organismos, es frecuente recurrir al uso de sustancias conocidas por su capacidad de inducir efectos específicos en el material genético. A estas sustancias se les conoce como mutágenos, carcinógenos o teratógenos dependiendo del blanco en el que ejercen su efecto. Si la actividad genotóxica se adquiere o acentúa como consecuencia del proceso de desintoxicación de las sustancias que ingresan al organismo, entonces se habla de promutágenos, procarcinógenos y proteratógenos. El uso de estas sustancias ha proporcionado información valiosa acerca de las funciones y características de múltiples genes, así como de las estrategias de los organismos que resultan afectados (desintoxicación, reparación y otros) ya que al introducir cambios en la secuencia o marcaje químico del material genético es posible asociar estos cambios con modificaciones en la expresión o la regulación del o los genes implicados.

Promutágeno de referencia: N-dimetilnitrosamina (NDMA)



En la actualidad se produce en los Estados Unidos sólo para su uso en investigación debido a que es un progenotóxico con efectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos (ATSDR, 1989; Gichner et al, 1980; CICAD, 2002; PHG, 2006).

La NDMA se puede formar como resultado de un proceso biológico, químico o fotoquímico. Por ejemplo, las bacterias pueden sintetizar a la NDMA a partir de varias sustancias precursoras, como nitrato, nitrito y aminas. Las fuentes antropogénicas pueden ser principalmente por exposición laboral (industrias) en el procesamiento y preservación de alimentos (ej. carne ahumada) y de bebidas (ej. cerveza) y, como resultado del tratamiento de aguas negras, así como en emisiones de vehículos. También se ha detectado en productos cosméticos (ej. shampoos), y en el humo de cigarro. En este último caso la nicotina sirve como precursor de la NDMA. Aunque, sus enlaces se rompen debido la luz ultravioleta, se puede generar y regenerar de Dimetilamina a NDMA (CICAD, 2002).

La NDMA se ha detectado en la orina de ratones y perros expuestos por inhalación. También se ha detectado en la orina de ratas siguiendo una administración dérmica de una solución de 350 µg de NDMA. Una vez absorbida, la NDMA y sus metabolitos se distribuyen ampliamente y pueden pasar a través de la leche materna a la descendencia. Así mismo, la NDMA y sus metabolitos también pueden ser exhalados como dióxido de carbono (CICAD, 2002).

La conversión metabólica de la NDMA (Figura 5), se lleva a cabo en el hígado e incluye dos pasos que dependen del complejo enzimático P450 –CYP2E1-. El metabolismo depende de la función mixta del sistema oxidasa. A lo largo del paso de hidroxilación, la hidroxilmetilnitrosamina formada se descompone a formaldehído y monometilnitrosamina. Ésta a su vez, es inestable y sufre rearrreglos hacia el ion metildiazonium, que es capaz de alquilar tanto al ADN como al ARN y a las proteínas (ATSDR, 1989; Beranek, 1990). Por la vía de nitrosación puede formarse metilamina y formaldehído (Kroeger-Koepke y Michejda, 1979; ATSDR, 1989; CICAD, 2002).

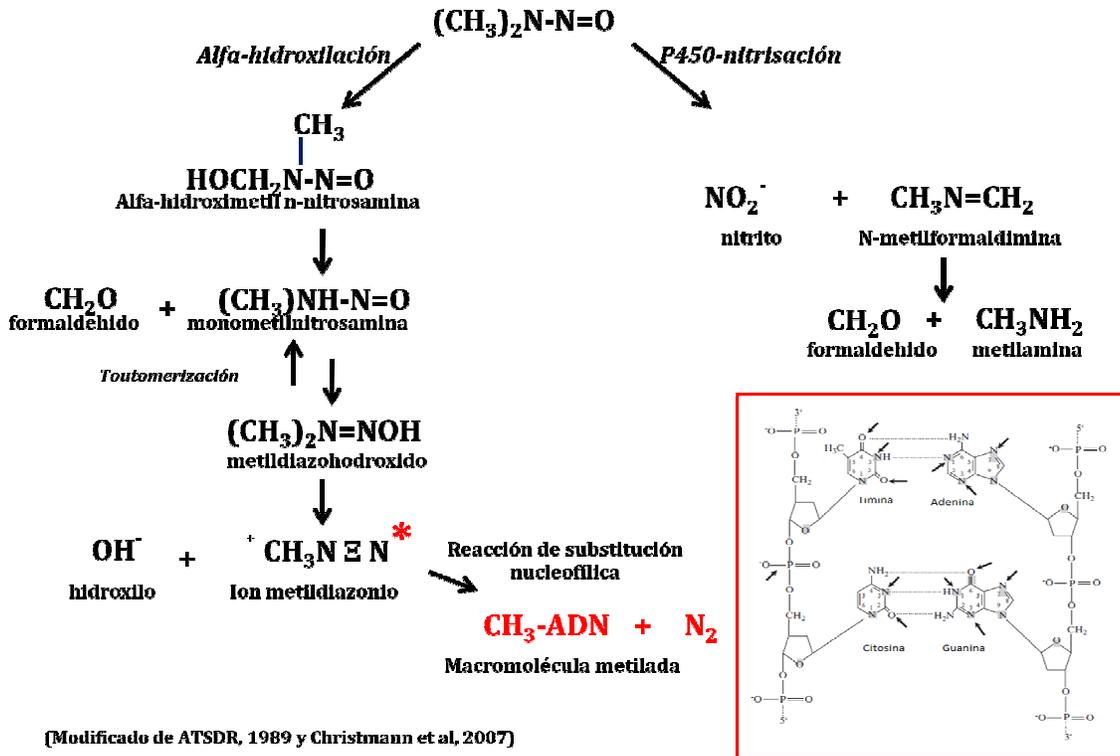
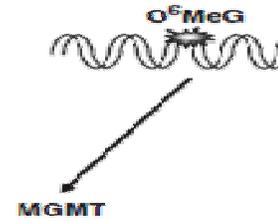


Figura 5. Conversión metabólica de la NDMA en preparaciones de hígado de humano

Los agentes alquilados se forman por la unión covalente de grupos alquilo a sitios nucleofílicos del ADN. La lesión más crítica es O6-metilguanina (O6MeG) que se puede reparar mediante la O6-metilguanina-DNA metiltransferasa (MGMT) (Christmann et al, 2007).

En *Escherichia coli*, la resistencia a los agentes de metilación es mediada por la inducción de cuatro genes, Ada, alkA, alkB y aidB. Ada repara O6MEG, O4-metilimina y metilfosfotriester (Christmann et al, 2007). En *Drosophila* la activación del sistema enzimático dependiente de citocromos P450 puede ser provocada por promutágenos y procarcinógenos como los grupos N-nitroso (Guzmán, 1998), y la MGMT es capaz de remover a O6MEG y O4MET (Tosal et al., 2001). En células de humano, las lesiones en la metilación de O<sup>6</sup> son reparadas en tan sólo una reacción por MGMT (también conocida como ATasa, AGT, AGAT), la cual es el homólogo de mamífero del producto del gen Ada de *E. coli* (Fig. 6) (Christmann et al, 2007).

Fig. 6. Reparación del daño a O6-metilguanina (O6MeG) por la MGMT O6-metilguanina-DNA metiltransferasa (Tomado de Christmann et al, 2007).



En *Drosophila melanogaster*, la NDMA provoca rompimiento del DNA, recombinación en células germinales (Zimmering, 1984; Woodruff et al, 1988), mutación somática y recombinación mitótica en células de las alas (Graf et al, 1984) y de los ojos de la mosca (Vogel, 1988; IARC, 1998); también induce mutaciones letales recesivas ligadas al sexo cuando se administra por alimentación, pero no por inyección, lo que confirma su actividad como promutágeno (Zimmering, 1984). Sus amplios efectos en la mosca así como en muchos otros organismos apoyan el uso de la NDMA como un promutágeno probado (grupo 2A según la IARC, 1998).

En los organismos no expuestos a genotóxicos, el desarrollo de la cabeza antecede a la formación del tórax y el abdomen (Alberts, 1994; Gilbert, 2005). En tratamientos previos en los que larvas de *Drosophila* han sido alimentadas crónicamente con concentraciones bajas de NDMA se han registrado individuos que mueren durante la metamorfosis (Ramos et al, 2006). En algunas pupas no se aprecia la región cefálica, pero sí se distinguen estructuras pertenecientes a las regiones torácicas y abdominal, respectivamente (Ramos et al, 2006). En organismos expuestos a la NDMA, la presencia de pupas en las que no se observa la región cefálica podría tener dos explicaciones tentativas:

- 1) En la metamorfosis, la región cefálica se diferencia hasta cierta etapa del desarrollo y posteriormente sufre reversión.
- 2) En la metamorfosis, la región cefálica no inicia su desarrollo y la formación del cuerpo del adulto ocurre a partir del tórax.

## II. JUSTIFICACIÓN

En la población humana, cerca del 3% de los defectos en la progenie han sido atribuidos a la exposición materna a agentes químicos y físicos, de éstos, el 25% se asocian a causas multifactoriales como: la forma e intensidad de la exposición, predisposición genética, otros factores ambientales, infecciones, deficiencias y excesos nutricionales, hipertermia, radiación UV, rayos X y químicos tanto naturales como manufacturados que interfieren con la diferenciación de tejidos directamente relacionados con el desarrollo neurológico. Esto se ha observado en patologías como la anencefalia, hidrocefalia o encefalocele, que frecuentemente se relacionan con la exposición a factores ambientales como los solventes orgánicos, fertilizantes y metales pesados como el mercurio, entre otros (Faustman, 2000; CONAVE, 2005; Klaassen y Watkins, 2005; González-Rivera, et al; 2008; Mancebo et al., 2008).

El efecto de factores peligrosos en el desarrollo ha sido poco estudiado; específicamente observar directamente el avance de estos con métodos no invasivos puede ser de gran utilidad para establecer la forma en la que algunos factores interfieren con el desarrollo. Este trabajo se realizó como una estrategia metodológica para establecer el tiempo en el que la NDMA interfiere con el desarrollo pupal (postembrionario) y determinar si la región cefálica se forma y posteriormente revierte o bien, si la cabeza no se desarrolla, pero el resto del organismo sí.

Hipótesis:

La NDMA afecta el desarrollo regular de *Drosophila melanogaster* durante la pupación, en particular revirtiendo el desarrollo de la región cefálica de los organismos expuestos.

Objetivo general:

Documentar el momento (etapa) en la pupación de *D. melanogaster* en el que se aprecia evidencia visual de la alteración de la región cefálica de los organismos expuestos al promutágeno de referencia (NDMA).

Objetivos particulares:

Establecer un protocolo *in vivo* para identificar alteraciones morfológicas durante el desarrollo pupal de *D. melanogaster*.

Identificar la fase pupal en la que se presentan alteraciones, de acuerdo al desarrollo regular de *D. melanogaster*, en organismos expuestos a la NDMA.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

Compuesto.

Se utilizó el promutágeno de referencia N-dimetilnitrosamina (NDMA) CAS: 62-75-9 (Sigma-Aldrich, 2002. Toluca, México).

Obtención del material biológico.

La línea de moscas silvestres Canton-S (CS), se sincronizó por  $\pm 2$  hrs con el objeto de obtener un desarrollo morfogenético homogéneo. Las larvas eclosionadas obtenidas de los huevos colectados se crecieron hasta el tercer estadio larvario en frascos de 0.25 L. de capacidad con medio fresco, el cual se elabora con: agar (1.86%), harina de maíz (19.7%), azúcar (25.21%), levadura de cerveza desamargada (13.53%) y agua (39.67%) (Ramos et al., 1993).

Las larvas así obtenidas fueron extraídas por el método de Nöthinger (1970), con la ayuda de una espátula. Se transfirieron en números reducidos (10 a 30 larvas aprox.) a tubos homeopáticos de 15 ml de capacidad que contenían 1 gr. de medio/alimento instantáneo para *Drosophila* (Carolina Biological Supply Company, Fórmula 4-24) y 5 mL de la dilución a probar o agua desionizada.

Diseño experimental.

Como disolvente y testigo negativo se utilizó agua desionizada. Se prepararon diluciones sucesivas de 2.5, 0.833, 0.625, 0.4688, 0.3125, 0.234, 0.078 y 0.039 mM de la NDMA, a partir de la concentración máxima letal (5 mM) reportada por Ramos et al (2006).

Las larvas se expusieron durante 48 horas al compuesto (exposición subcrónica). Al avanzar en su desarrollo las larvas migran hacia una superficie menos húmeda, (parte superior del tubo). Una vez inmóviles, cada individuo fue identificado con un número en la pared externa del tubo. A partir de este día se observó el aspecto de la pupa para determinar, con base en Bainbridges y Bownes (1981) (Anexo 3) el estado de desarrollo pupal en el que se encontraba. El registro se realizó hasta que emergieron todos los adultos o hasta seis días a partir de la formación de la pupa. Los adultos recobrados se sacrificaron por sobre-eterización, se fijaron en alcohol (70 %) y se revisó la morfología de cada mosca.

Además, se llevó a cabo un registro fotográfico de algunos de los fenotipos en los organismos afectados, así como la documentación gráfica de los estadios prepupales y pupales de acuerdo a Bainbridges y Bownes (1981).

Para cada concentración se utilizaron cuatro tubos y el experimento completo se realizó por triplicado.

Una vez que se obtuvo el registro se procesaron los datos y se determinó:

- i) la frecuencia promedio de alteraciones (PPA) en los organismos expuestos comparada con la de las moscas testigo,
- ii) la sobrevivencia (IS) de las moscas de las series experimentales comparada con la testigo,
- iii) la proporción de organismos adultos (PA2),
- iv) la proporción del estadio pupal (PEP) y
- v) la viabilidad de larvas (L3) a pupas (P1-P5-P15) a adultos(A2)

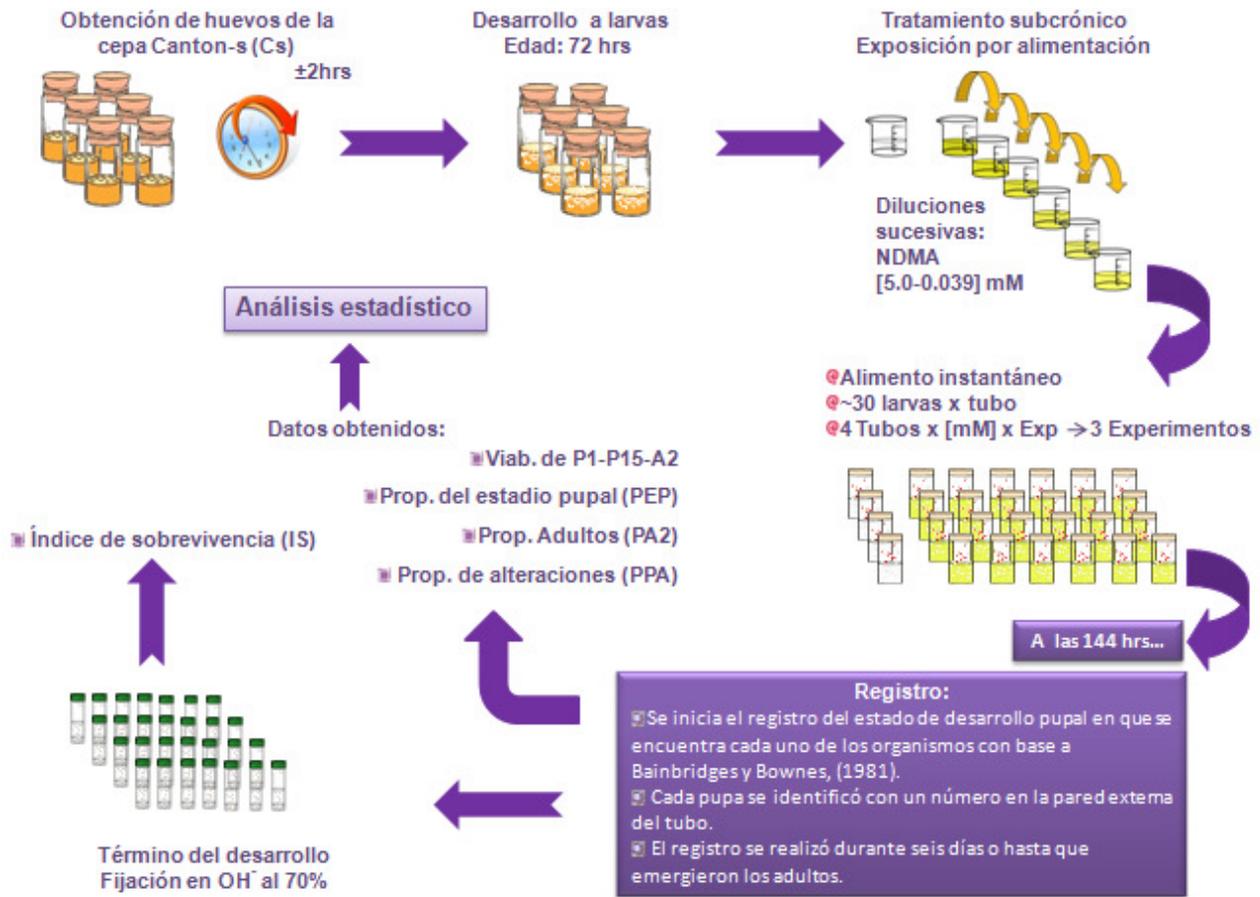


Figura 7. Diseño experimental utilizado para el estudio de la metamorfosis de *Drosophila melanogaster* en larvas expuestas a la N-dimetilnitrosamina (NDMA).

Análisis de resultados.

Proporción promedio de alteraciones (PPA)

Para determinar si las alteraciones son provocadas por la NDMA en el desarrollo pupal de *Drosophila melanogaster*, según el área afectada de las pupas: cabeza (SC), tórax (ST), abdomen (SA) y patas (SP), se comparó la frecuencia obtenida de cada tipo en el lote testigo y en cada lote experimental. Para ello se promediaron las frecuencias de los tres experimentos por tipo de alteración (tabla I). Por otro lado, para obtener la frecuencia total de alteraciones, se sumó el número de alteraciones de los tres experimentos (Fig. 10).

Sobrevivencia (IS)

Para evaluar la toxicidad de la NDMA se obtuvo el índice de sobrevivencia (IS), mediante la relación del número de adultos del lote experimental entre el número de adultos del lote testigo de cada serie para los tres tratamientos y por cada experimento (Arellano, 2002) y se sumaron los adultos recobrados en los tres experimentos para aumentar el tamaño de muestra. Se obtuvo la sobrevivencia promedio ( $\pm$  ee) con base en los tres experimentos (Fig.11).

Índice de sobrevivencia = Suma de organismos A2 del lote experimental / suma de adultos del lote testigo

(Arellano, 2002)

Proporción de organismos adultos de fase 2 (POA2).

Para establecer si el tiempo del desarrollo regular de *Drosophila melanogaster* fue afectado por las diferentes concentraciones de NDMA, se determinó la POA2 desde las 144 horas hasta las 240 hrs (Fig. 13).

Proporción del estadio pupal (PEP: Tablas II a VII y Figuras 13 a 18).

Para determinar si el desarrollo pupal regular de *Drosophila melanogaster* fue modificado por las concentraciones de la NDMA se obtuvo la proporción de individuos que se encontraba en cada una de las fases L3 a A2 a partir de las 144 horas de edad con base en la siguiente fórmula:

Proporción del estadio pupal (PEP) = Número de organismos por fase pupal / Total de los organismos

Viabilidad de larvas (L3)-pupas (P1-P15)-Adultos(A2)

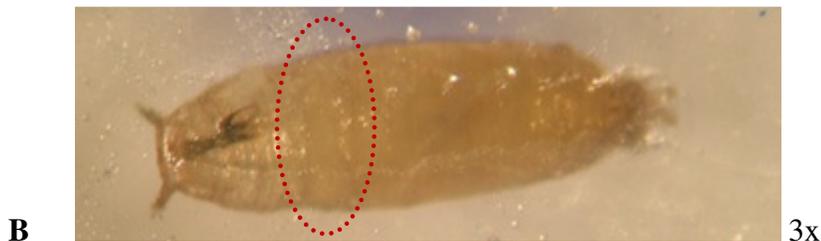
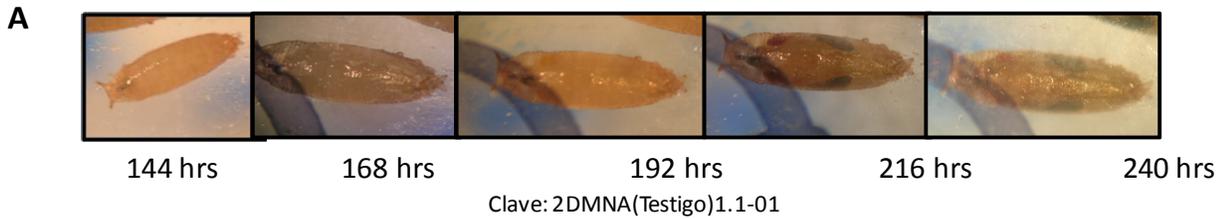
Para establecer la viabilidad larva-pupa-adulto, se obtuvo la proporción de organismos de acuerdo al total de organismos que fueron sometidos al tratamiento a las 264 horas de edad de los organismos.

La paquetería utilizada para los estadísticos calculados fueron GraphPad Prism4 y Excel

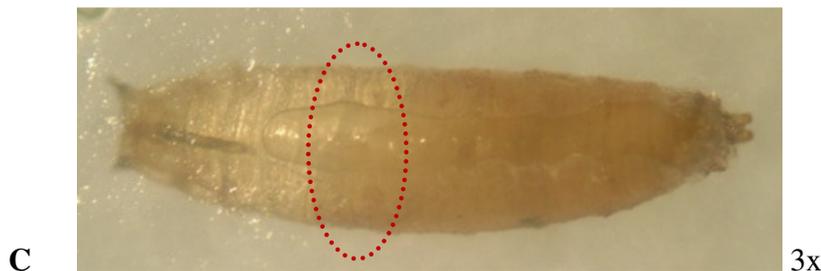
#### IV. RESULTADOS

Se utilizó la secuencia de estadios pupales de referencia (Cuadro III y Anexo 3) en comparación con organismos experimentales porque en nuestra experiencia, el material experimental fue reproducible. Sin embargo, para minimizar diferencias que pudieran estar asociadas a las condiciones ambientales o a la posible variación estacional, el desarrollo de los organismos expuestos a la NDMA fue comparada con el desarrollo de moscas testigo que fueron tratadas igual que las expuestas a la NDMA.

A continuación, en la figura 8 se ejemplifica de manera secuencial el desarrollo de un organismo del lote testigo (A) y dos organismos de lotes experimentales en los que se muestra el aspecto de la región cefálica en diferentes tiempos de desarrollo (B y C). En éstas se muestra que el organismo desarrolla la región anterior, correspondiente a la cabeza pero luego se observa la reversión del tejido cefálico.



Clave: 2NDMA (5mM) 1.1-11-216 hrs



Clave: 2NDMA (5mM) 1.1-2-168 hrs

Figura 8. Secuencia del desarrollo pupal de moscas testigo y ejemplos de algunas de las alteraciones de pupas inducidas con la NDMA. Clave: 2NDMA: experimento número 2; (5mM): concentración, 1.1: número de repetición; 2: número de organismo. En el círculo en rojo se señala la zona que corresponde a la zona que corresponde a la región cefálica en los respectivos lotes experimentales.

El registro morfológico de las moscas tratadas con diferentes concentraciones de NDMA mostró que el tratamiento afectó también a las regiones torácicas y abdominales de los organismos, así como a los apéndices asociados a éstas. La tabla I y figura 9 muestran la proporción promedio de dichas estructuras en las siguientes categorías: Sin cabeza (SC), sin tórax (ST), sin abdomen (SA) y sin patas (SP). Se estimó el promedio total a partir del número de moscas que presentaron alguna de las alteraciones mencionadas, para saber si las diferentes concentraciones de NDMA tuvieron algún efecto sobre las estructuras de las moscas en el desarrollo. Para la categoría de SC y ST, los lotes que presentaron alteraciones fueron 0.4688, 0.625, 2.5 y 5 mM. En la categoría de SA los lotes 0.234, 0.4688, 0.625, 2.5, 0.83 y 5 mM presentaron la mayor proporción. Finalmente, para la categoría SP, los lotes que presentaron la mayor proporción de alteraciones fueron 0.4688, 0.625, 2.5, 0.83 y 5 mM.

En general, las proporciones más altas observadas para tres (SC, ST, SA) de las cuatro categorías se encontraron en el lote experimental de 5 mM con 0.177, 0.131 y 0.118 respectivamente, mientras que para la última categoría (SP) la proporción promedio de 0.198 correspondió al lote de 2.5 mM, siendo esta la mayor proporción de organismos con ausencia de patas. Se encontraron diferencias significativas en todas las categorías en las concentraciones de 2.5 y 5 mM, además, en la categoría de SP es significativa para la concentración de 0.83 mM; además en la categoría SP, es significativa la diferencia, para la concentración de 0.83 mM. Así mismo en la suma total de las proporciones (Fig. 10), a partir de la concentración de 0.4688 mM hasta la de 5 mM, existen diferencias significativas (Kastenbaum - Bowman;  $p < 0.05$ ).

Tabla I. Proporción promedio por categoría y total de organismos que presentaron alteraciones.

[mM]	n	SC	Prop./*	ST	Prop./*	SA	Prop./*	SP	Prop./*	Σ Total	Prop./*
Test	128	0	--	0	--	0	--	0	--	0	--
0.039	152	0	--	0	--	0	--	0	--	0	--
0.078	145	0	--	0	--	0	--	0	--	0	--
0.234	184	0	--	0	--	1	0.007(1) -	0	--	1	0.005(1) -
0.3125	147	0	--	0	--	0	--	0	--	0	--
0.4688	119	4	0.056(4) -	2	0.028(2) -	2	0.028(2) -	1	0.014(1) -	9	0.076(9) +
0.625	155	4	0.028(4) -	1	0.008(4) -	2	0.014(2) -	3	0.02(3) -	10	0.065(10) +
0.83	164	0	--	0	--	1	0.007(1) -	7	0.044(7) +	8	0.049(8) +
2.5	138	5	0.066(5) +	8	0.113(8) +	8	0.113(8) +	29	0.198(29) +	50	0.362(50) +
5	98	17	0.177(17) +	13	0.131(13) +	12	0.118(12) +	5	0.054(5) +	47	0.48(47) +

NDMA [mM]: N-nitrosodimetilamina, n: número de moscas adultos, SC: número de moscas para la categoría Sin cabeza, ST: sin tórax, SA: sin abdomen, SP: sin patas. Análisis estadístico de acuerdo a \*Kastenbaum - Bowman;  $p < 0.05$ .

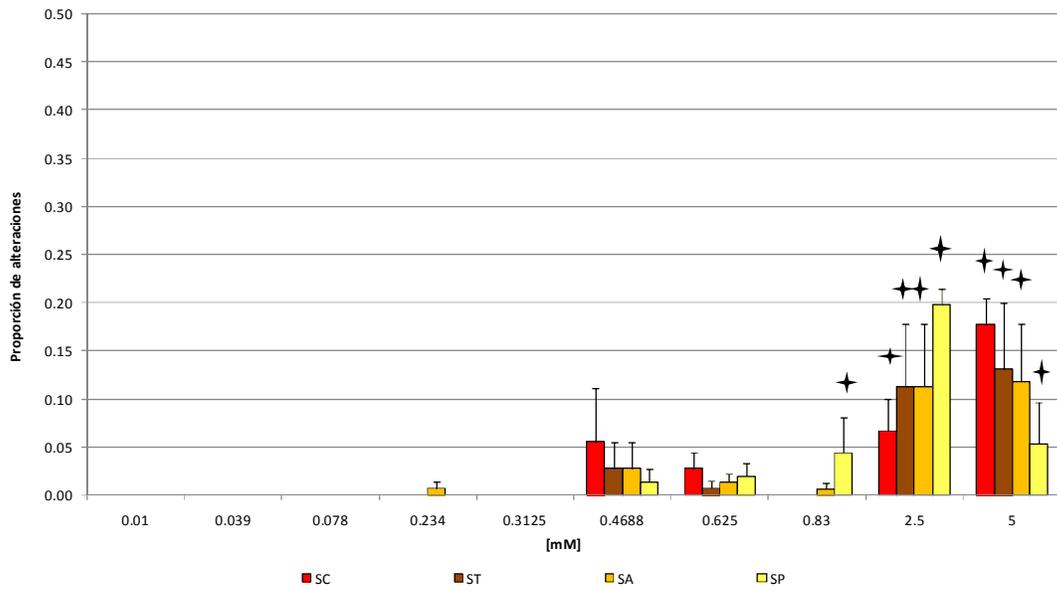


Figura 9. Proporción promedio de organismos con alteraciones (PPA). SC; sin cabeza, ST; sin tórax, SA; sin abdomen, SP; sin patas  $\pm$  error estándar.

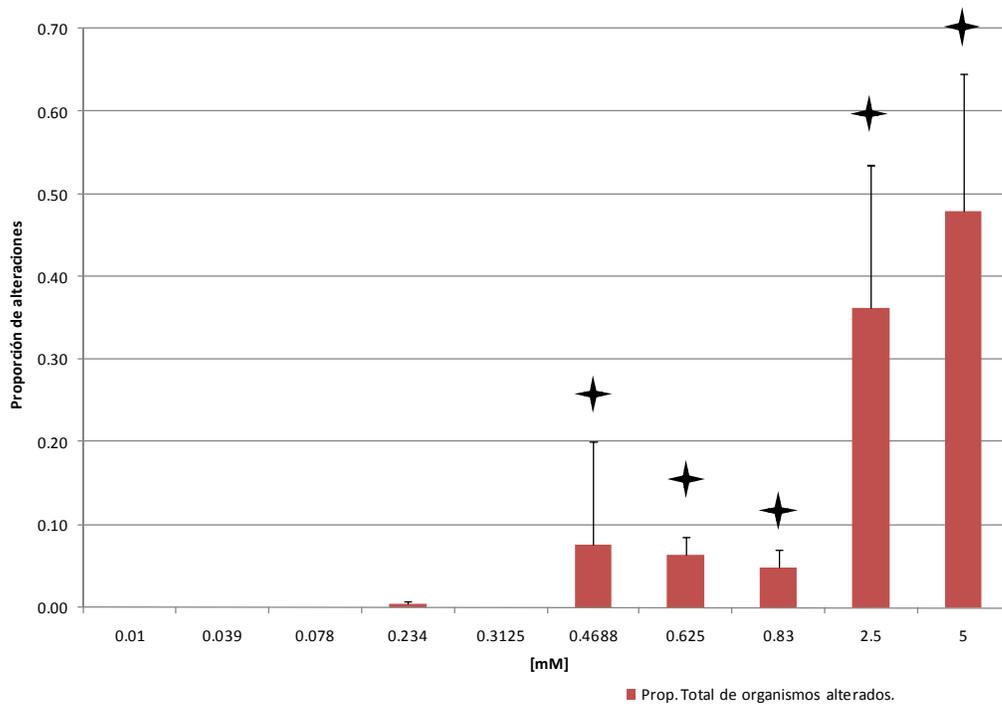


Figura 10. Proporción total de alteraciones  $\pm$  error estándar.

En la figura 11, se muestra que la relación entre la sobrevivencia (toxicidad) y las alteraciones es inversamente proporcional, ya que desde 0.039 a 0.3125 no existen alteraciones, mientras que a partir de 0.468 mM la sobrevivencia fue menor y se incrementó la aparición de alteraciones, por lo que 2.5 y 5mM son las dos concentraciones con menor sobrevivencia y mayor proporción de alteraciones.

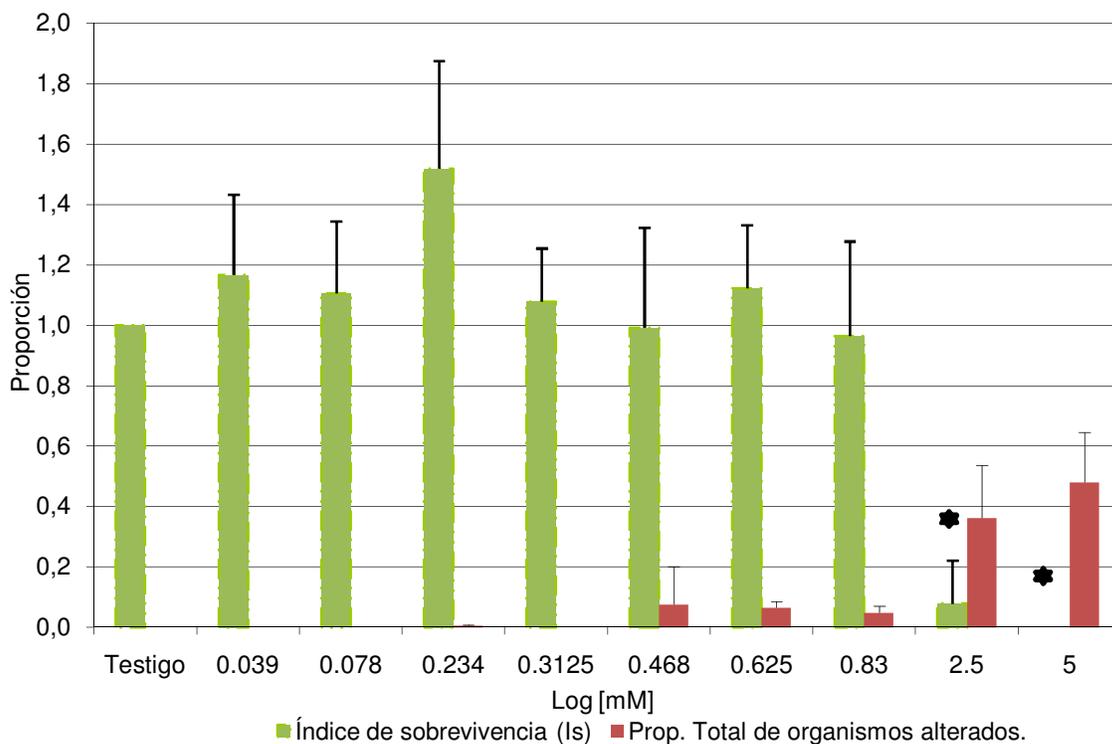


Figura 11. Comparación entre la proporción total de organismos con alteraciones respecto a la sobrevivencia (IS) de organismos tratados con la NDMA (ANOVA;  $p < 0.05$ ).

En la figura 12, se muestra de manera cronológica (desde las 144 horas hasta las 264 h de edad) la proporción de organismos que llegaron a la última fase (A2).

A partir de las 192 h de edad, se encontraron organismos adultos en las concentraciones de 0.039 y 0.04688 a 0.83 mM. A las 216 h, se recuperaron organismos adultos en el lote testigo, así como en los lotes experimentales de 0.039 a 0.83 mM y en una mayor proporción en las dos concentraciones más bajas (0.039 y 0.78 mM), respecto al testigo.

A las 240 h, la proporción de adultos del lote testigo y de los lotes experimentales de 0.039 a 2.5 mM se incrementan. Para las 264 h, el lote testigo y los lotes experimentales de 0.039 a 0.83 mM tienen la máxima proporción de organismos adultos, con la excepción de la concentración de 2.5 mM en donde la proporción de individuos permanece sin cambio (0.022). En la concentración más alta (5 mM), se denota la ausencia de organismos en A2 en cualquier lapso. En esta concentración se observa la inhibición en el desarrollo ya que no se recobran organismos desde P7 hasta P13. En P14 se recobra menor proporción de organismos y nuevamente el efecto de inhibición se hace evidente hasta A2.

También a partir de las 192 h, las dos concentraciones más bajas (0.039 y 0.078 mM) y las tres más altas (0.83, 2.5 y 5 mM) presentan diferencias estadísticas en tiempos diferentes (prueba de dos colas  $\alpha/2=0.025$ ).

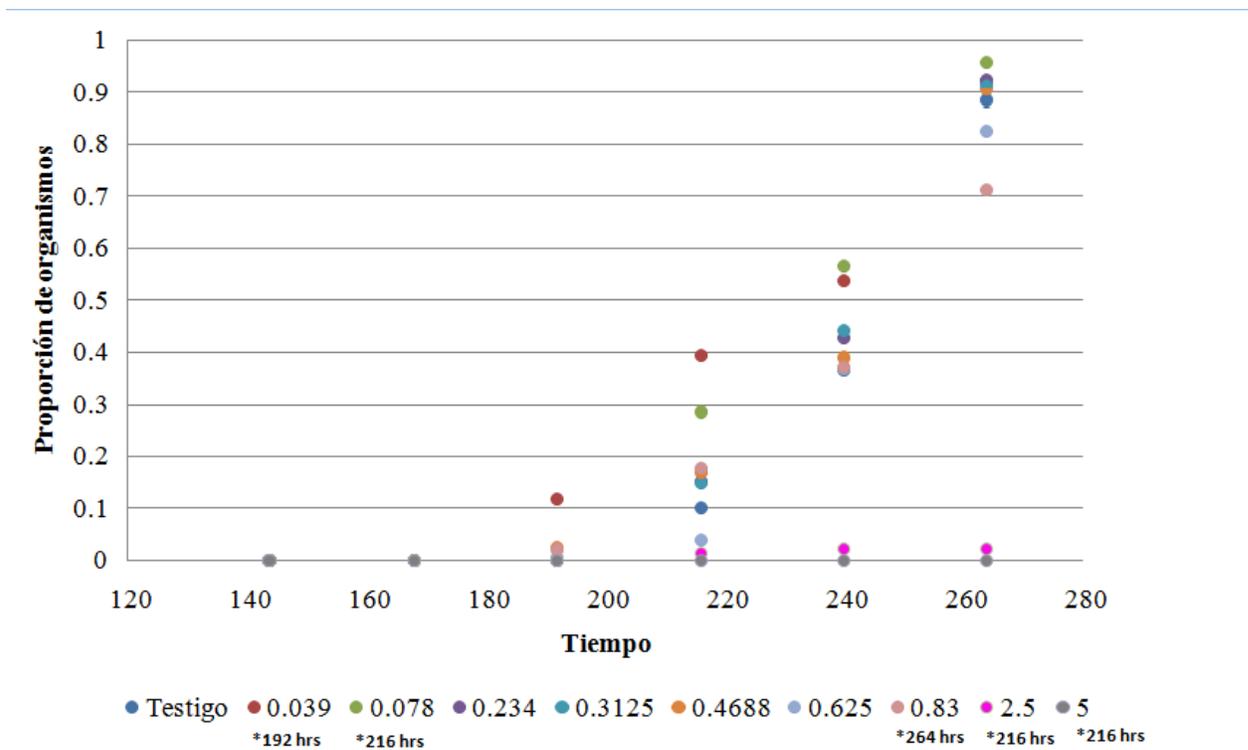


Figura 12. Proporción de organismos que alcanzan la fase de Adulto (A2), a lo largo del tiempo (prueba de dos colas  $\alpha/2=0.025$ ).

En la tabla II y en la figura 13 se muestran las distribuciones de las fases de desarrollo a 144 h de edad de los organismos. En el lote testigo, la mayor proporción de organismos se ubicó en la fase P4 (0.328) aunque algunos ya habían alcanzado la fase P7 (0.055). En los lotes testigo y experimentales, se registraron también algunos organismos en fase larvaria (L3), siendo las concentraciones de 5 y 2.5 mM en las que se obtuvo la mayor proporción en esta etapa. Los organismos expuestos a la NDMA en los lotes experimentales de 0.039 a 0.83 mM mostraron mayor avance en el desarrollo que los organismos del lote testigo (P6). La distribución de las fases pupales mostró mayor dispersión en las series experimentales, con excepción de las dos últimas (2.5 y 5 mM), en las que además se retrasó el desarrollo (L3).

A las 168 h de edad (Tabla III-Fig. 14), se observó la presencia de larvas en todos los lotes. En los organismos testigo, la fase de desarrollo predominante fue la P6 (0.414), aunque algunos alcanzaron la P10 (0.008). En los lotes experimentales 0.039 y 0.234 – 0.83 mM, el desarrollo predominante fue P6, como en el lote testigo. En el lote de 0.078 mM el desarrollo fue menor (P5) y el mayor retraso (L3) se localizó en las dos concentraciones mayores.

A las 192 h de edad (Tabla IV- Fig. 15), con excepción del lote 0.078 mM se encontraron larvas. En el lote testigo la mayor proporción de organismos se vuelve a encontrar en la P6, al igual que para los lotes experimentales 0.039, 0.468 y 0.83 mM. Así mismo, los lotes experimentales 0.078 - 0.3125 y 0.625 mM se muestran en una fase desarrollo equivalente a P5. Los organismos del lote experimental de 2.5 mM alcanzaron la fase P4 pero a la concentración más alta (5 mM) se mantiene el arresto en L3. En los lotes experimentales 0.039, 0.468-0.83 mM algunos organismos ya son adultos; no así para el lote testigo en donde la fase de desarrollo más avanzada se encuentra en la P15. En general, en la distribución de las fases pupales de organismos tratados se recobran proporciones asociadas a mayor grado de desarrollo.

En el testigo para las 216 horas (Tabla V- Fig. 16), la mayor proporción de individuos se encuentra en la P10 y algunos de los organismos llegaron a A2 (0.102); para los lotes

experimentales 0.039 y 0.078 mM la mayoría de los individuos se encuentra en la fase A2. En los lotes experimentales 0.234, 0.312, 0.625 y 0.83 mM, la mayor proporción de organismos se encuentra adelantada en la P14; mientras que en el lote experimental de 0.468 mM se encuentra atrasada en la P9, respecto al testigo. En 2.5 mM la mayor proporción de organismos se ubican en las fases P4 y P5, mientras que los tratados con 5 mM, se mantienen en L3.

240 horas después del tratamiento (Tabla VI- Fig. 17), el desarrollo de los organismos del lote testigo y los experimentales continúa, encontrándose la mayoría en la fase A2; aunque algunos lotes como 0.234 y 0.468 se encuentran aún en la fase P14. En las concentraciones más altas (2.5 y 5 mM), se recobró la mayor proporción de organismos en P5 y L3, respectivamente.

A las 264 horas de edad de los organismos (Tabla VII- Fig. 18), el desarrollo predominante del lote testigo y los lotes experimentales 0.039 – 0.83 mM se ubica en la fase A2. Los lotes 2.5 y 5 mM permanecieron en P5 y L3.

En general, a partir de las 216 h (Tabla V) la distribución de las proporciones se encuentran principalmente ubicadas hacia el lado derecho de las tablas.



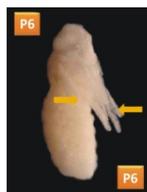


Tabla IV. Distribución de las fases pupales para las 192 horas de edad de los organismos.

[mM]	n	L3	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	A1	A2
Testigo	128	0.094	0.008				0.070	0.344	0.086	0.148	0.180	0.039	0.008	0.008		0.008	0.008		
0.039	152	0.053					0.033	0.230	0.072	0.112	0.099	0.039	0.020	0.013		0.204	0.007		0.118
0.078	145		0.007			0.007	0.200	0.138	0.076	0.083	0.172	0.110	0.034	0.028	0.014	0.131			
0.234	184	0.016	0.005		0.005	0.016	0.196	0.098	0.103	0.228	0.190	0.060	0.005	0.011		0.065			
0.3125	147	0.095					0.231	0.177	0.075	0.136	0.122	0.061	0.020	0.014		0.061	0.007		
0.4688	119	0.008					0.227	0.269	0.168	0.151	0.050	0.017	0.034		0.008	0.042			0.025
0.625	155	0.052			0.006	0.013	0.284	0.187	0.103	0.155	0.065	0.019				0.110			0.006
0.83	164	0.085			0.006	0.018	0.146	0.274	0.073	0.085	0.116	0.024	0.024	0.006		0.116	0.006		0.018
2.5	138	0.094	0.029		0.080	0.261	0.254	0.196	0.036	0.014	0.014	0.007				0.014			
5	98	0.480	0.071	0.020	0.061	0.173	0.082	0.092			0.010					0.010			



Tabla V. Distribución de las fases pupales para las 216 horas de edad de los organismos.

[mM]	n	L3	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	A1	A2
Testigo	128	0.094	0.008				0.008			0.016	0.039	0.234	0.148	0.063	0.047	0.219	0.023		0.102
0.039	152	0.046					0.007		0.033		0.151	0.105	0.066	0.039	0.007	0.132	0.007	0.013	0.395
0.078	145		0.007			0.007	0.021	0.014	0.028	0.055	0.172	0.110	0.041	0.062	0.007	0.193			0.283
0.234	184	0.005	0.005		0.005		0.005	0.005	0.038	0.049	0.147	0.130	0.065	0.125	0.005	0.250	0.011		0.152
0.3125	147	0.082					0.007		0.061	0.054	0.177	0.150	0.020	0.082		0.184	0.034		0.150
0.4688	119	0.008					0.008	0.034	0.059	0.050	0.202	0.160	0.042	0.067	0.008	0.185		0.008	0.168
0.625	155	0.045			0.006		0.032	0.052	0.052	0.039	0.252	0.103	0.019	0.039	0.006	0.284	0.032		0.039
0.83	164	0.085			0.006	0.018	0.012	0.030	0.085	0.104	0.134	0.037	0.030	0.018	0.012	0.244	0.006		0.177
2.5	138	0.065	0.014		0.022	0.319	0.319	0.043	0.080	0.029	0.007	0.014	0.014	0.022		0.029	0.007		0.014
5	98	0.347	0.051	0.010	0.092	0.306	0.071	0.082	0.010			0.010				0.020			

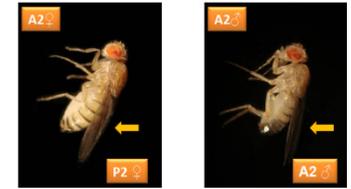


Tabla VI. Distribución de las fases pupales para las 240 horas de edad de los organismos.

[mM]	n	L3	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	A1	A2
Testigo	128	0.094	0.008				0.008							0.070	0.016	0.367	0.070		0.367
0.039	152	0.046					0.007				0.013	0.007	0.007	0.033	0.007	0.158	0.184		0.539
0.078	145		0.007			0.007			0.007		0.007	0.014	0.048	0.021		0.324			0.566
0.234	184	0.005	0.005				0.000	0.005		0.005		0.005	0.005	0.016		0.478	0.043		0.429
0.3125	147	0.075					0.007		0.007					0.041	0.014	0.381	0.034		0.442
0.4688	119	0.008					0.000	0.034		0.008			0.017	0.034	0.008	0.471	0.025	0.008	0.387
0.625	155	0.045			0.006		0.013	0.013		0.006	0.019		0.045	0.071	0.006	0.310	0.084	0.013	0.368
0.83	164	0.079			0.006	0.012	0.024	0.012	0.006		0.006		0.024	0.091	0.024	0.226	0.098	0.018	0.372
2.5	138	0.058	0.014		0.007	0.246	0.333	0.029	0.022	0.051	0.014	0.022	0.072	0.029		0.058	0.022		0.022
5	98	0.347	0.051	0.010	0.112	0.235	0.133	0.071								0.041			

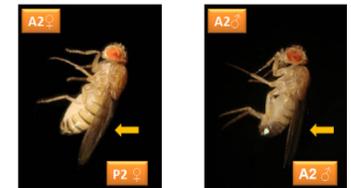


Tabla VII. Distribución de las fases pupales para las 264 horas de edad de los organismos.

[mM]	n	L3	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	A1	A2
Testigo	128	0.094	0.008				0.008											0.008	0.883
0.039	152	0.046					0.007				0.007			0.007		0.007		0.007	0.921
0.078	145		0.007											0.007		0.007	0.021		0.959
0.234	184	0.005	0.005					0.005								0.033	0.027		0.924
0.3125	147	0.075					0.007										0.007		0.912
0.4688	119	0.008						0.025								0.025	0.025	0.008	0.908
0.625	155	0.045			0.006		0.013				0.006					0.026	0.052	0.026	0.826
0.83	164	0.079			0.006	0.006	0.018	0.006					0.006			0.067	0.061	0.037	0.713
2.5	138	0.058	0.014		0.007	0.239	0.341	0.029	0.022	0.051	0.014	0.022	0.072	0.029		0.051	0.022	0.007	0.022
5	98	0.347	0.051	0.010	0.112	0.235	0.133	0.071								0.041			

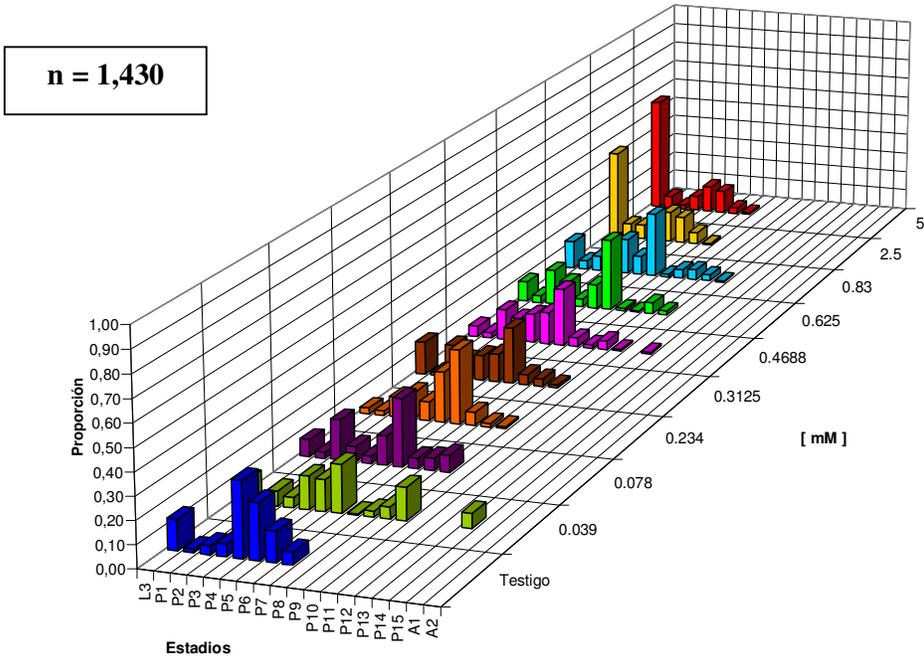


Figura 13. Proporción de larvas (L3), pupas (P1-P15) y adultos (A1-A2), 144 hrs de edad de los organismos.

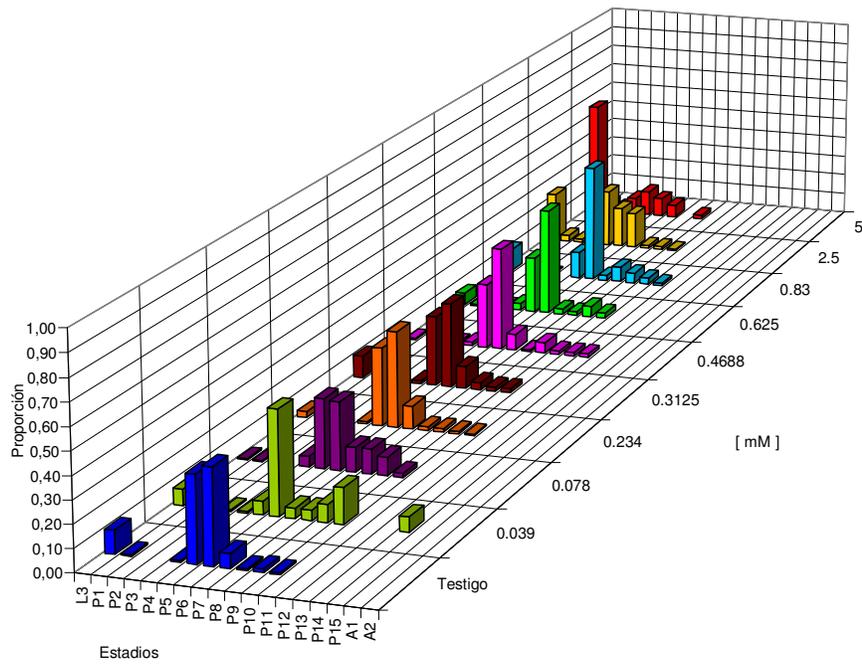


Figura 14. Proporción de larvas (L3), pupas (P1-P15) y adultos (A1-A2), 168 hrs de edad de los organismos.

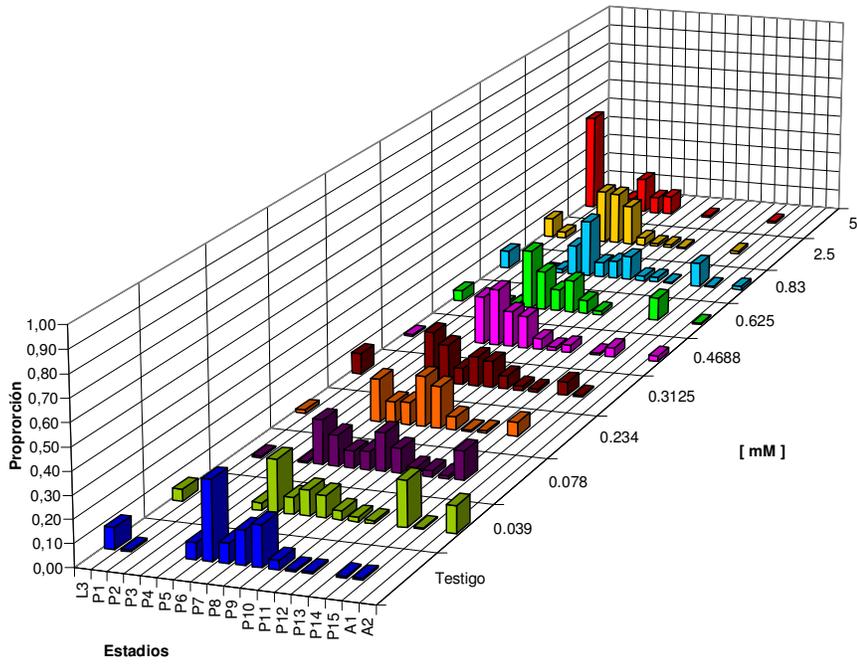


Figura 15. Proporción de larvas (L3), pupas (P1-P15) y adultos (A1-A2), 192 hrs de edad de los organismos.

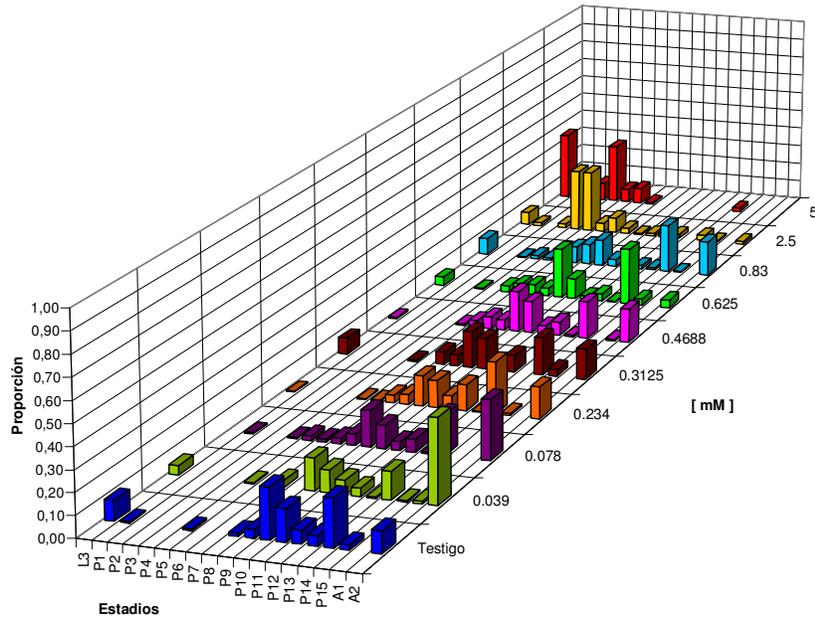


Figura 16. Proporción de larvas (L3), pupas (P1-P15) y adultos (A1-A2), 216 hrs de edad de los organismos

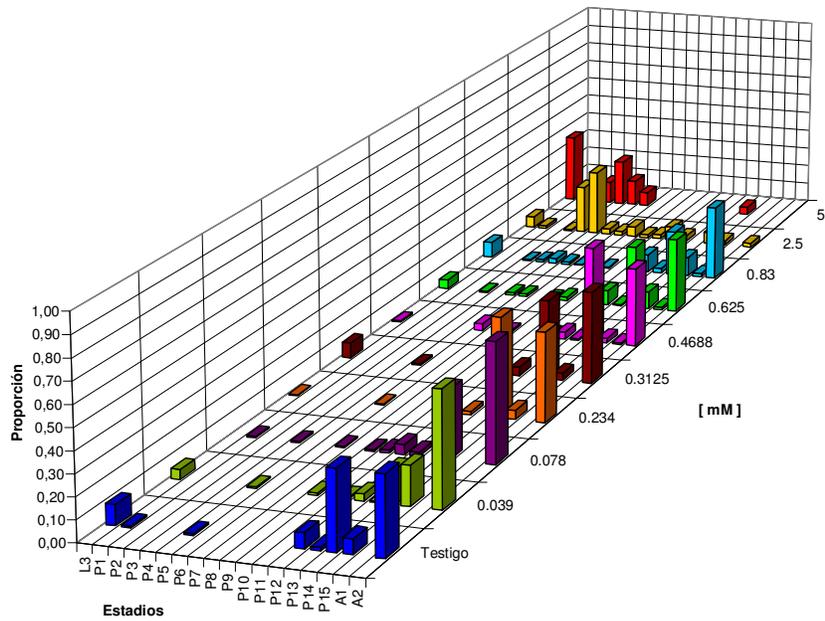


Figura 17. Proporción de larvas (L3), pupas (P1-P15) y adultos (A1-A2), 240 hrs de edad de los organismos.

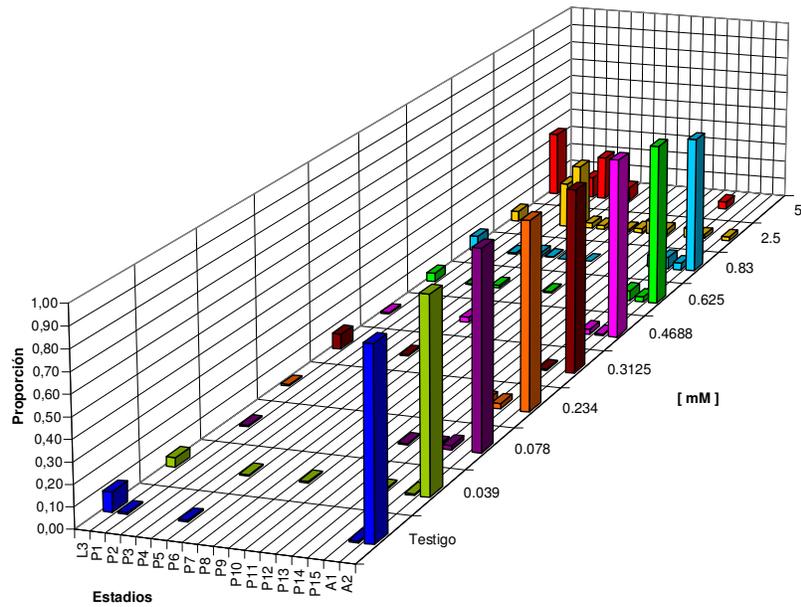


Figura 18. Proporción de larvas (L3), pupas (P1-P15) y adultos (A1-A2), 264 hrs de edad de los organismos.

### Viabilidad de pupas a adultos.

En la tabla VII, se muestra el total de los organismos de los tres experimentos (n) divididos por concentración [mM] de los siguientes estadios: Tercer estadio larvario (L3), primer estadio pupal al quinto (P1-P5), del sexto al décimo quinto (P6-P15) y dos fases del estadio de adulto (A1-A2). Los datos muestran la distribución de los individuos al término del registro (a las 264 horas de edad de los organismos). Comparados con el lote testigo, el lote experimental de 5mM muestra la mayor cantidad de larvas de tercer estadio (z para proporciones, prueba de dos colas,  $p < 0.05$ ) mientras que la menor proporción de larvas se ubicó en los lotes experimentales 0.078, 0.234 y 0.4688 mM (z para proporciones, prueba de dos colas,  $p < 0.05$ ). La mayor proporción de individuos de P1 a P5 así como de P6 a P15 se encuentra en el lote de 2.5mM y para las fases de adultos (A1-A2) en el lote de 0.078mM.

Además, en la figura 19 se observa que la mayor proporción de organismos, es decir, las barras más altas, corresponden al final del experimento a la proporción de adultos que se recobraron desde el lote testigo al lote experimental de 0.83 mM. A partir de 2.5 mM prácticamente no hay adultos. En cambio se observó mayor proporción en fases pupales de P1 a P5 y de P6 a P15, así como una mayor proporción de larvas en la concentración más alta y la ausencia de organismos adultos en 5mM.

<b>Tabla VII. Proporción de larvas (L3), pupas (P1-P15) y adultos (A1-A2), tratados con NDMA a las 264 horas de edad de los organismos.</b>					
<b>[mM]</b>	<b>n</b>	<b>L3</b>	<b>P1-P5</b>	<b>P6-P15</b>	<b>A1-A2</b>
Testigo	128	0,094	0,016	0,000	0,891
0,039	152	0,046	0,007	0,020	0,928
0,078	145	0,000*	0,007	0,034	0,959
0,234	184	0,005*	0,005	0,065	0,924
0,3125	147	0,075	0,007	0,007	0,912
0,4688	119	0,008*	0,000	0,076	0,916
0,625	155	0,045	0,019	0,084	0,852
0,83	164	0,079	0,030	0,140	0,750
2,5	138	0,058	0,601	0,312	0,029
5	98	0,347*	0,480	0,173	0,000

n= Sumatoria del número de organismos registrados a lo largo de los 3 experimentos incluyendo a larvas de 3er estadio (L3) hasta adultos emergidos (A2). \* z para proporciones, dos colas,  $\alpha/2=0.025$ .

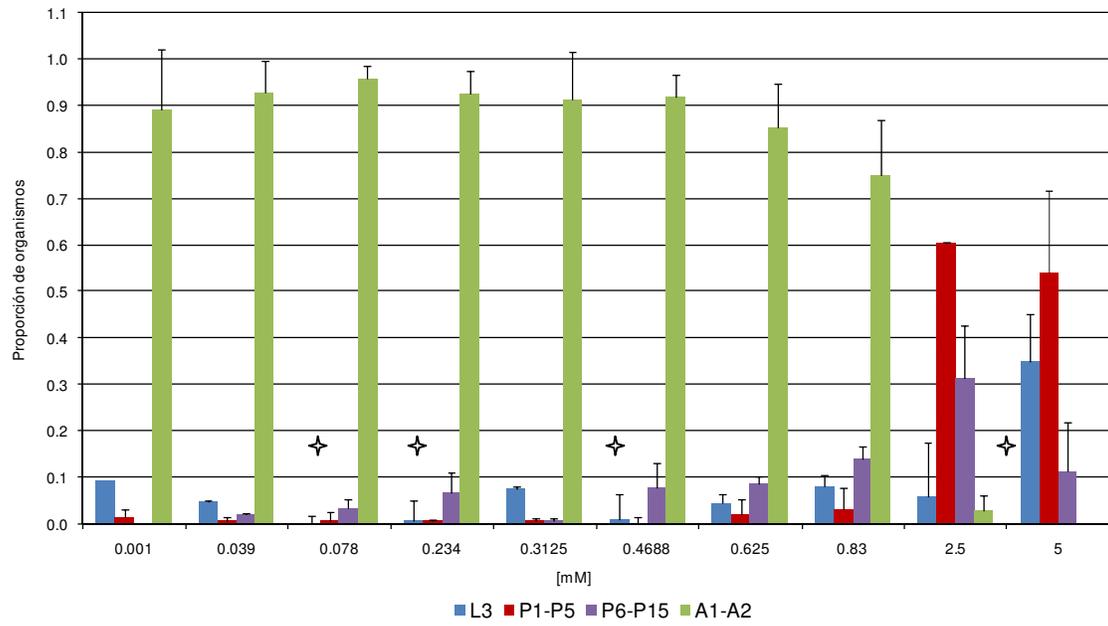


Figura 19. Proporción de larvas de tercer estadio (L3), pupas (P1- P15) y adultos (A1-A2) tratados con NDMA, 264 horas de edad (\* Prueba de dos colas,  $\alpha=0.05$ ).

## V. DISCUSIÓN

Este trabajo cuantificó las alteraciones que afectan la región anterior en diferentes estadios pupales en *Drosophila melanogaster*, como efecto del promutágeno de referencia (NDMA).

El biosistema (*Drosophila melanogaster*) utilizado fue sensible a los efectos teratogénicos de la NDMA, ya que se modificó el proceso de desarrollo de los organismos. La NDMA retrasó el desarrollo en concentraciones altas y la aceleró a concentraciones bajas con respecto al desarrollo regular de *Drosophila melanogaster*.

La NDMA ha sido probada en distintos modelos que evidencian su actividad teratogena. Maduagwu y Bassir (1979) estudiaron el efecto de la NDMA en embriones de cuatro cepas de *Gallus domesticus*, por medio de la inoculación de los huevos al décimo día de desarrollo (LD50, 3.3 ug de DMN/50 g de huevo). Al término de la incubación se examinaron las lesiones histológicas en los hígados de los embriones muertos. La cepa White Leghorn fue más susceptible que la White Rock. La revisión de los hígados reveló la congestión de lóbulos debido al efecto tóxico. El tejido de los embriones muertos en diferentes cepas se observó necrosado, característica de la exposición aguda a la NDMA. En general, las lesiones se presentaron en el 90 ó 100% de los organismos (Maduagwu y Bassir, 1979).

Así mismo, en mamíferos (roedores) se han llevado a cabo estudios en diferentes formas y tiempo de exposición. Bolognesi et al, en 1988 observaron efectos transplacentarios al inyectar la NDMA a ratones hembras preñadas. Cuando los fetos alcanzaron 15 días de edad las hembras fueron inyectadas con la fracción S9 o con el vehículo. En el tejido pulmonar y hepático de los fetos revisados a las 4 y a las 24 h post inyección se encontró inducción significativa de rompimientos de ADN en los fetos que recibieron la fracción S9; estos resultados muestran que la NDMA atraviesa las barreras placentarias, pero el metabolismo del feto no es eficiente para transformar a este compuesto a la forma activa. Además, existen distintos protocolos en los cuales se ha comparado bajo la toxicidad aguda de la NDMA administrada a ratas preñadas (P) y no preñadas (NP). En el trabajo de Nishie, 1982 el lote experimental de ratas P y NP, recibió de manera oral aceite de oliva y NDMA en concentraciones de 15 o 20 mg/kg, mientras que las testigo sólo fueron tratadas con aceite de oliva. La NDMA provocó la disminución en el peso del cuerpo en ratas P y NP respecto al peso de las ratas testigo. Los pesos de la tiroides y el hígado no cambiaron pero sí los pesos de las glándulas adrenales que tuvieron un incremento significativo en las ratas P y NP. En los

fetos removidos y pesados de las ratas P, se observó que la NDMA provoca la disminución del peso.

Finalmente, la exposición transplacentaria en primates fue confirmada por Rice (1979), quien encontró que los fetos son más susceptibles a carcinógenos directos no hormonales. Los carcinógenos transplacentarios más efectivos son independientes de enzimas como los agentes alquilantes (ej. alquilnitrosamidas). En cambio, para agentes dependientes de enzimas se necesita una de dos condiciones: el metabolito carcinógeno debe de ser formado en el tejido materno o placentario y ser lo suficientemente estable como para pasar a través de la circulación materna y fetal o bien; que se forme dentro del tejido del feto. Los agentes que son potentes carcinógenos en adultos pero que son pobremente metabolizados por tejido fetal y son metabolitos reactivos altamente inestables (vida corta) son generalmente menos efectivos transplacentariamente, como la NDMA.

El protocolo establecido en esta tesis es una herramienta *in vivo* útil para identificar alteraciones postembrionarias, lo que ofrece una ventaja comparada con los protocolos en los que se utilizan como modelos ratones hembras preñadas y en las que se evalúa en efecto en la progenie mediante disecciones exo-útero ya que este es un método invasivo que contempla mayor manipulación de los organismos, un gasto económico mayor, así como la obtención de resultados en un tiempo más largo (Matsumoto et al., 2002).

Además, este estudio puede ser utilizado como un antecedente para estudiar eventos que anteceden algunos casos de muerte fetal en mamíferos, específicamente de aquellos eventos relacionados con exposición a teratógenos que resulta en la falta de desarrollo o reversión de tejidos y órganos, así como en afecciones como la anencefalia.

Finalmente, los resultados de esta tesis mostraron que por efecto de la NDMA se lleva a cabo la diferenciación sin maduración de la región anterior (cefálica) así como el desarrollo gradual del tórax, abdomen y de las extremidades (patas). Sin embargo, una vez afectada la región anterior el patrón de desarrollo comienza a detenerse de manera que visualmente se aprecia que el tejido sufre reversión tanto de la región cefálica como torácica, y esto incluye las extremidades (patas). Los efectos descritos podrían estar asociados a la inducción de muerte celular, probablemente mediante apoptosis. Es necesario realizar otros estudios que exploren el tipo de mecanismo celular implicado en la reversión mostrada.

## VI. CONCLUSIONES

1. El tratamiento con NDMA mostró un efecto dual: las concentraciones bajas aceleraron el desarrollo y las altas lo retrasaron.
2. En este protocolo, la letalidad asociada a las altas concentraciones de NDMA ocurre durante la metamorfosis.
3. La ausencia de tejido cefálico se hizo evidente en las fases P5 y P6 (192 h de edad).
4. El protocolo utilizado mostró *in vivo* y en tiempo real la reversión no sólo de la región cefálica de la mosca, sino de otras partes del cuerpo (tórax, abdomen, patas).
5. *Drosophila melanogaster* respondió al promutágeno de referencia y con el protocolo calibrado fue fácil la obtención de resultados, por lo que el modelo biológico *Drosophila melanogaster* puede ser útil para estudios de alteraciones postembrionarios *in vivo*

## VII. REFERENCIAS

1. Adams M D, Celniker SE, Holt R A, Evans C A, Gocayne J D, Amanatides P G, Scherer S E, Li P W, Hoskins R A, Galle R F, George, R A, Lewis S E, Richards S, Ashburner M, Henderson S N, Sutton G G, Wortman J R, Yandell, M D, Zhang Q, Chen L X, Brandon R C, Rogers Y H C, Blazej R G, Champe M, Pfeiffer B D, Wan K H, Doyle C, Baxter E G, Helt G, Nelson C R, Gabor Miklos G L, Abril J F, Agbayani A, An H J, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew R M, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley E M, Beeson K Y, Benos P V, Berman B P, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan M R, Bouck J y col. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 287:2185-2195 pp.
2. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (1989) Toxicological Profile for N-Nitrosodimethylamine, Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
3. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson JD (1996) *Biología molecular de la célula*. Barcelona, España 1387 pp.
4. Arellano, A R O (2002) *Drosophila* como modelo *in vivo* para evaluar el potencial genotóxico de muestras ambientales, los azufres Michoacán. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México 51 pp.
5. Atkinson B (1994) Metamorphosis: model systems for studying gene expression in postembryonic development. *Development genetics* 15:313-319 pp.
6. Bainbridge S P and Bownes M (1981) Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morph.*, Vol 66, pp 57-80. Gran Bretaña.
7. Brusick, D (1987) *Principles of genetic toxicology*. Plenum Press, London 284 pp.
8. Bolognesi C, Rossi L, and Santi L, (1988). A new method to reveal the genotoxic effect of NDMA in pregnant mice. *Mutation research*, Elsevier. 207 57-62 pp. USA
9. Botas J (2007) *Drosophila* researchers focus on human disease. *Nature Genetics* 39, USA, 589 pp.

10. Christmann M, Roos W P and Kaina B (2007) Cap, 7. DNA methylation damage: formation, repair and biological consequences. Chromosomal alterations: methods, results and importance in human health. 99-121 pp.
11. Comité Nacional para la Vigilancia Epidemiológica (CONAVE) (2005) Manual de procedimientos para la vigilancia epidemiológica de los defectos del tubo neural. México, 39 pp.
12. Concise International Chemical Assessment Documental (CICAD). (2002). World Health Organization, Geneva.
13. Faustman M E, Gerhart J, Brown N A, Daston G P, Fishman M C, Holson J F, Koëter H B W M, Mahowald A P, Manson J M, Miller R K, Mirkes P E, Nebert D W, Noden D M, Papaioannou V E, Schoenwolf G C, Welsch F, and Wood W B (2000) Scientific Frontiers in Developmental toxicology and risk assessment. Comission of Life Science, USA, 313-327 pp.
14. Gilbert, S F (2005) Developmental Biology, 7th Ed. Sinauer Associates, Sunderland, M A.
15. Gichner T, Veleminsky J and Underbrink A G, (1980) Induction of somatic mutation by the promutagen dimethylnitrosoamine in hairs of *Transdencantia* stamen. Mutation research 78, Elsevier/ North Holland Biomedical Press, 381-384 pp.
16. González A, Domínguez W, Mancebo A, Díaz L, López M, Chico P, Serrano A, Lombardo E, Lucas E M (2008) Defectos del tubo neural: panorama epidemiológico en México (II Parte) 29 (2):117-21 pp.
17. Guzmán, R J, Espinoza J and Graf U (1998) Analysis of the *in vivo* nitrosation capacity of the larvae used in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*, México DF, Elsevier 412, N1: 69-81 pp.
18. Hällström I, Sundvall U, Rannug R, Grafstrom and R Ramel C. (1981a) The metabolism of drugs and carcinogens in isolated subcellular fractions of *Drosophila*

- melanogaster*. Enzyme induction and metabolism of benzo[a] pyrene. Chem-biol Interactions, 34:129-143 pp.
19. Hällström I and Grafstrom R (1981b) The metabolism of drugs and carcinogens in isolated subcellular fractions of *Drosophila melanogaster* activation of vinyl chloride, 2-aminoanthracene and benzo[a] pyrene as a measured by mutagenics effects in *Salmonella typhirium*. Chem-biol Interactions, 34:145-159 pp.
  20. Hällström I, Magnusson J and Ramel C (1982) Relation between the somatic toxicity of dimethylnitrosamine and a genetically determined variation in the level and induction of cytochrome P450 in *Drosophila melanogaster*. Mutation research, Elsevier Biomedical Press, 92:161-168 pp.
  21. Heflich L R H and Albert P (1991). Genetic toxicology, CRC Press Inc, 493 pp.
  22. International Agency for Research on Cancer (IARC) (1998)
  23. International Clearinghouse for Birth Defects (ICBD) (1991)
  24. Kaustembaum M A and Bowman O K (1966) The minimum significant number of successes in a binomial sample. USA.
  25. Klassen C D and Watkins J B (2005) Fundamentos de Toxicología. Mc Graw Hill-Interamericana págs, 536 pp.
  26. Klug W S, Cumming M R and Spencer C A (2006) Conceptos de Genética, Pearson Prentice Hall, España 920 pp.
  27. Kroeger-Koepke M B and Michejda C J (1979) Evidence for several demethylase enzymes in the oxidation of dimethylnitrosamine and phenylmethylnitrosamine by rat liver fractions, Cancer research 39, 1587-1591.
  28. Maduagwu E and Bassir O (1979) Comparative embriotoxicity of Dimethylnitrosamina in the chick embryo. Journal of Agriculture Food Chem, Vol 27, No 2, Americal Chemicals Society.

29. Mancebo H A, González R A, Díaz O L, López A M, Domínguez V W y Serrano S A (2008) Defectos del tubo neural en México (I de II) Acta Pediátrica de México, 29 (1):41-47
30. Matsumoto A, Hatta T, Moriyama K and Otaha H (2002) Sequential observations of exencephaly and subsequent morphological changes by mouse exo utero development system: analysis of the mechanism of transformation from exencephaly to anencephaly, Anatomy Embry, 205:7-18 pp.
31. Meehan R R (2002) DNA methylation in animal development. Seminars in Cell and development biology. Academic Press, 14:53-65 pp.
32. Misra R M y Waalkes III (2001) Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Toxicología genética. Ministerio de trabajo y asuntos sociales, España. 84 pp.
33. Nakayama N, Tanaka S y Kikuchi O (2002) Ab initio study of methylation reaction of adenine, cytosine, guanine and thymine by methanediazonium ion. J theor Biol, 215 Elsevier Science Ltd, 13-22 pp.
34. Nöthinger (1970) Sucrose density separation A method for collectin large number of *Drosophila* larvae. *Drosophila* information service 45:177.
35. Nishie K (1982) Comparison of the effects of N-nitrosodimethylamine on pregnant (P) and no pregnant Holtzman rats (NP). Fd Chem Toxic, Vol 21, 4, Great Britain, 453-462 pp.
36. Pierce B (2008) Genetics. A conceptual approach. Freeman and company, New York.
37. Public Health Goals for Chemical in drinking water (PHG) N-Nitrosodimethylamine, (2006) California, USA.
38. Ramos P, Abundis H M, Gaytan J C, Ordaz M G, Orozco P G, Maldonado J, Hernandez J, González E, Reyes P, Galicia E y Muñoz A (1993) Manual del laboratorio de genética para *Drosophila melanogaster*. Mc Graw Hill, 131 pp.
39. Ramos P y Muñoz A (2006) Memorias del 37º congreso “environmental and molecular mutagenesis” Vol 47 Núm 6, 450 pp.

40. Rice, J M (1979) Perinatal period and pregnancy: Intervals of high risk for chemical carcinogens. *Environmental Health Perspectives*, Vol 29 23-27 pp.
41. Salzberg A, Fisher O, Siman-Tov R and Ankri S (2004) Identification of methylated sequences in genomic DNA of adult *Drosophila melanogaster*. *Biochemical and biophysical communications*, Elsevier, 322:465-469 pp.
42. Schneider D (2000) Using *Drosophila* as a model insect. USA, Vol 1, 218-226 pp.
43. Silbergeld E K (2001) Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Capitulo 33. Toxicología. Herramientas y enfoques, 84 pp.
44. Takehisha S, Kanaya N y Rieger R (1988) Promutagen activation of *Vicia faba*: An assay based in the induction of sister-chromatid exchanges in Chinese Hamster ovary cells. *Mutation Research*, 197: 195-205 pp.
45. Tosal L, Comendador M A y Sierra L M (2001) *In vivo* repair of ENU-induce oxygen alkylation damage by the nucleotide excision repair mechanism in *Drosophila melanogaster*. *Mol Genet Genomics*, 265:327-335pp.
46. Timbrell J (2002) Introduction to toxicology. USA, CRC press, 215 pp.
47. Tyler, M S y Kozlowski R N (2003) FlyCycle-II, Sinauer Associates, Sunderland, M A Vade Mecum: "Fruit Fly" Capítulo del CD que muestra el ciclo de vida de *Drosophila*.
48. Veleminsky J and Gichner T (1988) Mutagen activity of promutagens in plants: indirect evidence of their activation. *Mutation Research*, Elsevier, 197 pp.
49. Vogel E (1975) Mutations in *Drosophila*: some aspects of the detection of potential mutagenic agents in *Drosophila*. *Mutation Research*, 29: 225-241 pp.

50. Vogel E (1988) y Szakmary A (1990) Basic principles and evaluations of results of assays measuring genotoxic damage in somatic cells of *Drosophila*. Mutation and Environment, part b: 149-158 pp.
51. Woodruff, R C, Philips, J P and Irwin D (1998) Pesticide induced complete and partial chromosome loss in screens with repair defect females of *Drosophila melanogaster*. Environmental Mutagenesis, USA, 5:6.835-846 pp.
52. Zimmering S (1984) Somatic Mutation and recombination Test in *Drosophila melanogaster*. Environmental mutagenesis, USA, 6:153-188..

## VIII. ANEXOS

### Anexo 1

<b>Principios generales de la teratología (Wilson, 1973).</b>	
I.	La susceptibilidad de la teratogénesis depende del genotipo del embrión y de la forma en la que éste interacciona con los factores ambientales nocivos.
II.	La susceptibilidad a la teratogénesis varía según la etapa del desarrollo embrionario en la que se produce la exposición a una influencia nociva.
III.	Los teratógenos actúan sobre los tejidos en desarrollo mediante mecanismos específicos que ponen en marcha la secuencia de acontecimientos anormales del desarrollo (patogenia).
IV.	El acceso de las influencias nocivas a tejidos en desarrollo depende de la naturaleza de la influencia (agente).
V.	Las cuatro manifestaciones del desarrollo anormal son la muerte, las malformaciones, el retraso del crecimiento y el déficit funcional.
VI.	Al incrementar la dosis, las manifestaciones del desarrollo anormal aumentan en frecuencia e intensidad de efectos hasta la muerte.

## Anexo 2

Normas Internacionales basadas en la identificación del nivel sin efecto adverso observable (NOAEL, por sus siglas en inglés). ICH, International Conference on Harmonisation. OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development (Klassen y Watkins(2005).

ESTUDIO	EXPOSICIÓN	CRITERIOS ANALIZADOS	COMENTARIOS
<b>Segmento I: Estudio de fecundidad y de reproducción en general</b>	Machos: 10 semanas antes del apareamiento Hembras: 2 semanas antes del apareamiento	Desarrollo de los gametos, fecundación, viabilidad preimplantación y postimplantación, parto lactancia	Valora la capacidad reproductora de machos tras la exposición después de un ciclo completo de la espermatogénesis o en hembras durante ciclos de estro
<b>Segmento II: Prueba de capacidad teratogénica</b>	Desde la implantación (o apareamiento) hasta el final de la organogénesis (o a término)	Viabilidad y morfología (externa, visceral y ósea) del feto inmediatamente antes de nacer	Exposición más breve para evitar la adaptación metabólica de la madre y someter al embrión a una exposición alta durante la gastrulación y la organogénesis. Posibilidad de comenzar antes de que los agentes se bioacumulen y que afecten la nutrición materna. La opción de la exposición más tardía cubre el desarrollo del aparato reproductor masculino, el crecimiento y la maduración del feto
<b>Segmento III: Estudio perinatal</b>	Desde el último trimestre del embarazo y durante la lactancia	Supervivencia posnatal, crecimiento y morfología externa	Persigue observar los efectos sobre el desarrollo de la capacidad funcional de los órganos principales durante el periodo perinatal: así pues, puede ser relativamente más sensible para los efectos nocivos en ese momento

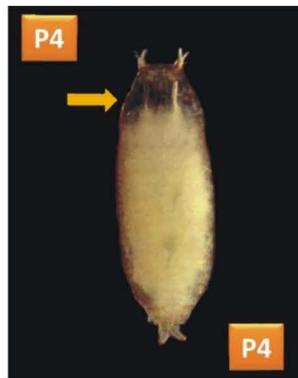
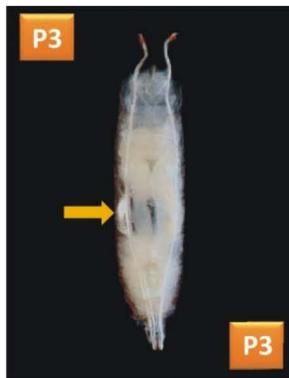
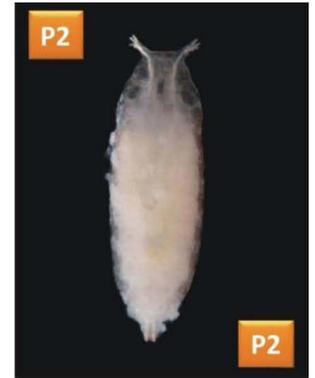
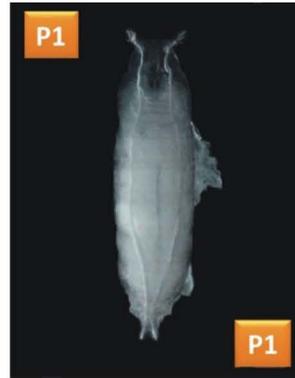
<b>ICH 4.1.1: Protocolo de fecundidad</b>	Machos: 4 semanas antes del apareamiento Hembras: 2 semanas antes del apareamiento	Machos: peso e histología de los órganos reproductores, cantidad y movilidad de los espermatozoides Hembras: viabilidad de los fetos a la mitad de la gestación o más adelante	Valora mejor las consecuencias para el aparato reproductor masculino: tratamiento más breve que el segmento I
<b>ICH 4.1.2: Efectos sobre el desarrollo prenatal y posnatal, incluida la función materna</b>	Desde la implantación hasta el final de la lactancia	Toxicidad relativa para la gestante frente a la no gestante, viabilidad posnatal, defectos del crecimiento, del desarrollo y funcionales (incluidas la conducta, la maduración y la reproducción)	Igual que para el segmento I
<b>ICH 4.1.3: Efectos sobre el desarrollo embrionario/fetal</b>	Desde la implantación hasta el final de la organogénesis	Viabilidad y morfología (externa, visceral y ósea) de los fetos	Igual que para el segmento II. Suele llevarse a cabo en dos especies (roedores y no roedores)
<b>OECD 4.1.4: Estudio de toxicidad para el desarrollo prenatal</b>	Desde la implantación (o apareamiento) hasta el día antes de la cesárea	Viabilidad y morfología (externa, visceral y ósea) de los fetos inmediatamente antes de nacer	Igual que para el segmento II. Suele llevarse a cabo en dos especies (roedores y no roedores)

### Anexo 3

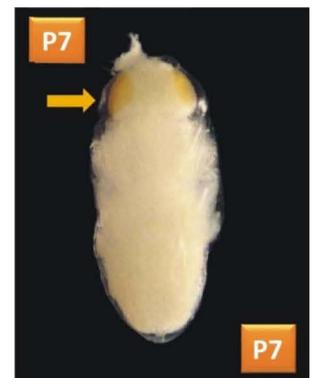
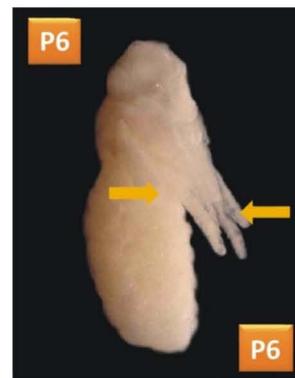
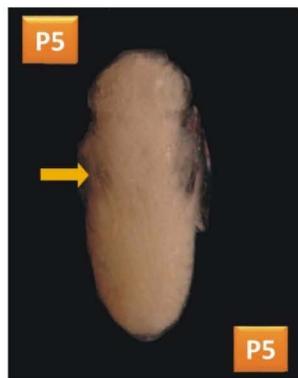
Fases pre-pupal, pupal y adulto (según Bainbridges y Bownes, 1981) y reproducidas en el laboratorio de genética y toxicología ambiental por Muñoz- Hernández, 2008.



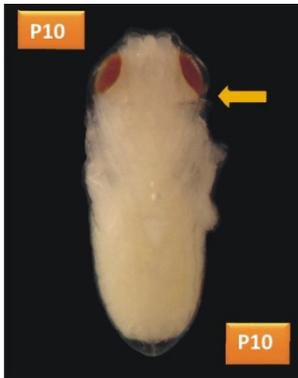
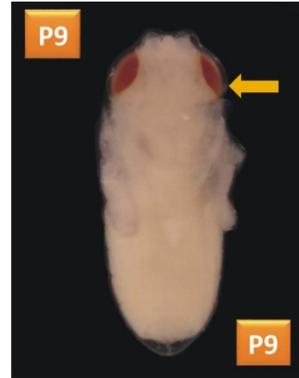
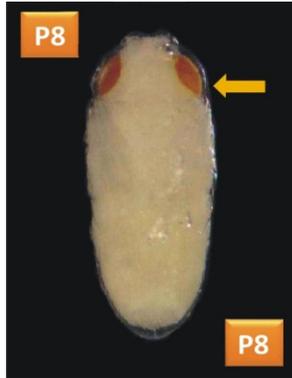
Estadio pre-pupal



Estadio pupal



Estadio pupal



# Adultos

