



Universidad Nacional Autónoma de
México

Facultad de Ciencias

Pérdida cromosómica en dos generaciones
sexuales sucesivas después de una única
administración del citostático colchicina en
machos de *Drosophila melanogaster*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

PRESENTA:

Tania Alonso Vásquez



DIRECTORA DE TESIS:
Dra. Patricia Ramos Morales

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.
2017



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Alonso

Vásquez

Tania

56 71 41 34

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

306511253

2. Datos del tutor

Dra.

Patricia

Ramos

Morales

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Regina Dorinda

Montero

Montoya

4. Datos del sinodal 2

M. en C.

Miguel Ángel

Palomino

Garibay

5. Datos del sinodal 3

M. en C.

Alfonso José

Vilchis

Peluyera

6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Jorge Luis

López

Zepeda

7. Datos del trabajo escrito

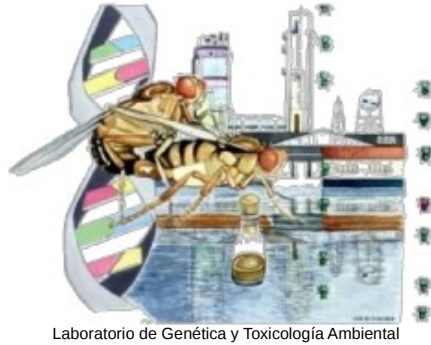
Pérdida cromosómica en dos generaciones sexuales sucesivas después de una única administración del citostático colchicina en machos de *Drosophila melanogaster*.

90 págs.

2017

Este trabajo se realizó en:

Laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental de la Facultad de Ciencias, UNAM.



Y el material biológico utilizado en este trabajo fue donado por:

Banco de Moscas de la Facultad de Ciencias, UNAM.



Dedicatoria

A mis padres, Sol y Emilio, por siempre creer en mí, por levantarme cuando no podía más e impulsarme cuando lo necesité. Por siempre enseñarme las cosas con acciones más que con palabras. Por esto y mucho más, los adoro.

A Santiago, por ser parte fundamental de mi vida. Por hacerme reír todos los días. Por ser mi pato. Sin ti, nada sería lo mismo.

A Rosa, por estar conmigo en cada paso desde que nos conocimos. Por ser parte de mi familia.

A Yaneli, por ser la maestra que me puso en este camino. Por enseñarme tanto y apoyarme en cada tropiezo. Por darme tu gran amistad.

A Estefania, por convertirte en una gran amiga, por tus conocimientos y por apoyarme en todo momento.

A Héctor y Pocho, por soportarme esos días de ensayo. Por recorrer este camino conmigo. Por ser mis hermanos por elección.

A Norma, por escuchar mis canciones a los 5 años y mis traumas y alegrías desde entonces. Por ser la mamá, hermana, amiga o lo que se necesite en el momento.

A Ayana y Juan, por ser los mejores amigos.

A Max, Chino, Jano, Pirta, Adri, Negro, Negrilli y Betito, por ser los amigos de la vida.

A Alejandro, Emilio y Alejandrina.

A las familias Alonso Núñez y Vázquez Ramos.

A Bob.

Agradecimientos

A la Dra. Patricia Ramos Morales, por enseñarme tanto de genética, pero sobre todo, por mostrarme que la educación es un motor que puede salvar al mundo.

A los sinodales: Dra. Regina D. Montero Montoya, M. en C. Miguel A. Palomino Garibay, M. en C. Alfonso J. Vilchis Peluyera y M. en C. Jorge L. López Zepeda por su tiempo y sugerencias para hacer de éste trabajo lo que es.

A los profesores más importantes para mi formación académica, por orden de aparición: Jorge L. López, Jorge A. Martínez, Simón Guzmán, Oscar Hinojosa, Zenón Cano, Julieta Jujnovsky, Alya Ramos, Yaneli Trujillo, Miguel A. Palomino, Saúl Gómez Manzo, Alfonso J. Vilchis, Eduardo Rodríguez, Sara Frías, Bertha Molina, Raúl Gio y Álvaro Chaos.

A Yaneli, Estefania, Karla, Gaby, Magnolia, Rubi, Adrián, Grabriel, Daniela y Daniel por hacer del laboratorio un hogar.

A todos los profesores del laboratorio, por su gran apoyo en todos mis experimentos: Biól. Hugo Rivas, Biól. Blanca Hernández, Biól. Estefania Arroyo, M. en C. Yaneli Trujillo, Dra. Adriana Muñoz.

Por su apoyo técnico, al Biól. Hugo Rivas Martínez, M. en C. Yaneli Trujillo Varela y Dra. Adriana Muñoz Hernández.

Y a todos aquellos que de alguna u otra manera estuvieron ahí conmigo. Gracias.

Índice general

Resumen	10
1. Introducción	12
1.1. Aneuploidías y actividad clastogénica	14
1.2. <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo biológico	16
1.3. Diferenciación sexual de <i>Drosophila melanogaster</i>	18
1.4. Mosaicos sexuales	22
1.5. Colchicina	24
2. Justificación	26
3. Objetivos	27
3.1. Objetivo general	27
3.2. Objetivos particulares	27
4. Hipótesis	28
5. Metodología	29
5.1. Cruzas y marcadores	29
5.1.1. Líneas de moscas	31

5.2. Sincronización de cultivos y obtención de larvas	32
5.2.1. Tratamiento	35
5.2.2. Desarrollo de la prueba SCLT modificada	36
5.3. Análisis estadístico	40
6. Resultados	42
6.1. Toxicidad del tratamiento	42
6.2. Primera generación	48
6.3. Segunda generación	51
6.4. Progenie excepcional entre F_1 y F_2	57
6.5. Fertilidad	58
6.6. Proporción sexual	60
6.7. Supervivencia y progenies promedio	61
7. Discusión	62
7.1. Supervivencia al tratamiento	63
7.2. Efecto de la colchicina en dos generaciones sucesivas no tratadas	68
7.2.1. Progenie excepcional: primera generación	69
7.2.2. Progenie excepcional: segunda generación	70
7.2.3. Progenie excepcional: primera y segunda generación	73
7.3. Efecto de la colchicina en la supervivencia de machos tratados y su descendencia	74
7.3.1. Fertilidad	74
7.3.2. Proporción sexual	75
7.3.3. Efecto transgeneracional del tratamiento con colchicina al macho progenitor	76

8. Conclusiones

78

A. ANEXO

79

Resumen

El cáncer es una enfermedad caracterizada por el mal funcionamiento de las células de cualquier parte del cuerpo y que se asocia con la exposición directa de personas ante sustancias. Sin embargo, ésto no explica el aumento en la incidencia de cáncer infantil en muchos países (NIH-NCI 2015). En la vida cotidiana estamos constantemente expuestos a diversos compuestos que pueden surtir un efecto negativo en nuestro organismo, los cuales pueden no ser observables sino hasta generaciones después. Es de suma importancia estudiar compuestos cuyo efecto es a largo plazo, debido a la posibilidad de provocar padecimientos hereditarios (Ostrosky Wegman y Gonsebatt 1997), así como tener claro si el efecto depende de qué progenitor haya sido expuesto. Por lo tanto, este trabajo buscó establecer los biomarcadores de toxicidad y genotoxicidad que permitan medir el daño causado por algún xenobiótico en machos de *Drosophila melanogaster* y el efecto de éste en dos generaciones sucesivas. Para eso se utilizó el citostático colchicina, el cual está clasificado como aneuploidógeno (Bishop y col. 1996), caracterizado por ser anti-mitótico, inhibiendo la formación de microtúbulos para la formación del huso acromático (D. Voet y J. Voet 2006). Diluciones sucesivas de colchicina (1.25E-01 a 1.86E-09 mM), o agua destilada para el testigo negativo, fueron administradas de manera subcrónica a larvas de *D. melanogaster* de 72 ± 4 h de edad, con genotipo silvestre (línea de referencia) y a larvas macho con genotipo y^2w^a/B^sYy^+ (línea experimental). Se calculó y comparó la sobrevivencia y la proporción sexual de ambas líneas de las series experimentales con respecto al testigo. Los machos recobrados de la línea experimental fueron cruzados individualmente con hembras yw/yw no tratadas para obtener la F_1 . Se contó el número de hijos regulares y excepcionales, y se calculó la progenie promedio por pareja, la proporción sexual y la fertilidad de los machos tratados. Hembras y machos de la progenie regular fueron cruzados individualmente para obtener la F_2 , y se calcularon los mismos biomarcadores que para la generación anterior. Por último, se compararon los biomarcadores de los hijos provenientes de machos tratados con respecto a su testigo, así como entre generaciones. En la línea experimental se encontraron diferencias significativas con respecto a su testigo en la sobrevivencia a partir de la concentración 3.13E-02 mM, no así en la proporción sexual. Los organismos provenientes de la progenie F_1 regular fueron fértiles en todas las concentraciones, aunque no con la misma magnitud. Se encontraron diferencias significativas con respecto a su testigo en las concentraciones 1.56E-02 y 8.06E-

03 mM, y de nuevo la proporción sexual se encontró estable. Los machos recuperados de la exposición al citostático en la concentración 3.13E-02 mM no tuvieron hijos. Los hijos provenientes de machos tratados a 1.56E-02 y 1.52E-05 mM tuvieron diferencias significativas con respecto a su testigo, a diferencia de la proporción sexual, la cual se mantuvo estable. La progenie excepcional recuperada corresponde principalmente a no-disyunción paterna. El evento causante de progenie excepcional más frecuente fue la pérdida parcial de B^S . Comparando la progenie F_1 y F_2 excepcional podemos decir que el citostático causó más no-disyunción en F_1 en las concentraciones 1.56E-02 y 1.53E-05 mM, mientras que no hubo diferencia de pérdidas parciales entre generaciones. La fertilidad se mantuvo dependiente de la colchicina administrada a los machos, sin cambiar en las dos generaciones posteriores. La proporción sexual se mantuvo estable en todas las generaciones, sin embargo, siempre hubo más hembras que machos, indicando que los machos fueron más sensibles al compuesto. Por último, la sobrevivencia y progenie F_1 y F_2 promedio se mantuvo asociada a la dosis de colchicina con la misma tendencia negativa. La alteración en los biomarcadores indica que el daño encontrado fue reprotóxico y transgeneracional. El tratamiento a machos tiene implicaciones a largo plazo que podrían, mediante mecanismos de tipo epigenéticos asociarse con el aumento en alteraciones en las células somáticas de la descendencia no expuesta. El uso de biomarcadores como progenie promedio, proporción sexual, fertilidad y progenie excepcional es satisfactorio para determinar el daño hecho por un determinado compuesto a través de las generaciones.

1. Introducción

El cáncer es una enfermedad caracterizada por el mal funcionamiento de las células de casi cualquier parte del cuerpo. Normalmente, las células crecen, se dividen, se diferencian y tiempo después mueren. Sin embargo, una célula cancerígena no se comporta como una célula diferenciada, por lo cual mantiene su capacidad de división y no muere. Este proceso puede formar tumores sólidos, característica común en muchos tipos de cánceres, con excepción de las leucemias, que son cánceres no sólidos en la sangre (NIH-NCI 2015).

Hoy en día aún no es posible saber con precisión por qué algunas personas desarrollan cáncer y otras no, sin embargo, existen ciertos factores que incrementan el riesgo de formación de células cancerosas (NIH-NCI 2015). Por ejemplo, el contacto con sustancias, que se asocia con aproximadamente el 98-99% de los casos de cáncer (Tortajada y col. 1999).

En general, el desarrollo de un proceso canceroso por exposición a factores ambientales implica un largo periodo de latencia, el cual va desde tres años hasta tres o cuatro décadas, por lo que la mayoría de los cánceres se desarrollan durante el último tercio de vida (Tortajada y col. 1999), sin embargo, cada vez es más frecuente el desarrollo de procesos cancerosos en edades más tempranas.

El cáncer infantil es aquel que se presenta en menores de 15 años, y a pesar de que tiene una incidencia baja en comparación con el cáncer en adultos, los casos de cáncer infantil han ido aumentando en las últimas décadas en distintos países como Estados Unidos,

España, Colombia, Argentina, Japón y México, siendo la segunda causa de muerte en el intervalo de 1 a 14 años. En niños, los cánceres más frecuentes son leucemias (más común de todos, con hasta 36 % en algunos países), tumores en el sistema nervioso central y linfomas (González García y col. 2010; Pujol y col. 2014; NIH-NCI 2015; Ishihara y col. 2017). En la mayor parte de los casos de cáncer infantil no se ubica una clara implicación de factores ambientales, y a pesar de que puede haber exposición *in utero*, algunas veces la edad en que se desarrollan no posibilita que ocurra un periodo de exposición ambiental y latencia pertinente para que se desarrolle dicha enfermedad.

Debido a que en la vida cotidiana estamos expuestos a más de 70,000 sustancias diferentes, es necesario estudiar los efectos adversos que podrían producir en nosotros, los cuales no necesariamente se manifiestan de inmediato, sino que pueden tardar años o incluso generaciones en aparecer (Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT) 1999). A esto último se le conoce como *daño transgeneracional*, que es el efecto que responde a cambios fenotípicos presentes en generaciones sucesivas determinados por la exposición ambiental de sus padres (Youngson y Whitelaw 2008; Valtonen y col. 2012), mientras que se le llama *efecto reprotóxico* a las deficiencias biológicas en los sistemas reproductores que podría tener un organismo expuesto (Gilbert 2005; Cabrero Roura y Saldivar Rodriguez 2007).

El estudio de dichas sustancias puede enfocarse como la relación dosis-respuesta entre la cantidad de compuesto y su efecto en el organismo, lo cual sigue una lógica creciente y lineal, asumiendo que mientras mayor sea la dosis, mayor será la respuesta que se observe (Klaassen y Watkins 2005). Sin embargo, es necesario prestar atención a lo que sucede en dosis bajas, en donde la respuesta podría ser diferente. Este aspecto es crítico en la determinación del daño al material genético hereditario de los sobrevivientes a la exposición de genotóxicos (Ramos Morales, Herrera Bazán, Muñoz Moya, Muñoz Hernández, Rivas Martínez, Hernández Bernal, García Martínez y García Niño 2006b).

Los agentes genotóxicos pueden alterar la integridad del material genético ya sea directamente o a través de sus metabolitos activos. Algunas modificaciones en el material genético resultan estables y transmisibles a las células ya sea por mitosis o meiosis (mu-

tagénesis) y las consecuencias en uno u otro caso son diferentes. Por ejemplo, las rupturas del ADN aumentan la probabilidad de recombinación como parte de un proceso de reparación; pero también puede aumentar la probabilidad de mutagenicidad y dar lugar a aberraciones cromosómicas estructurales (las cuales también se han asociado con carcinogénesis), o malformaciones estructurales o anatómicas, alterando el desarrollo normal del embrión (teratogénesis) (Vogel y col. 1999; Bello Gutiérrez y Cerain Salsamendi 2001). Aquellos genotóxicos denominados aneuploidógenos alteran la segregación cromosómica, resultando en aberraciones cromosómicas numéricas (Klug y col. 2013).

1.1. Aneuploidías y actividad clastogénica

Las aberraciones cromosómicas numéricas, causadas por aneuploidías, implican la pérdida o ganancia de cromosomas, resultando en un número irregular de éstos (Griffiths, Wessler, Carrol y col. 2012). La pérdida o ganancia de cromosomas ocurre por un error durante la división celular en la que los cromosomas homólogos (en la meiosis) o las cromátidas hermanas (en la meiosis y en la mitosis) no se separan ni migran a los polos opuestos, a esto se le conoce como *no-disyunción* (Griffiths, Wessler, Lewontin y col. 2008; Klug y col. 2013) (Fig. 1.1).

La variación en el número de cromosomas de un organismo produce un desarrollo irregular, resultando en enfermedades o inclusive en la inviabilidad del mismo. En humanos, la falta de cualquier autosoma resulta letal en el desarrollo embrionario o fetal. Así, un cigoto con alguna monosomía autosómica no es viable. Las trisomías autosómicas suelen tener el mismo efecto; sólo tres trisomías autosómicas permiten la sobrevivencia, pero sólo los individuos con trisomía del cromosoma 21, conocida como el Síndrome de Down, sobreviven después de los primeros meses de edad, aunque presentan un riesgo alto de padecer leucemia (Klug y col. 2013; Karp 2014). Personas que presenten el Síndrome de Patau (trisomía del cromosoma 13) o el Síndrome de Edwards (trisomía del cromosoma 18) sobreviven únicamente unos pocos días después de nacer (Griffiths, Wessler, Lewontin

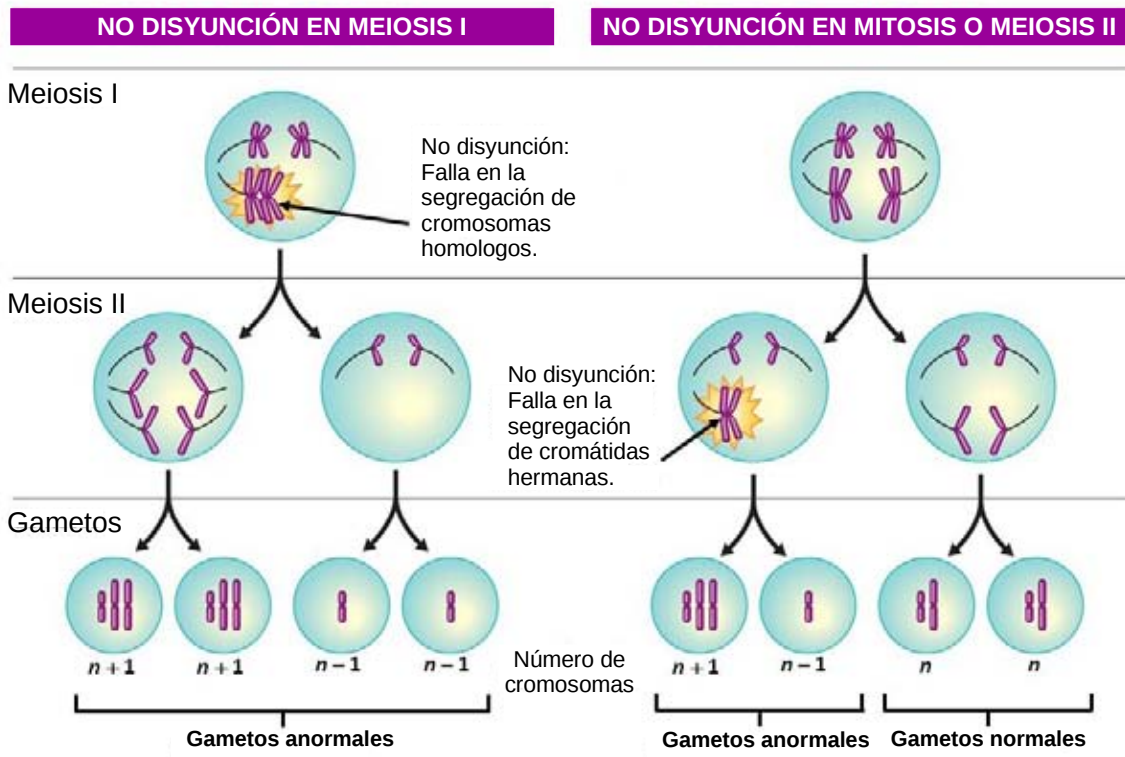


Fig. 1.1 Diagrama para ejemplificar no-disyunción en meiosis I, meiosis II o en la mitosis. Errores en la segregación producen gametos con trisomías, monosomías y regulares. Si éstos ocurren en meiosis I afectan a todos los gametos formados a partir de esa célula; si ocurren en meiosis II, afecta a la mitad (Imagen tomada de la editorial Pearson Education, 2010).

y col. 2008; Pérez Aytés 2010; Klug y col. 2013).

En humanos, la presencia de un número de cromosomas sexuales diferente al habitual (XX para mujer y XY para hombre) es viable, pero resulta en un desarrollo sexual alterado (Klug y col. 2013; Karp 2014). Existen cuatro condiciones posibles, que son el Síndrome de Klinefelter (XXY), Síndrome de Turner (X0), Síndrome triplo-X (XXX) y la condición XYY, en donde todos tienen características fenotípicas diferentes a las de un hombre XY o mujer XX, algunos muestran deficiencia cognitiva o retraso mental y en algunos casos, esterilidad (Griffiths, Wessler, Lewontin y col. 2008; Klug y col. 2013; Karp 2014).

Así mismo, algunos genotóxicos pueden tener también la capacidad de provocar rompi-

mientos sencillos o dobles en la cadena de ADN, y las sustancias que lo hacen son llamadas clastógenos. De esta manera, la clastogenia es el suceso en el que se producen fragmentos de cromosomas.

Ahora bien, para estudiar específicamente los efectos adversos que causan los agentes tóxicos sobre el material genético (ADN) *in vivo*, así como la alteración de procesos genéticos de las células (Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT) 1999), es necesario tener sistemas de prueba que evalúen la interacción de genotóxicos con los organismos y que permitan el análisis de la relación con la exposición, mecanismos de acción y expresión de los efectos genéticos en sus células (Brusick 1987).

Estos estudios pueden ser *in vitro* e *in vivo*. Los primeros son utilizados para evaluar al genotóxico de manera preliminar, ya que tienen un costo relativamente bajo y no toman demasiado tiempo. Los segundos brindan mayor información biológica acerca de la evaluación del genotóxico *in vivo*, debido a que se mantiene intacto el metabolismo del organismo y a que éste muestra un mayor potencial de respuesta, pero suelen requerir más tiempo y costo (Derelanko y Auletta 2014).

1.2. *Drosophila melanogaster* como modelo biológico

El sistema experimental *in vivo* más intensamente estudiado en biología en los últimos 100 años es *Drosophila melanogaster*, sirviendo como organismo modelo para la investigación de procesos celulares y de desarrollo que tienen en común los eucariontes (Garesse 1988; Adams y col. 2000; Beckingham y col. 2005).

En el año 2000, Mark D. Adams y colaboradores determinaron la secuencia nucleotídica de las 180 megabases que componen todo el genoma de *D. melanogaster* con base en: su importancia histórica, el tamaño modesto de genoma y por la gran comunidad científica que estaba interesada en este organismo modelo (Adams y col. 2000). Este hecho confirmó a *D. melanogaster* como uno de los modelos con mayor potencial para brindar información

acerca de procesos biológicos complejos (Beckingham y col. 2005).

El corto ciclo de desarrollo de *Drosophila melanogaster* es una ventaja, ya que presenta un periodo de embriogénesis dentro del huevo, tres estadios larvales y una pupa en la que ocurre una metamorfosis completa (característica de los organismos holometábolos) y de la que emerge un adulto (Ramos Morales 1993). La duración aproximada de cada estadio es: huevo, 1 día; larva de primer estadio, 1 día; de segundo, 1 día; de tercero, 1 día, y pupa, de 4.5 a 5 días, dando un total de 9.5 a 10 días (Fig. 1.2) a 25°C y 60 % de humedad. Esta duración depende de condiciones controladas de temperatura y humedad relativa (Ramos Morales 1993). La corta duración del ciclo de vida ha hecho posible detectar el espectro completo de daño genético, ya sea por deleciones, translocaciones, pérdida cromosómica, mutaciones letales dominantes y aneuploidías (Vogel y col. 1999).



Fig. 1.2 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. De izquierda a derecha: huevo, larvas de primer, segundo y tercer estadio, pupa e imago (o adulto).

Además de la corta duración del ciclo de desarrollo, la mosca del vinagre presenta como ventaja un mantenimiento de bajo costo, requiere de un espacio reducido y la progenie promedio por hembra son 500 huevos (Valencia y col. 1984). El hecho de que el genoma de *Drosophila melanogaster* esté compuesto únicamente por cuatro cromosomas, en donde uno de ellos es muy pequeño (cromosoma 4), facilita experimentos genéticos (Valencia y col. 1984) (Fig. 1.3).

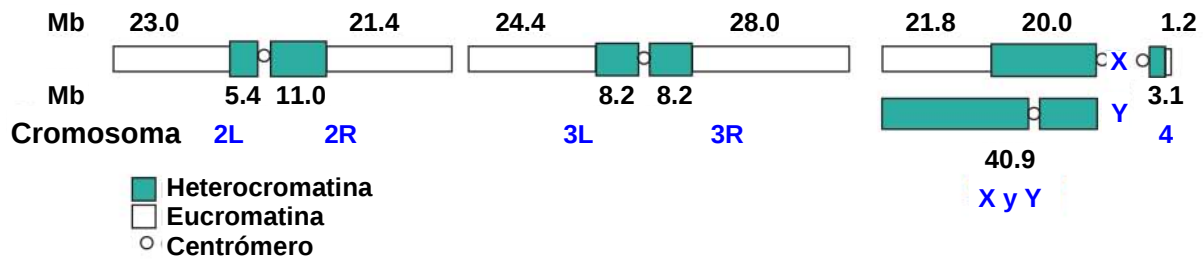


Fig. 1.3 Cromosomas mitóticos de *Drosophila melanogaster*, mostrando regiones eucromáticas, heterocromáticas y centrómeros (Imagen tomada de Adams y col. 2000).

1.3. Diferenciación sexual de *Drosophila melanogaster*

El estudio de la diferenciación sexual en *Drosophila melanogaster* se remonta a 1916, cuando Calvin Bridges encontró que el cromosoma Y no tenía un papel activo en el proceso de determinación sexual, sino que el sexo estaba determinado por determinantes presentes en el cromosoma X y en los autosomas, de manera que se establecía un equilibrio entre el número de cromosomas X y el número de series de autosomas. A este tipo de determinación sexual se le llama *sistema de equilibrio génico* (Pierce 2009; Salz y Erickson 2010).

En el sistema de equilibrio génico, un número determinado de genes influyen en el desarrollo sexual. En el cromosoma X se encuentran los genes responsables de efectos feminizantes mientras que, en los autosomas, los de la masculinización; en consecuencia, el sexo de la mosca del vinagre está determinado por la proporción de cromosomas X respecto del número de dotaciones autosómicas haploides (A) presentes (Pierce 2009; Klug y col. 2013).

Para hembras, dicho cociente es igual a 1, es decir, hay la misma cantidad de cromosomas X que de autosomas, mientras que para machos el cociente es igual a 0.5. Proporciones entre 0.5 y 1 dan como resultado individuos intersexuales, es decir, expresan caracteres morfológicos tanto masculinos como femeninos; y proporciones distintas a alguno de estos

números, dan como resultado moscas que tienen problemas en el desarrollo o moscas macho estériles, metahembras y metamachos, respectivamente (Pierce 2009; Klug y col. 2013) (Cuadro 1.1).

Fórmula cromosómica	Proporción X:A	Fenotipo sexual
3X / 2A	1.5	Metahembra
3X / 3A	1.0	Hembra
2X / 2A	1.0	Hembra
3X / 4A	0.75	Intersexo
2X / 3A	0.67	Intersexo
X / 2A	0.5	Macho
XY / 2A	0.5	Macho
XY / 3A	0.33	Metamacho

Cuadro 1.1 Composiciones cromosómicas, proporciones X:A y fenotipo de *Drosophila melanogaster*, para la determinación sexual por equilibrio génico. En verde, hembras y machos de características normales (Tabla tomada de Klug y col. 2013).

El sistema de equilibrio génico y la cascada de señalización para la diferenciación sexual se encuentran en el conteo de elementos numeradores, que son proteínas reguladoras producidas por los genes del cromosoma X (*sisterless-a*, *sisterless-b*, *sisterless-c*, *runt*, *deadpan*), y elementos denominadores, que son proteínas reguladoras producidas en los autosomas (*daughterless*, *hermaphrodite*, *extramacrochaetae*, *groucho*) (Gilbert 2000).

La cascada de señalización comienza con la activación (desarrollo femenino) o no activación (desarrollo masculino) del gen “Sex-lethal” (*Sxl*). Este gen codifica para 21 diferentes productos, los cuales se dividen en tres grupos: productos tempranos para hembras, productos tardíos para hembras y productos tardíos para machos (Salz y Erickson 2010; Klug y col. 2013) (Fig. 1.4).

El promotor de establecimiento, *SxlPe* (*Pe* en la figura 1.4), es específico y el producto transcrito maduro solo mantiene a los exones 1-4, formando el producto temprano para hembras. El promotor de mantenimiento, *SxlPm* (*Pm* en la figura 1.4) es diferente al anterior y genera un transcrito que al ser madurado conserva a los exones L1, 2 y 4. En machos, la maduración del transcrito contiene a los exones L1, 2, 3 y 4. Para el caso de

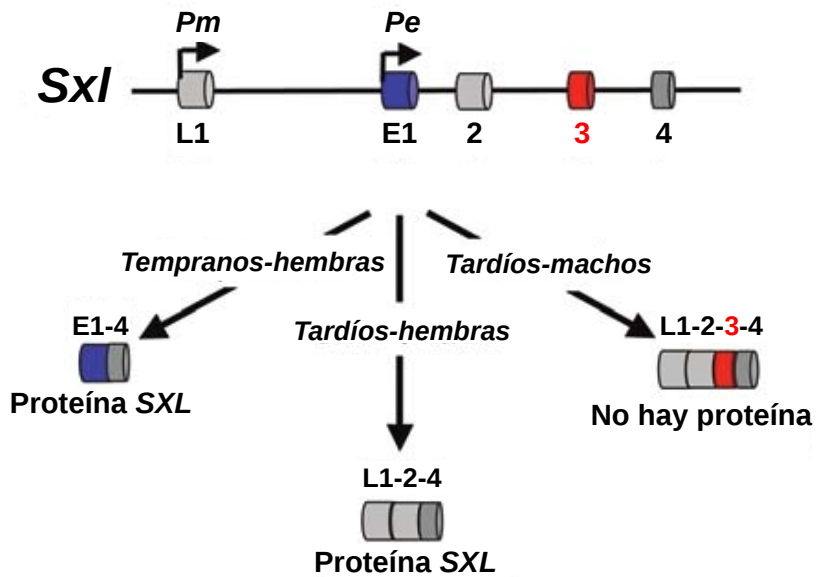


Fig. 1.4 mRNA del gen *Sxl*, los promotores de establecimiento (E1) y de mantenimiento (L1) y los exones que forman los productos tempranos para hembras y los tardíos para hembras y machos (Imagen tomada de Salz y Erickson 2010).

los productos tempranos y tardíos para hembras se obtiene la proteína *SXL*, y debido a que el exón 3 tiene un codón de “stop”, no se obtiene la proteína *SXL* para el producto tardío de machos (Salz y Erickson 2010).

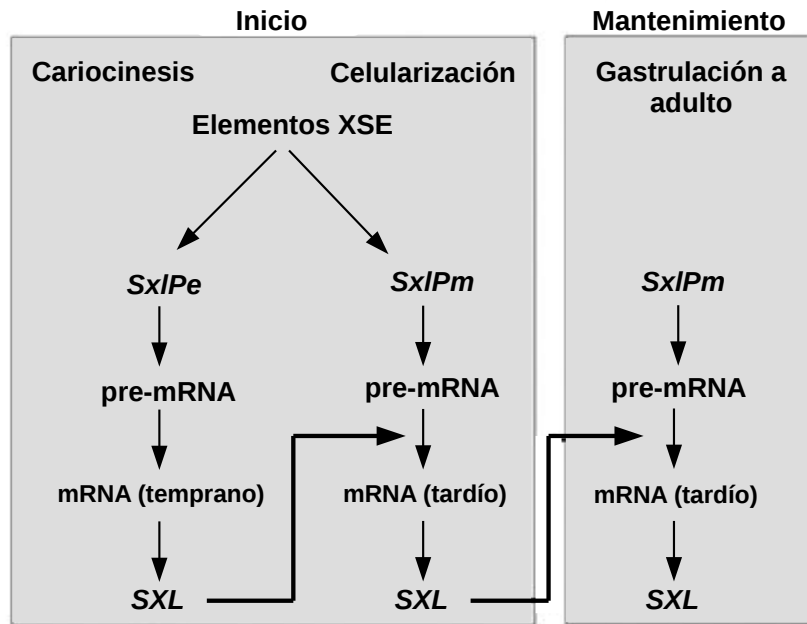


Fig. 1.5 Diagrama de la regulación de la expresión de la proteína *Sxl* en hembras de *Drosophila melanogaster* (Imagen tomada de Salz y Erickson 2010).

La activación del gen *Sxl* depende de las proteínas codificadas del cromosoma X, llamadas *elementos señal ligados al cromosoma X* (XSE, por sus siglas en inglés), en donde la regulación del represor Deadpan (*Dpn*) y su correpresor Groucho (*Gro*) activan la sobreexpresión de XSE, las cuales a su vez activan la transcripción de *SxlPe*, en donde el producto (proteínas *SXL*) lleva al “splicing” de nuevo RNA transcrito por el promotor *SxlPm*. En esta etapa de mantenimiento, el promotor *SxlPe* se apaga y *SxlPm* se mantiene expresado gracias a la producción de proteínas *SXL*, activando el gen *Sxl* de manera irreversible (Salz y Erickson 2010) (Fig. 1.5).

La proteína *SXL* induce la producción de la proteína Transformer (*tra*), que junto con Transformer-2 (*tra2*), forman un dímero que dirige el “splicing” del transcrito de Doublesex para traducir a la proteína Doublesex (*dsx*) para hembras, induciendo la diferenciación femenina. Así mismo, la proteína *SXL* inhibe la producción de la proteína male-specific-lethal-2 (*msl-2*), responsable de la diferenciación masculina. De esta manera, si el gen *Sxl* no es activado, no hay proteína *SXL* que inhiba la producción de *msl-2* ni que induzca

la producción de *tra*, permitiendo que la proteína *dsx* para machos se forme y se dé una diferenciación masculina (Gilbert 2000) (Fig. 1.6).

1.4. Mosaicos sexuales

En *Drosophila*, la expresión de los genes es independiente en cada célula, de manera que cada célula expresará el sexo como respuesta a la regulación interna de ésta.

Así, debido a la manera en la que se genera la diferenciación sexual y el mantenimiento de ésta, se pueden observar mosaicos sexuales en *D. melanogaster*. Los mosaicos genéticos son aquellos organismos compuestos de dos o más poblaciones de células con al menos dos genotipos diferentes provenientes del mismo cigoto (Gersen y Keagle 2013). En muchas especies los mosaicos han funcionado como herramientas para el estudio de fenómenos producidos genéticamente, como la determinación de patrones durante el desarrollo o la autonomía y especificidad de tejidos para la expresión génica (Hall y col. 1976).

En *Drosophila*, los mosaicos brindan información acerca de la autonomía de genes ligados al cromosoma X, ya que éstos pueden surgir por la pérdida o inactivación somática de uno de los cromosomas X en embriones que comenzaron su desarrollo siendo hembras XX. Este tipo de mosaicismos suceden espontáneamente en frecuencias muy bajas, aproximadamente un individuo de cada dos mil moscas son ginandromorfos (Crew 2015; Hall y col. 1976).

En los mosaicos bilaterales, las moscas muestran la mitad del cuerpo con fenotipo masculino, y la otra mitad con fenotipo femenino, a estos se les llaman ginandromorfos bilaterales. Así mismo, éstos pueden presentar otras fracciones del cuerpo con características masculinas (Crew 2015).

Este trabajo tiene como objetivo establecer la relación que hay entre los biomarcadores de toxicidad (sobrevivencia, progenie promedio por familia y proporción sexual) y genotoksi-

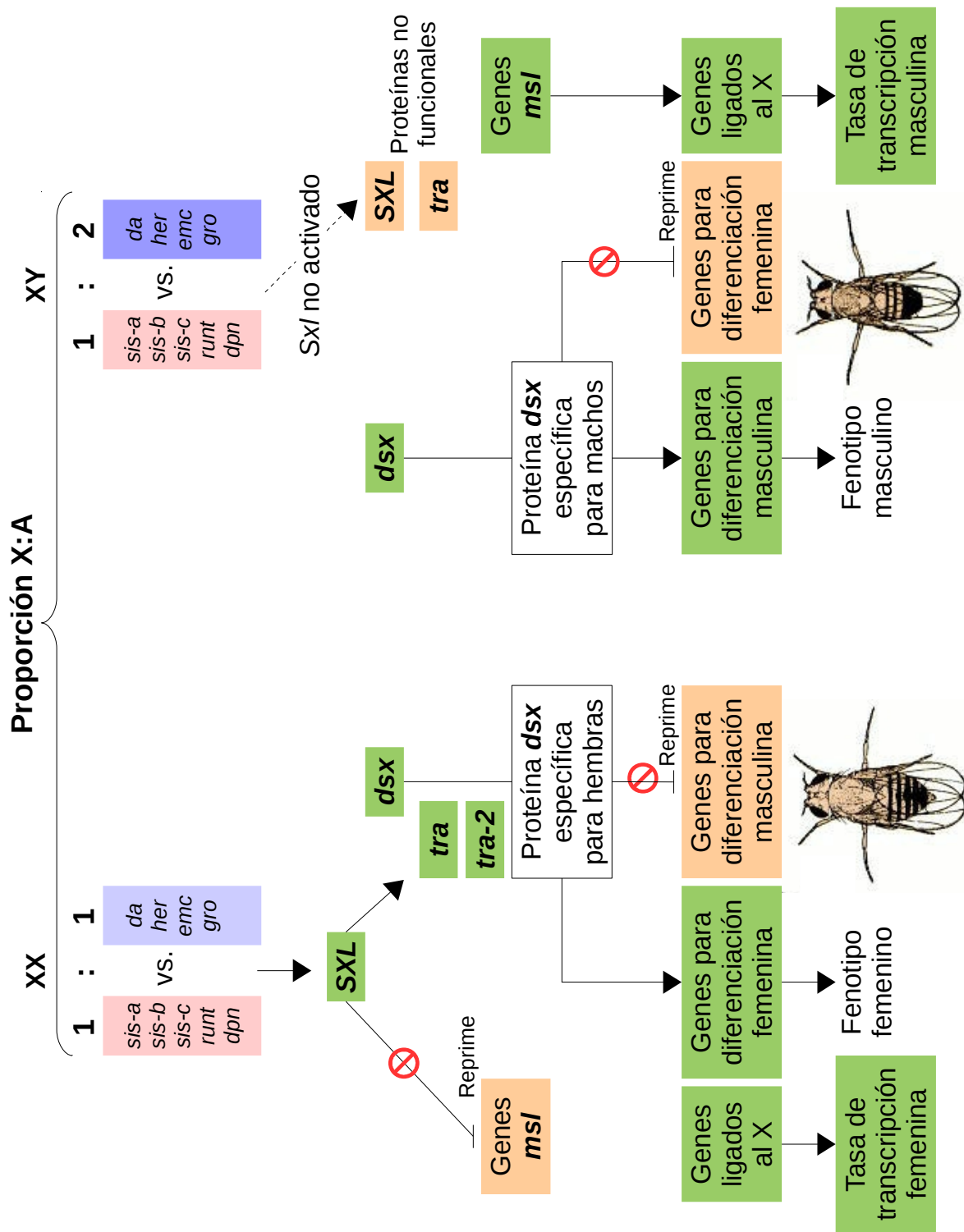


Fig. 1.6 Cascada de señalización de la determinación sexual para *Drosophila melanogaster* (Imagen tomada de Gilbert 2000). X, cromosoma sexual; A, autosoma. La proporción en hembras es 1:1 y en machos es 1:2, respectivamente.

cidad (progenie excepcional) de machos expuestos a un aneuploidógeno y los marcadores expresados de dos progenies sucesivas no tratadas. Para lo cual se utilizó una metodología, conocida como Sex Chromosome Loss Test (SCLT), útil para detectar compuestos capaces de alterar tanto la integridad numérica (por no-disyunción y pérdida total), como la integridad estructural (pérdida parcial de cromosomas), es decir, actividad clastogénica y aneuploidogénica, y también para estudiar los posibles mecanismos de acción de los mutágenos sobre la integridad cromosómica y el aparato mitótico (Ramos Morales 1994). SCLT se basa en la alteración de los fenotipos esperados en una cruce dada, en la cual los parentales tienen genotipo conocido, para así servir como indicadores *in vivo* de eventos de pérdida parcial o total de cromosomas producidos por sustancias con actividad aneuploidogénica o clastogénica (Valencia y col. 1984; Mason y col. 1987; Ledezma Vaca 2006).

1.5. Colchicina

La colchicina es un citostático clasificado como aneuploidógeno (Bishop y col. 1996), el cual presenta carácter antimitótico ya que interfiere el ciclo celular impidiendo que los cromosomas se separen en la metafase, resultando en una división incorrecta. Este error se debe a que la colchicina presenta un efecto de inhibición de la formación de microtúbulos, despolimerizando la tubulina, impidiendo la correcta formación del huso acromático y la migración de las cromátidas hermanas hacia los polos de la célula (D. Voet y J. Voet 2006; Lacadena 1996) (Fig. 1.7); es por eso que es un compuesto ideal para establecer la relación entre machos expuestos y progenies no expuestas.

La colchicina se ha utilizado en la medicina para el tratamiento de diferentes enfermedades, aunque aún no se sabe exactamente el mecanismo de acción para cada una de ellas. Principalmente se utiliza para enfermedades relacionadas con articulaciones, como gota, en donde la colchicina aparentemente interrumpe la formación de cristales de urato (DrugBank 2016), así como la inhibición de la migración de leucocitos y otras células

inflamatorias, reduciendo la respuesta inflamatoria a dichos cristales (NIH-NCI [2016](#)). También es conocida por su potencial como droga “anti-cáncer”, ya que al inhibir a la tubulina, la célula queda arrestada en metafase, sin posibilidad de seguir dividiéndose (PubChem [2016](#); Kuo y col. [2004](#)).

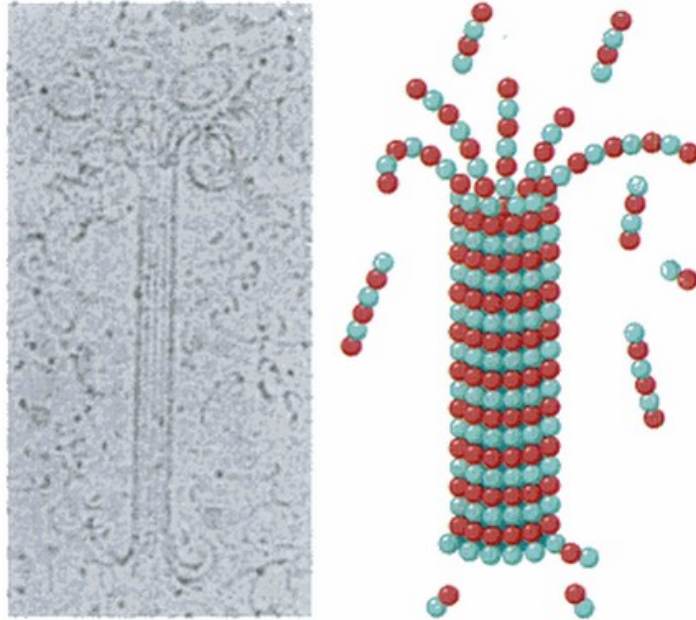


Fig. 1.7 Microfotografía electrónica de la despolimerización de un microtúbulo causada por colchicina (izquierda) y su representación gráfica (derecha) (Imagen tomada de D. Voet y J. Voet [2006](#)).

2. Justificación

En la actualidad la exposición ante agentes tóxicos es cada vez más frecuente, debido al constante desarrollo de productos aún no evaluados, y la manera de estudiar los efectos que éstos conllevan ha estado limitado a la primera generación, principalmente por el tiempo que tomaría estudiar generaciones en humanos. Aunado a esto, se habla de que el efecto provocado tiene más posibilidad de heredarse a la descendencia sobretodo cuando la madre es la que ha estado expuesta ante ciertos xenobióticos durante la gestación, siendo menor cuando el macho fue el expuesto previo a la cópula, por lo que ha sido poco estudiado si el impacto al macho por un compuesto puede alcanzar más de una generación.

Es por estas razones que es importante desarrollar metodologías que permitan establecer si un compuesto tóxico al que se expone a un macho, es capaz de dañar a la primera generación, y a las siguientes.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

- Establecer la relación de biomarcadores de toxicidad y genotoxicidad entre machos de *Drosophila melanogaster* expuestos al citostático colchicina, y dos progenies sucesivas no expuestas.

3.2. Objetivos particulares

- Comparar la sobrevivencia de machos y^2w^a/B^sYy^+ entre tratados y no tratados con colchicina, así como la proporción sexual.
- Comparar los biomarcadores de progenie promedio, proporción sexual y fertilidad de la F₁ y la F₂ no expuestas.
- Identificar progenie excepcional versus progenie regular de la F₁ y la F₂ no expuestas.

4. Hipótesis

El tratamiento de machos y^2w^a/B^SYy^+ con el aneuploidógeno colchicina (CO) modificará la frecuencia de pérdida cromosómica en dos generaciones sucesivas (F_1 y F_2).

5. Metodología

5.1. Cruzas y marcadores

Se utilizó un sistema de cruzas que permitió detectar la no-disyunción y la pérdida parcial y/o total de cromosomas sexuales de *Drosophila melanogaster*. De esta manera, se distinguió entre la progenie regular de la progenie excepcional (aquella con fenotipo resultante de algún evento de no-disyunción, pérdida parcial o total de cromosomas sexuales) en la primera y segunda generación filial. Para distinguir entre los fenotipos, se utilizaron marcadores morfológicos para el color del cuerpo y el color y la forma de los ojos de la mosca, y de acuerdo a las relaciones alélicas de dichos marcadores, se observó la presencia o ausencia de los mismos.

Los marcadores morfológicos fueron los siguientes:

- y : El locus *yellow* está ubicado en el cromosoma X (1-0.0; Lindsley y Zimm [1992](#)). Este locus controla el patrón de pigmentación de la cutícula del adulto y de las partes bucales de la cutícula larvaria. Las mutaciones del locus y pertenecen a dos clases de fenotipos, y^1 presenta una total pérdida de pigmentación de todas las piezas de la cutícula (Chia y col. [1986](#)), observándose el cuerpo amarillo, sedas pardas con puntas amarillas, venas y tricomas de las alas amarillos (Ledezma Vaca [2006](#)) (Fig. [5.1](#), A).
- y^2 : Es un alelo del locus y , la segunda clase de fenotipo, que muestra un patrón

de pigmentación específico (Chia y col. 1986). Se observa el cuerpo amarillo, sedas silvestres, es decir, oscuras, y venas de las alas grisáceas (Lindsley y Zimm 1992) (Fig. 5.1, B).

- y^+ : Es el fenotipo silvestre. Muestra un cuerpo café oscuro, distinguible de los otros dos alelos. La relación de dominancia entre alelos es: $y^+ > y^2 > y$ (Fig. 5.1, C).
- w : El locus *white* está ubicado en el cromosoma X (1-1.5; Lindsley y Zimm 1992). El alelo w muestra la total ausencia de pigmentación en ojos, ocelos, vaina testicular y túbulos de Malpighi (Miyashita y Langley 1988), observándose los ojos totalmente blancos (Fig. 5.1, D).
- w^a : Es un alelo del locus w llamado *white-apricot*, que muestra un color durazno (naranja-amarillo) (Mount y col. 1988). La pigmentación intermedia se debe al número de cargas y a la compensación de éstas (Lindsley y Zimm 1992). La relación de dominancia entre alelos es: $w^+ > w^a$, siendo el primero el fenotipo silvestre con ojos rojos (Fig. 5.1, E).
- B^S : El locus B^S , llamado *Bar of Stone* está ubicado en el cromosoma X (1-57.0). Es totalmente dominante sobre el alelo silvestre y modifica la forma del ojo a una barra vertical formada de aproximadamente 90 omatidias en los machos y 70 en las hembras (Ledezma Vaca 2006) (Fig. 5.1, F).
- f : El locus f , llamado *forked* se encuentra en el cromosoma X (1-56.7). Las sedas o tricomas silvestres se presentan en forma recta, sin embargo, la presencia del alelo *forked* las afecta, haciendo que se presenten de forma curvada. La magnitud de la curvatura depende del alelo que se presente, habiendo más de 35 alelos descritos. Estos alelos son recesivos ante el silvestre: $f^+ > f$ (Ledezma Vaca 2006) (Fig. 5.1, G).

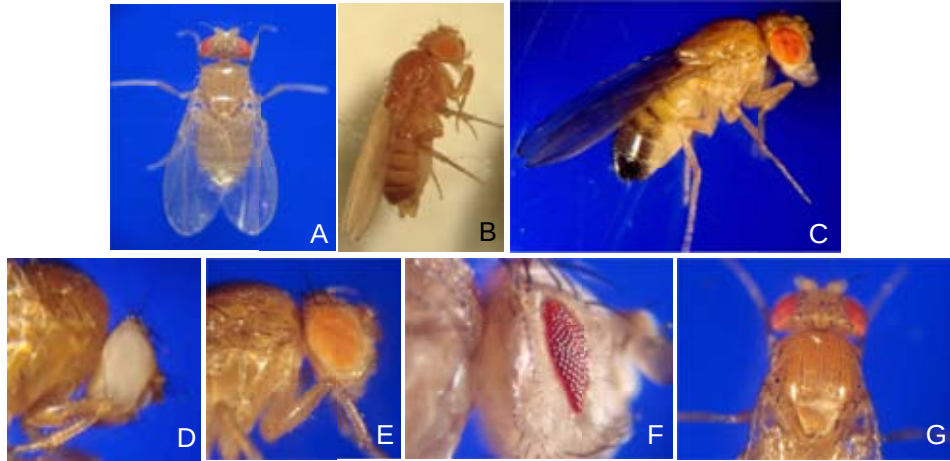


Fig. 5.1 Fenotipo de marcadores utilizados en la prueba de clastogenia SCLT modificada. A: *yellow*. B: *yellow*². C: *yellow*⁺. D: *white*. E: *white-apricot*. F: Barra de Stone. G: *forked* (Fotografías proporcionadas por el Banco de Moscas de la Facultad de Ciencias).

5.1.1. Líneas de moscas

Se utilizaron cuatro tipos de líneas:

- *Hembras*: Las hembras presentan homocigosis para los genes *yw/yw*, y no tienen ninguna alteración en los cromosomas. Su fenotipo es cuerpo amarillo, sedas pardas con puntas amarillas, venas y tricomas de las alas amarillos, y ojos totalmente blancos (Fig. 5.2 y 5.3). De esta línea se utilizaron las hembras para la crucea experimental.
- *Machos*: La línea de machos utilizados en la crucea experimental se construyó a partir de las hembras de la línea y^2w^a/y^2w^a y de los machos de la línea $\text{♀♀} = yf/B^SYy^+$ X $\text{♂♂} X^{C2}yf/B^SYy^+$. El genotipo objetivo es el cromosoma Y compuesto con dos translocaciones del X, una en el brazo corto (y^+) y otra en el brazo largo (B^S), y el cromosoma X con los alelos y^2 y w^a . El genotipo final de los machos es: y^2w^a/B^SYy^+ y para construirlo se utilizaron dos líneas diferentes (Fig. 5.3) (Anexo 1):
 - *Línea y^2w^a/y^2w^a* : Presentan los genes y^2 y w^a . Las hembras son homocigóticas (y^2w^a/y^2w^a) y los machos hemicingóticos (y^2w^a/Y). Su fenotipo es cuerpo

amarillo, sedas silvestres, venas de las alas grisáceas y ojos color durazno (Fig. 5.2 y 5.3).

- *Línea* ♀♀ = $yf/B^S Y y^+$ X ♂♂ $X^{C2} yf/B^S Y y^+$: En esta línea los machos portan el cromosoma Y compuesto con dos translocaciones del X, una en el brazo corto (y^+) y otra en el brazo largo (B^S), y el cromosoma X en anillo, portando los alelos y y f . Su genotipo es $X^{C2} yf/B^S Y y^+$. Y las hembras de esta línea tienen dos cromosomas X unidos en forma reversa y con un solo centrómero, y son homocigóticas para los genes y y f . Mientras que el cromosoma Y es como el de los machos. Su genotipo es $XXY = yf/B^S Y y^+$. Tanto hembras como machos presentan el mismo fenotipo, que es el cuerpo color silvestre, sedas en horquilla y ojos en barra y rojos (Fig. 5.2 y 5.3).
- *Línea de referencia*: Se utilizó como línea de referencia a Canton-S, cuyo fenotipo es el silvestre para todos los caracteres (Fig. 5.2).

5.2. Sincronización de cultivos y obtención de larvas

Se utilizó como base el procedimiento de la prueba de pérdida total o parcial de cromosomas sexuales, SCLT (Sex chromosome loss test) para *Drosophila melanogaster*, el cual se modificó para poder observar la diferencia entre progenie regular de progenie excepcional hasta la segunda generación filial.

Hembras vírgenes $y^2 w^a / y^2 w^a$ se cruzaron con machos $X^{C2} yf / B^S Y y^+$. A los cinco días, el cultivo se trasvasó a recipientes con medio fresco enriquecido con levadura por un período de 8 h para obtener huevos con una diferencia de edad de ± 4 h para producir machos con genotipo $y^2 w^a / B^S Y y^+$ (machos de interés para tratamiento). A los tres días se extrajeron larvas de tercer estadio (72 ± 4 horas) por el método de Nöthiger 1970, que consiste en generar un gradiente de densidad con una solución de sacarosa al 20 % permitiendo así que las larvas se separen del medio de cultivo, con un mínimo de estrés. Se realizó el mismo





Línea	Genotipo	Fenotipo
<i>Hembras</i>	yw / yw	 Cuerpo amarillo, sedas pardas con puntas amarillas, venas y tricomas de las alas amarillos y ojos blancos
<i>Machos</i>	189 y^2w^a / y^2w^a	 Cuerpo amarillo, sedas silvestres, venas de las alas grisáceas y ojos color durazno
	4330 $Machos: X^{c2}yf / B^SYy^+$ $Hembras: =yf / B^SYy^+$	 Ojos en barra y sedas en horquilla
<i>De referencia</i>	<i>Silvestre</i> (<i>Canton-S</i>)	 Cuerpo oscuro, sedas oscuras, ojos redondos y de color rojo

Fig. 5.2 Líneas de *Drosophila melanogaster* utilizadas para la prueba de clastogenia SCLT modificada.

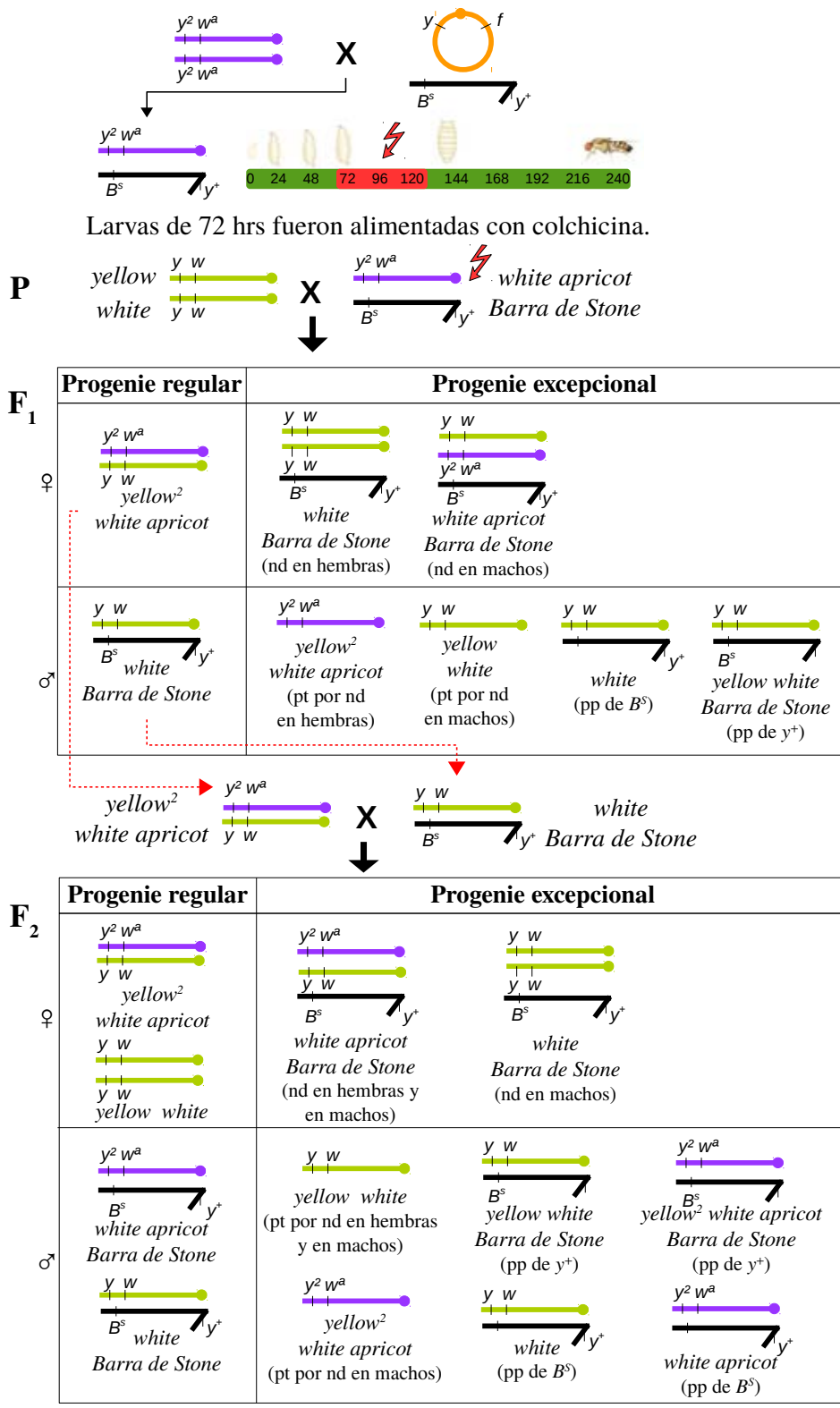


Fig. 5.3 Procedimiento experimental. En verde la línea de hembras(yw/yw); en morado la línea y^2w^a/y^2w^a ; en naranja con negro la línea $\text{♀♀} = \cdot yf/B^S Y y^+ \times \text{♂♂} X^{C2} yf/B^S Y y^+$.

procedimiento con la línea de referencia.

Grupos de aproximadamente 100 larvas se colocaron en tubos de vidrio con fondo plano conteniendo 1 g de medio instantáneo para mosca (Carolina Biological Supply) hidratado con 4.5 mL de la solución a probar o de agua destilada.

5.2.1. Tratamiento

A partir de una solución 0.2 mM de colchicina se obtuvieron 10 diluciones sucesivas que han mostrado actividad tóxica en *Drosophila melanogaster*: 1.25E-01, 4.69E-02, 3.13E-02, 1.56E-02, 8.06E-03, 4.88E-04, 2.52E-04, 1.53E-05, 1.19E-07 y 1.86E-09 mM (concentraciones tomadas del trabajo Muñoz-Hernández 2011) (Cuadro 5.1). El diluyente y testigo negativo fue agua destilada.

[Colchicina]			
mM	μ M	nM	pM
1.86E-09	0.00000186	0.00186	1.86
1.19E-07	0.000119	0.119	119
1.53E-05	0.0153	15.3	15 300
2.52E-04	0.252	252	252 000
4.88E-04	0.488	488	488 000
8.06E-03	8.06	8 060	8 060 000
1.56E-02	15.6	15 600	15 600 000
3.13E-02	31.3	31 300	31 300 000
4.69E-02	46.9	46 900	46 900 000
1.25E-01	125	125 000	125 000 000
0.2	200	200 000	200 000 000

Cuadro 5.1 Comparación de escalas de concentraciones de colchicina utilizadas.

Se realizaron 4 réplicas por concentración para la línea experimental y 3 para la línea de referencia. Las larvas permanecieron alimentándose del medio hasta el periodo de pupación, en donde se adhieren a las paredes del tubo y dejan de alimentarse del medio, por lo que fueron sometidas a un tratamiento subcrónico vía alimentación en larvas de 72

h de edad por un periodo de 48 h (72x48 h).

5.2.2. Desarrollo de la prueba SCLT modificada

Al emerger los adultos o imagos se cuantificó el número de hembras y machos para obtener la sobrevivencia promedio y la proporción sexual, tanto de la línea de referencia como de la línea experimental, separando a los machos de esta última (y^2w^a/B^SYy^+) para realizar la cruce progenitora con hembras vírgenes de la línea yw/yw no tratadas en una proporción 1:1 en tubos de plástico con fondo plano con medio estándar. Para cada concentración se analizaron al menos 40 parejas y su progenie.

Obtención de los resultados de la prueba SCLT modificada:

Se cuantificó el número de parejas que tuvieron hijos (fertilidad), y de éstas, la cantidad de progenie obtenida, registrando sexo y fenotipo para distinguir progenie excepcional de progenie regular, detectando los eventos de pérdida parcial de los marcadores en el cromosoma Y, principalmente, y la pérdida total del cromosoma X o Y. Además, se registraron moscas con alteraciones morfológicas. La progenie regular y excepcional esperada para la primera generación filial (F1) se muestra en la figura 5.4.

Para la obtención de la segunda generación filial (F₂) se cruzaron hembras y machos de la progenie regular F₁ x F₁. Se cuantificó la fertilidad de F₁, la progenie obtenida, proporción sexual y se distinguió progenie excepcional de progenie regular, detectando los eventos de pérdida parcial y pérdida total de cromosomas X o Y. La progenie F₂ regular y excepcional esperada se muestran en la figura 5.5, mientras que la progenie F₂ recombinante regular y excepcional esperada se muestran en la figura 5.6.

Los eventos genéticos terminales implican la pérdida de cromosomas, básicamente por efectos clastogénicos y aneuploidías provocadas por pérdida y/o no-disyunción de los cromosomas (Ramos Morales 1994). Estos posibles fenotipos permiten un seguimiento en la primera y segunda generación filial (F₁ y F₂).

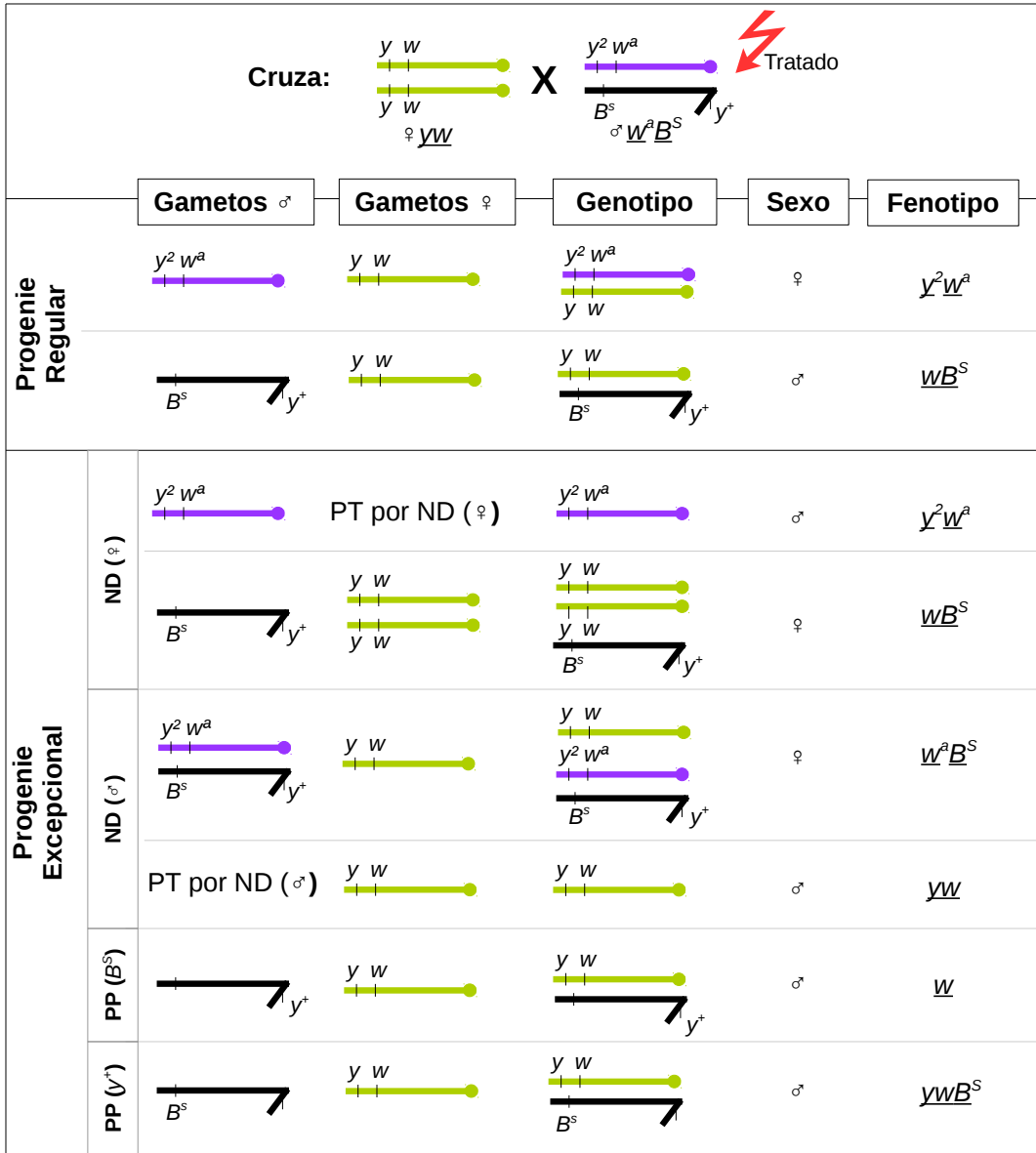


Fig. 5.4 Genotipo, sexo y fenotipo de la progenie F₁ regular y excepcional. ND: No-disyunción. PT: Pérdida total. PP: Pérdida parcial.

		Cruza:		X					
		$y^2 W^a$ $y W$ ♀ $y^2 W^a$	$y W$ $y W$ ♂ $W^a B^S$	$y W$ $y W$ ♂ $W^a B^S$	$y^2 W^a$ $y W$ ♀ $y^2 W^a$	$y W$ $y W$ ♂ $W^a B^S$	$y W$ $y W$ ♂ $W^a B^S$	$y W$ $y W$ ♂ $W^a B^S$	$y W$ $y W$ ♂ $W^a B^S$
		Gametos ♂	Gametos ♀	Genotipo	Sexo	Fenotipo			
Progenie Regular		$y W$	$y^2 W^a$	$y^2 W^a$ $y W$	♀	$y^2 W^a$			
		$y W$	$y W$	$y W$ $y W$	♀	$y W$			
		B^S y^+	$y^2 W^a$	$y^2 W^a$ B^S y^+	♂	$W^a B^S$			
		B^S y^+	$y W$	$y W$ B^S y^+	♂	$W B^S$			
Progenie Excepcional	ND (♀)	$y W$	PT por ND (♀)	$y W$	♂	$y W$			
		B^S y^+	$y^2 W^a$ $y W$	$y^2 W^a$ $y W$ B^S y^+	♀	$W^a B^S$			
	ND (♂)	$y W$	$y^2 W^a$	$y^2 W^a$ $y W$ B^S y^+	♀	$W^a B^S$			
		B^S y^+	$y W$	$y W$ $y W$ B^S y^+	♀	$W B^S$			
			$y^2 W^a$	$y^2 W^a$	♂	$y^2 W^a$			
			$y W$	$y W$	♂	$y W$			
	PP (B^S)	B^S y^+	$y^2 W^a$	$y^2 W^a$ B^S y^+	♂	W^a			
		B^S y^+	$y W$	$y W$ B^S y^+	♂	W			
	PP (y^+)	B^S y^+	$y^2 W^a$	$y^2 W^a$ B^S y^+	♂	$y^2 W^a B^S$			
		B^S y^+	$y W$	$y W$ B^S y^+	♂	$y W B^S$			

Fig. 5.5 Genotipo, sexo y fenotipo de la progenie F₂ regular y excepcional. ND: No-disyunción. PT: Pérdida total. PP: Pérdida parcial.


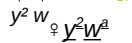



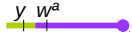




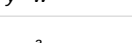

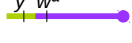









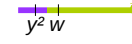
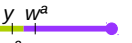


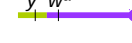










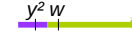


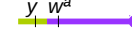












		Cruza:								
				\times						
		$y W^a$	$y^2 W$		$y W$	$B^s y^+$				
		σ	\varnothing		σ	\varnothing				
		Gametos σ	Gametos \varnothing	Genotipo	Sexo	Fenotipo				
Progenie Recombinante				 	\varnothing	$y W^a$				
				 	\varnothing	$y^2 W$				
				 	σ	$w^a B^s$				
				 	σ	$w B^s$				
Progenie Recombinante Excepcional	ND (\varnothing)		PT por ND (\varnothing)		σ	$y w$				
			 	  	\varnothing	$w^a B^s$				
	ND (σ)			 	\varnothing	$w^a B^s$				
		 		  	\varnothing	$w B^s$				
	PT por ND (σ)				σ	$y W^a$				
					σ	$y^2 W$				
	PP (B^s)			 	σ	w^a				
				 	σ	w				
	PP (y^+)			 	σ	$y W^a B^s$				
				 	σ	$y^2 W B^s$				

Fig. 5.6 Genotipo, sexo y fenotipo de progenie F₂ recombinante regular y excepcional. ND: No-disyunción. PT: Pérdida total. PP: Pérdida parcial.

5.3. Análisis estadístico

Para establecer la toxicidad del tratamiento se obtuvo el promedio de la sobrevivencia por tubo:

$$\text{Sobrevivencia promedio} = \frac{\sum_{i=1}^n \# \text{ total de moscas recobradas por tubo}_i}{n}$$

La fertilidad, que es la capacidad de un organismo para tener o no hijos, se calculó dividiendo el número de tubos sembrados que tuvieron hijos entre el número total de tubos sembrados. Para comparar la fertilidad de moscas provenientes de cada concentración con respecto a su testigo se utilizó una prueba de Z para proporciones ($\alpha=0.05$), y para establecer si existe asociación entre la fertilidad de machos tratados con la fertilidad de su descendencia se realizó una prueba de X^2 ($\alpha=0.05$).

$$\text{Fertilidad} = \frac{\text{Tubos sembrados con hijos}}{\text{Total de tubos sembrados}}$$

Se calculó el promedio de progenie por familia, tanto de los machos tratados como de la F_1 , sumando el total de la progenie de las familias y dividiéndolo entre el número de familias:

$$\text{Progenie promedio} = \frac{\sum_{i=1}^n \# \text{ total de progenie por tubo}_i}{n}$$

Para determinar si el tratamiento a los machos progenitores alteró el número de hembras y de machos recobrados, tanto en el tratamiento como en la F_1 y la F_2 , se calculó la proporción sexual. Ésta se obtuvo dividiendo el número total de hembras o machos recobrados por tubo, entre el número total de hembras y machos recobrados en ese tubo, para cada concentración de colchicina y su testigo:

$$Proporci3n\ sexual = \frac{\sum_{i=1}^n \# \text{ total de } \text{♀} \text{ o } \text{♂} \text{ por tubo}_i}{\# \text{ total de } \text{♀} \text{ y } \text{♂} \text{ por tubo}_i}$$

Para detectar diferencias significativas entre la sobrevivencia promedio, la progenie promedio y la proporci3n sexual con respecto a su propio testigo se utiliz3 un ANOVA ($\alpha=0.05$). Sin embargo, se realiz3 la prueba de igualdad de medias de grupos de Brown-Forsythe para saber si la prueba de ANOVA podr3a ser de una o de dos v3as. Una vez realizada la prueba de ANOVA correspondiente, en caso de salir diferencias significativas, se realiz3 una prueba de Dunnett para poder comparar todas las concentraciones con respecto a su propio testigo, y as3 determinar si las diferencias estaban relacionadas con el tratamiento.

La frecuencia de eventos excepcionales se obtuvo dividiendo el n3mero total de organismos con fenotipo excepcional entre el n3mero total de organismos recobrados:

$$Frecuencia\ de\ eventos\ excepcionales = \frac{\sum \text{ organismos excepcionales}}{\text{total de organismos}}$$

Para comparar los eventos excepcionales de las progenies F_1 y F_2 se obtuvo la frecuencia de progenie excepcional (FPE) corregida, restando a la frecuencia de eventos excepcionales (FEE) de cada concentraci3n, la frecuencia de eventos excepcionales (FEE) del testigo:

$$FPE = FEE \text{ por } [CO] - FEE \text{ del testigo}$$

Para determinar si exist3an diferencias significativas en la frecuencia de eventos excepcionales entre los lotes experimentales y su testigo correspondiente para cada una de las generaciones, se aplic3 una prueba de Z para proporciones ($\alpha=0.05$).

6. Resultados

Los resultados se analizaron conforme al orden en el que se fueron llevando a cabo las pruebas. Así, primero se evaluó la sobrevivencia al tratamiento de ambas líneas. Después se analizó el comportamiento de las dos generaciones consecutivas del macho tratado. A continuación, se analizó la fertilidad de la craza de la que se obtuvo la primera generación en comparación con la fertilidad de la craza de la que se obtuvo la segunda generación. Y para finalizar se analizó la progenie excepcional, las proporciones de sexo y la sobrevivencia en comparación con la progenie promedio de cada generación.

6.1. Toxicidad del tratamiento

La respuesta de los organismos al tratamiento con colchicina puede establecerse de diferentes maneras. Para evaluar si el compuesto tiene un efecto tóxico sobre los organismos se calculó el promedio de la sobrevivencia de las moscas por tubo (S).

La colchicina fue tóxica, tanto para las moscas silvestres como para la progenie de la craza de $\text{♀♀}y^2w^a/y^2w^aX\text{♂♂}X^{C2}yf/B^SYy^+$ (para producir a los machos y^2w^a/B^SYy^+), en las concentraciones mayores a 3.13E-02 mM (Cuadros 6.1, 6.2 y Figs. 6.1a y 6.2a, respectivamente). Se encontraron diferencias significativas en el promedio de sobrevivencia de las moscas tratadas con colchicina ($F_{9,44}=5.49$; $p < 0.0001$ para moscas Canton-S; $F_{9,66}=5.09$; $p < 0.0001$ para las moscas de la craza). La comparación de la proporción sexual de la línea de referencia y la experimental no presentó diferencias significativas.

CO [mM]	N	S ± ee	α	PS ♀ ± ee	α	PS ♂ ± ee	α
Testigo	429	61.29±5.64	-	0.50±0.03	-	0.50±0.03	-
1.86E-09	370	52.86±4.33	-	0.50±0.02	-	0.50±0.02	-
1.19E-07	467	66.71±8.26	-	0.52±0.03	-	0.48±0.03	-
1.53E-05	434	62.00±5.77	-	0.51±0.03	-	0.49±0.03	-
2.52E-04	226	75.33±10.17	-	0.50±0.02	-	0.50±0.02	-
4.88E-04	458	65.43±8.41	-	0.52±0.02	-	0.48±0.02	-
8.06E-03	199	66.33±9.74	-	0.52±0.02	-	0.48±0.02	-
1.56E-02	360	51.43±3.29	-	0.50±0.05	-	0.50±0.05	-
3.13E-02	89	29.67±7.62	*	0.46±0.07	-	0.54±0.07	-
4.69E-02	19	6.33±5.84	*	0.22±0.22	*	0.78±0.22	*
1.25E-01	0						

Cuadro 6.1 Supervivencia promedio y proporción sexual de moscas Canton-S tratadas con colchicina. *CO*, Colchicina; *N*, Número de moscas; *S*, Supervivencia promedio; *PS*, Proporción sexual promedio; *ee*, Error estándar; α , Pruebas de ANOVA y Dunnett. El * indica diferencias significativas $p < 0.05$.

CO [mM]	N	S ± ee	α	PS ♀ ± ee	α	PS ♂ ± ee	α
Testigo	845	84.50±9.23	-	0.57±0.02	-	0.43±0.02	-
1.86E-09	815	81.50±9.69	-	0.56±0.03	-	0.44±0.03	-
1.19E-07	705	70.50±5.81	-	0.51±0.02	-	0.49±0.02	-
1.53E-05	792	79.20±11.78	-	0.55±0.02	-	0.45±0.02	-
2.52E-04	284	71.00±12.09	-	0.60±0.03	-	0.40±0.03	-
4.88E-04	803	80.30±8.78	-	0.55±0.01	-	0.45±0.01	-
8.06E-03	215	53.75±9.59	-	0.63±0.08	-	0.37±0.08	-
1.56E-02	770	77.00±12.71	-	0.55±0.02	-	0.45±0.02	-
3.13E-02	50	12.50±5.69	*	0.45±0.17	-	0.55±0.17	-
4.69E-02	1	0.25±0.25	*				
1.25E-01	0						

Cuadro 6.2 Supervivencia promedio y proporción sexual de la progenie de la crucea ($\text{♀♀}y^2w^a/y^2w^a \times \text{♂♂}X^{C^2}yf/B^SYy^+$) tratada con colchicina. *CO*, Colchicina; *N*, Número de moscas; *S*, Supervivencia promedio; *PS*, Proporción sexual promedio; *ee*, Error estándar; α , Pruebas de ANOVA y Dunnett. El * indica diferencias significativas $p < 0.05$.

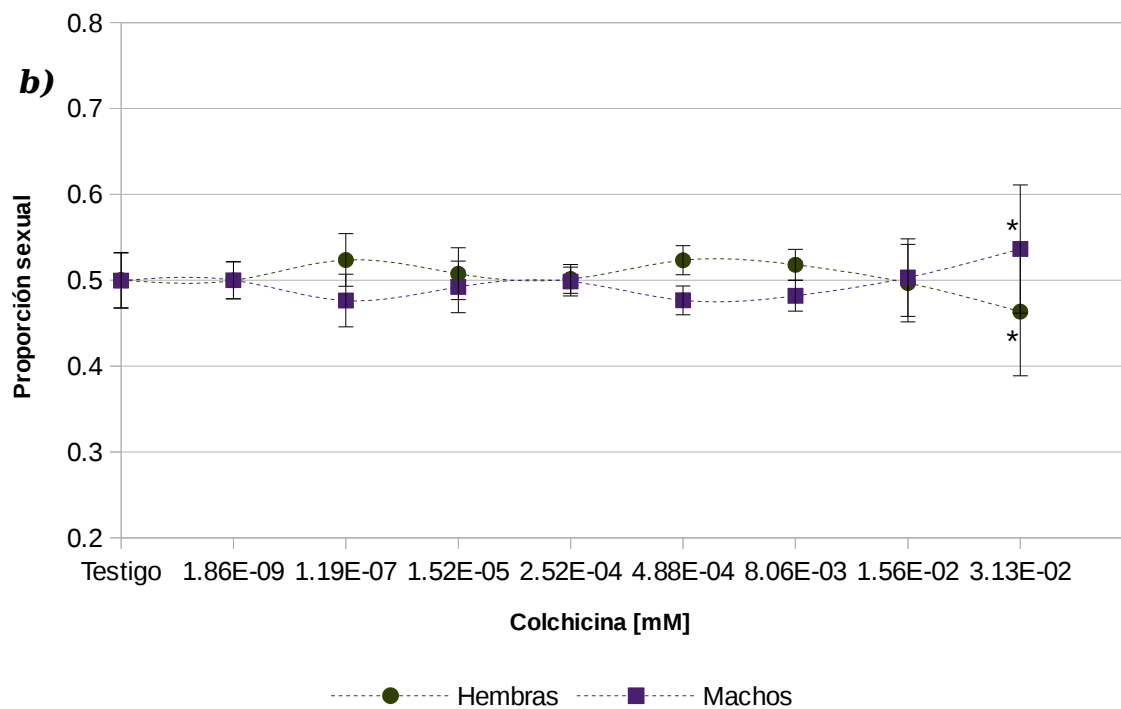
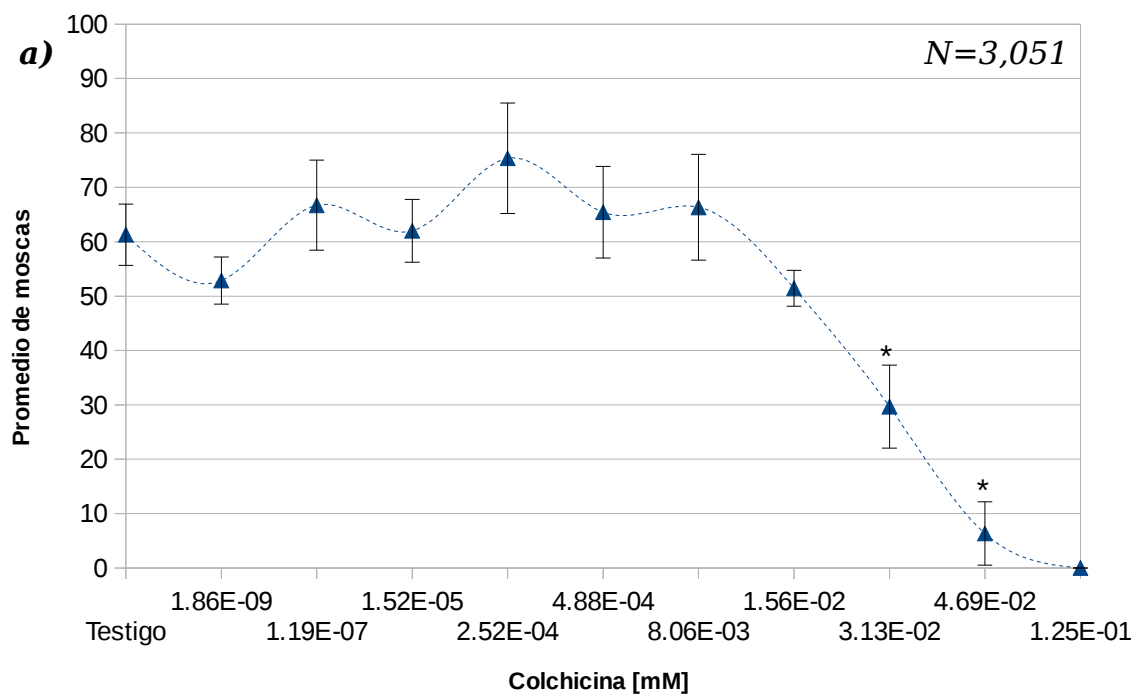


Fig. 6.1 a) Promedio de sobrevivencia de moscas Canton-S tratadas con colchicina durante el desarrollo larvario. b) Promedio de la proporción sexual de moscas Canton-S tratadas con colchicina durante el desarrollo larvario. El * indica diferencias significativas respecto al testigo ($p < 0.05$).

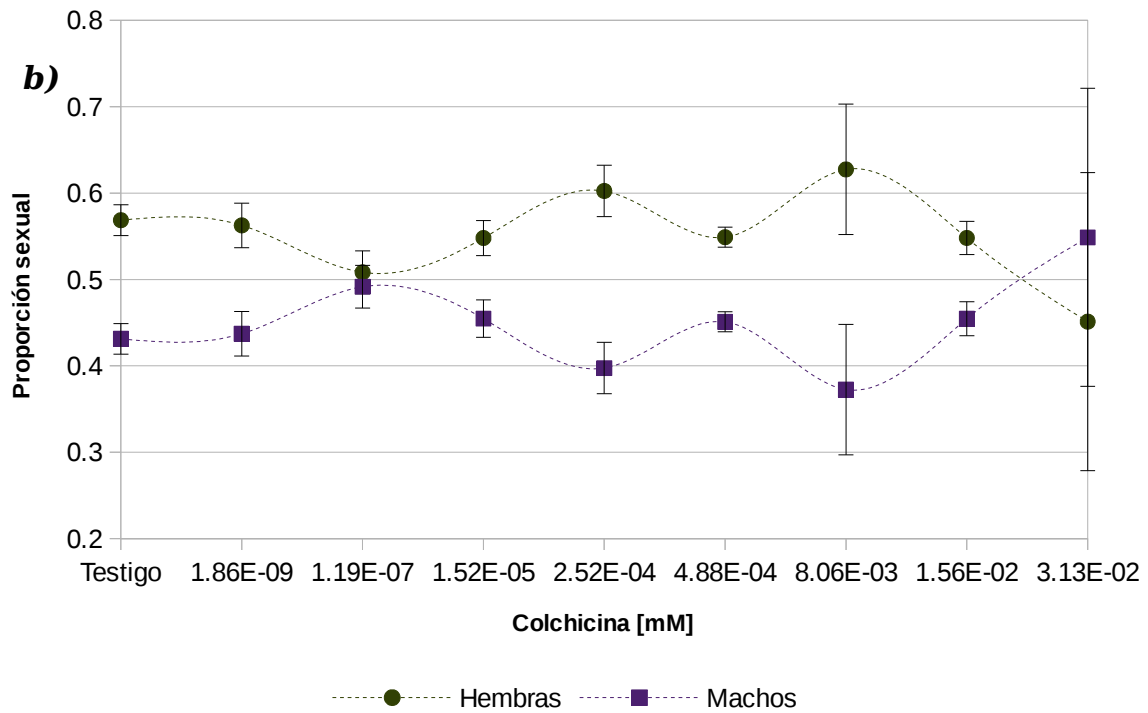
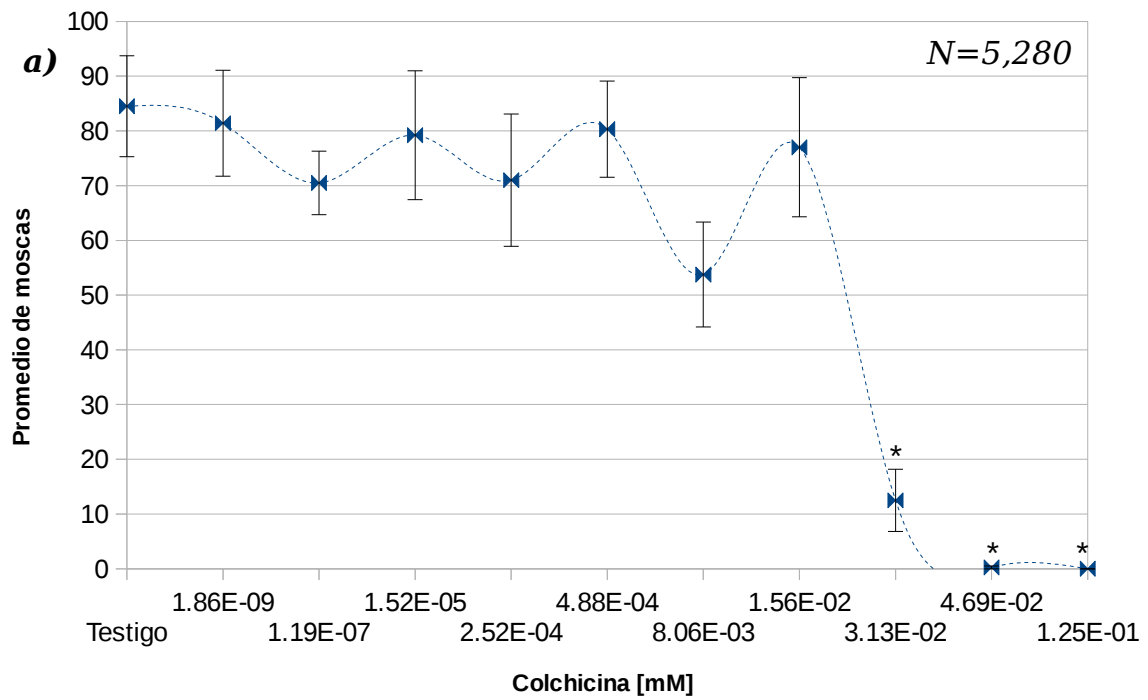


Fig. 6.2 Progenie de la cruce ($\varphi\varphi y^2 w^a / y^2 w^a \times \sigma\sigma X^{C2} y f / B^S Y y^+$) tratada con colchicina durante el desarrollo larvario. **a)** Promedio de sobrevivencia. **b)** Promedio de la proporción sexual. El * indica diferencias significativas respecto al testigo ($p < 0.05$).

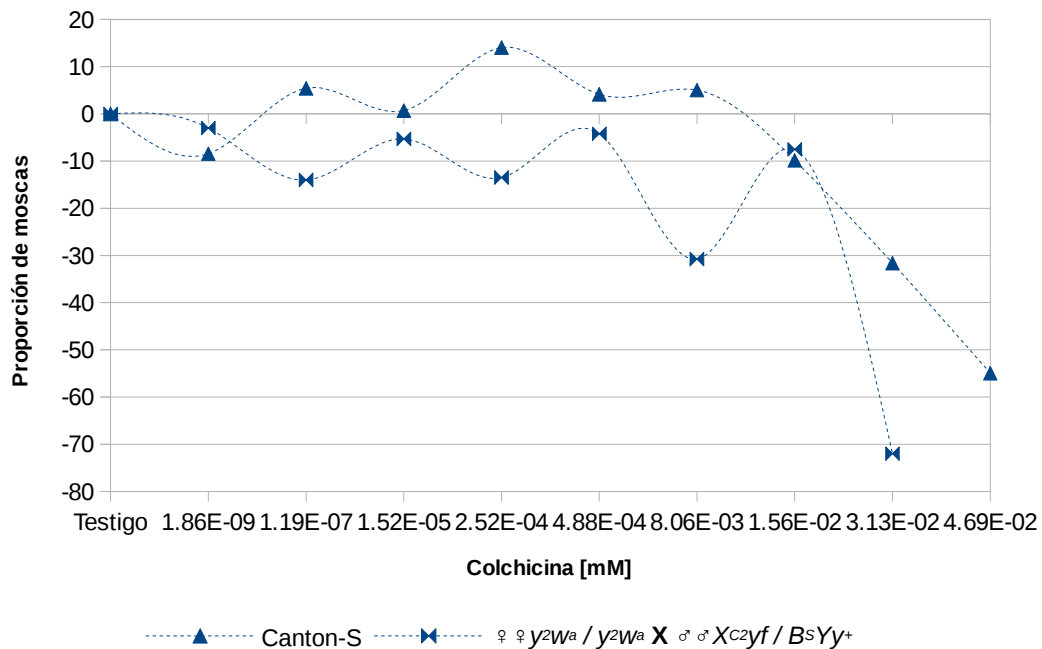


Fig. 6.3 Comparación de sobrevivencias al tratamiento con colchicina de moscas Canton-S y la cruce ($\varphi\varphi y^2w^a/y^2w^a \times \sigma\sigma X^{C2}yf/B^SYy^+$).

Para comparar el efecto del tratamiento en los dos grupos de moscas se obtuvo la diferencia de sobrevivencia de cada concentración con respecto a su propio testigo e incluyendo al testigo (el cual tendrá un valor de cero). En el caso de las moscas silvestres Canton S, en cinco de las concentraciones se recuperó un número de moscas similar o ligeramente mayor que el del testigo, mientras que para la progenie de la cruce ($\varphi\varphi y^2w^a/y^2w^a \times \sigma\sigma X^{C2}yf/B^SYy^+$) en todas las concentraciones se obtuvieron menos moscas que las obtenidas en el testigo (Fig. 6.3).

Por último, se obtuvieron individuos con fenotipo excepcional en la sobrevivencia de moscas al tratamiento con colchicina de la línea de machos y^2w^a/B^SYy^+ . Estos fenotipos fueron machos y^2w^a y y^2 , ginandromorfos y hembras w^a y B^S (Cuadro 6.3), sin embargo, éstos no fueron significativos en número ($Z_{0,05}=1.96, p < 0.05$).

CO [mM]	N	FE	Fenotipo de individuos				
			$\text{♀}B^S$	$\text{♀}w^a$	G	$\text{♂}y^2w^a$	$\text{♂}y^2$
Testigo	845	0.009 (8)	-	-	-	0.0095 (8)	-
1.86E-09	815	0.017 (14)	-	0.0012 (1)	0.0012 (1)	0.0123 (10)	0.0025 (2)
1.19E-07	705	0.020 (14)	0.0028 (2)	-	0.0028 (2)	0.0142 (10)	-
1.53E-05	792	0.019 (15)	-	-	-	0.0177 (14)	0.0013 (1)
2.52E-04	284	0.014 (4)	-	-	0.0035 (1)	0.0106 (3)	-
4.88E-04	803	0.019 (15)	0.0025 (2)	-	0.0025 (2)	0.0112 (9)	0.0025 (2)
8.06E-03	215	0.014 (3)	-	-	-	0.0139 (3)	-
1.56E-02	770	0.008 (6)	0.0013 (1)	-	-	0.0065 (5)	-
3.13E-02	50	0.020 (1)	-	-	-	0.0200 (1)	-
4.69E-02	1	0					
1.25E-01	0						

Cuadro 6.3 Frecuencia y número de moscas con fenotipo excepcional en la progenie de la crucea ($\text{♀}\text{♀}y^2w^a/y^2w^a \times \text{♂}\text{♂}X^{C^2}yf/B^SYy^+$). CO, Colchicina; N, Número de moscas; FE, Frecuencia y total de organismos con fenotipo excepcional; G, Ginandromorfo.

CO [mM]	N	P ± ee	α	PS ♀ ± ee	α	PS ♂ ± ee	α
Testigo	5452	92.41±6.81	-	0.52±0.01	-	0.48±0.01	-
1.86E-09	4238	81.50±6.35	-	0.57±0.02	-	0.43±0.02	-
1.19E-07	4067	71.35±5.42	-	0.56±0.01	-	0.44±0.01	-
1.53E-05	3290	58.75±4.99	*	0.54±0.01	-	0.46±0.01	-
2.52E-04	3811	95.28±5.83	-	0.53±0.01	-	0.47±0.01	-
4.88E-04	5021	91.29±7.59	-	0.51±0.01	-	0.49±0.01	-
8.06E-03	2225	76.72±10.06	-	0.51±0.03	-	0.49±0.03	-
1.56E-02	1090	57.37±10.06	*	0.49±0.02	-	0.51±0.02	-

Cuadro 6.4 Progenie F_1 promedio por familia y proporción sexual recobrada de la cruce de machos tratados y^2w^a/B^SYy^+ , con hembras vírgenes yw/yw . *CO*, Colchicina; *N*, Número de moscas; *P*, Progenie promedio por familia; *PS*, Proporción sexual promedio; *ee*, Error estándar; *α*, Pruebas de ANOVA y Dunnett. El * indica diferencias significativas $p < 0.05$.

6.2. Primera generación

Una vez tratadas las larvas, los machos y^2w^a/B^SYy^+ fueron cruzados con hembras vírgenes de la línea de hembras yw/yw . Los machos tratados con colchicina a una concentración de 0.0313 mM no tuvieron progenie, presentando un efecto de esterilidad. Para el resto, se calculó la progenie promedio por tubo y la proporción sexual. Se encontraron diferencias significativas en la progenie promedio en las concentraciones 1.52E-05 y 1.56E-02 mM con respecto a la del testigo ($F_{7,359}=4.38$; $p < 0.001$), no así para la proporción sexual (Cuadro 6.4 y Fig. 6.4).

La figura 6.5 y el cuadro 6.5 muestran la frecuencia de progenie excepcional por tipo de evento. Se confirmaron diferencias significativas con respecto a su testigo en eventos producidos por la no-disyunción de machos (hembras w^aB^S) en las concentraciones 1.19E-07 y 1.56E-02 mM, y en la concentración 1.56E-02 mM (machos yw) ($Z_{0,05}=1.96$; $p < 0.05$).

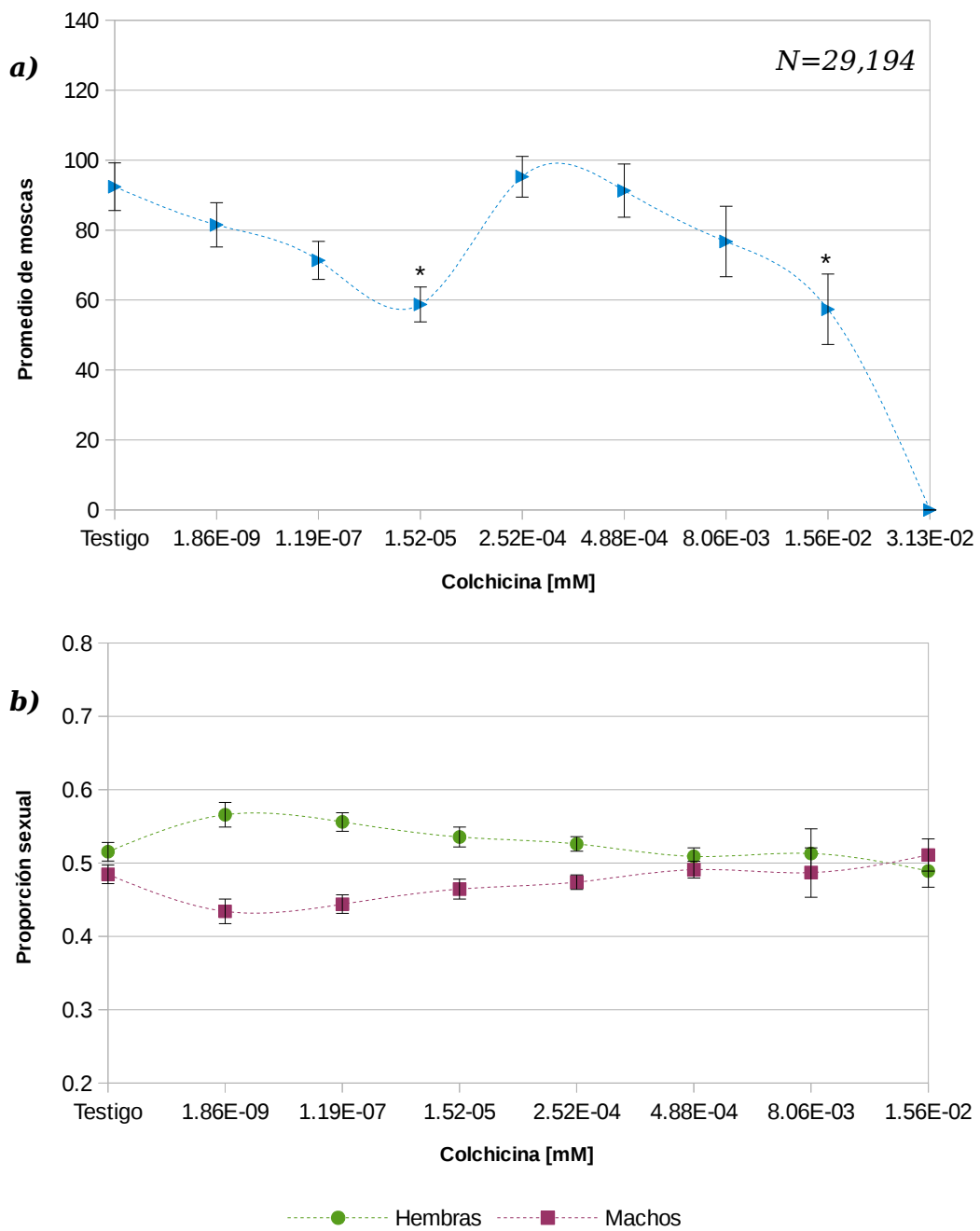


Fig. 6.4 Cruza de machos tratados y^2w^a/B^SYy^+ , con hembras vírgenes yw/yw . **a)** Progenie F_1 promedio por familia recobrada. **b)** Promedio de la Proporción sexual. El * indica diferencias significativas respecto al testigo ($p < 0.05$).

CO [mM]	Progenie regular				Progenie excepcional								Total	
	♀♀		♂♂		ND(♀)		ND(♂)		PP(B^S)		PP(y^+)			T
	y^2w^a	wB^S	wB^S	wB^S	♀♀	♂♂	♀♀	♂♂	♂♂	w	ywB^S	ywB^S		
Testigo	2813	2631	0.0004 (2)	0.0004 (2)	-	0.0007 (4)	-	-	-	-	-	-	8	5452
1.86E-09	2274	1958	0.0002 (1)	0.0007 (3)	0.0002 (1)	0.0002 (1)	0.0002 (1)	-	-	-	-	-	5	4238
1.19E-07	2249	1806	-	0.0002 (1)	0.0010 (4)	0.0015 (6)	-	0.0002 (1)	-	0.0002 (1)	-	-	12	4067
1.53E-05	1734	1545	0.0006 (2)	0.0015 (5)	-	0.0009 (3)	0.0003 (1)	-	-	-	-	-	11	3290
2.52E-04	1981	1825	-	-	0.0005 (2)	0.0008 (3)	-	-	-	-	-	-	5	3811
4.88E-04	2605	2408	-	-	0.0002 (1)	0.0008 (4)	0.0006 (3)	-	-	-	-	-	8	5021
8.06E-03	1104	1119	-	0.0004 (1)	-	0.0004 (1)	-	-	-	-	-	-	2	2225
1.56E-02	533	550	0.0009 (1)	0.0009 (1)	0.0009 (1)	0.0037 (4)	-	-	-	-	-	-	7	1090
3.13E-02	0	0											0	0

Cuadro 6.5 Progenie F₁ recobrada de la cruza de machos tratados y^2w^a/B^SYy^+ , con hembras vírgenes yw/yw . CO, Colchicina; ND, No-disyunción; PP, Pérdida parcial; T, Total.

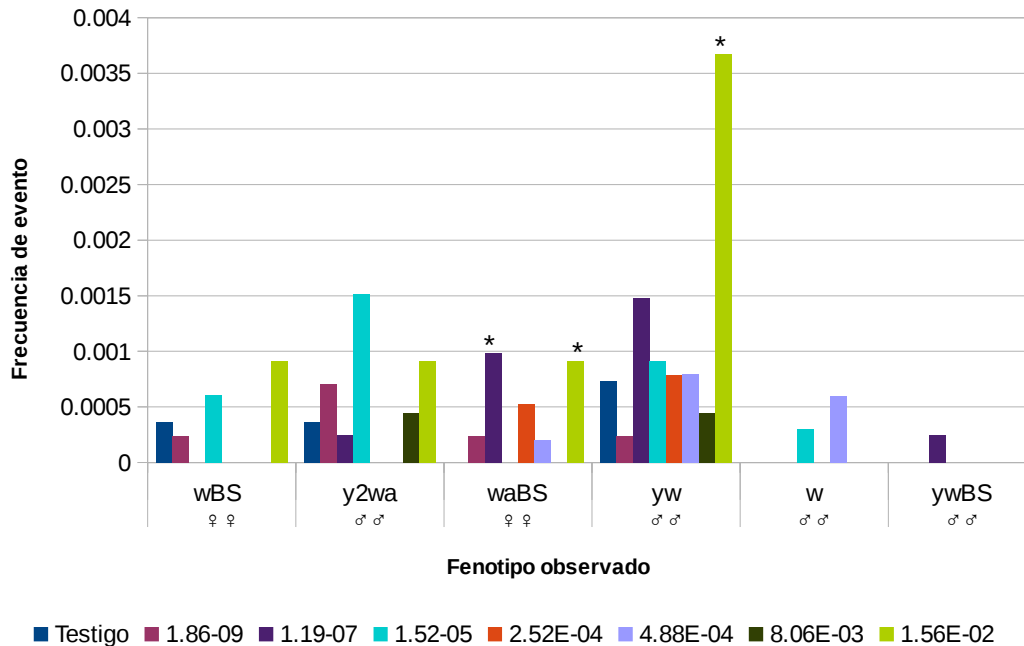


Fig. 6.5 Frecuencia de fenotipos excepcionales observados provenientes de eventos de no-disyunción o pérdida parcial de cromosomas en la cruce de machos tratados y^2w^a/B^SYy^+ , con hembras vírgenes yw/yw . El * indica diferencias significativas respecto a su propio testigo ($p < 0.05$).

6.3. Segunda generación

Machos yw/B^SYy^+ fueron cruzados con hembras vírgenes yw/y^2w^a , ambos provenientes de la progenie F_1 regular para obtener la F_2 . Al comparar la progenie promedio por tubo, se encontraron diferencias significativas en las concentraciones $8.06E-03$ y $1.56E-02$ mM con respecto a la del testigo ($F_{7,394}=7.73$; $p < 0,0001$). No se detectaron diferencias en la proporción sexual promedio (PS) (Cuadro 6.6 y Fig. 6.6).

CO [mM]	N	P \pm ee	α	PS φ \pm ee	α	PS σ \pm ee	α
Testigo	6319	111.04 \pm 6.02	-	0.54 \pm 0.01	-	0.46 \pm 0.01	-
1.86E-09	6234	103.90 \pm 4.86	-	0.55 \pm 0.01	-	0.45 \pm 0.01	-
1.19E-07	6161	104.42 \pm 6.21	-	0.54 \pm 0.01	-	0.46 \pm 0.01	-
1.53E-05	5322	88.70 \pm 7.47	-	0.54 \pm 0.01	-	0.46 \pm 0.01	-
2.52E-04	4745	121.67 \pm 8.48	-	0.57 \pm 0.01	-	0.43 \pm 0.01	-
4.88E-04	5470	92.71 \pm 5.00	-	0.53 \pm 0.01	-	0.47 \pm 0.01	-
8.06E-03	3098	79.44 \pm 8.42	*	0.56 \pm 0.02	-	0.44 \pm 0.02	-
1.56E-02	1438	49.59 \pm 9.45	*	0.55 \pm 0.03	-	0.45 \pm 0.03	-

Cuadro 6.6 Progenie F₂ promedio y proporción sexual promedio recobradas de la cruce de progenie regular de la primer generación (F₁). *CO*, Colchicina; *N*, Número de moscas; *P*, Progenie promedio por tubo; *PS*, Proporción sexual promedio; *ee*, Error estándar; α , Pruebas de ANOVA y Dunnett. El * indica diferencias significativas $p < 0.05$.

El cuadro 6.7 muestra los cuatro fenotipos que corresponden a la progenie regular, los dos fenotipos producidos por eventos de recombinación catalogados como progenie excepcional (debido a que un evento recombinante puede responder a una reparación de ruptura de la doble hélice del ADN), además muestra el total de la frecuencia de todos los posibles fenotipos excepcionales. El cuadro 6.8 muestra el resto de los posibles fenotipos (doce) correspondientes a la categoría de progenie excepcional, entre los que se encuentran no-disyunción en hembras o en machos y pérdida parcial en machos.

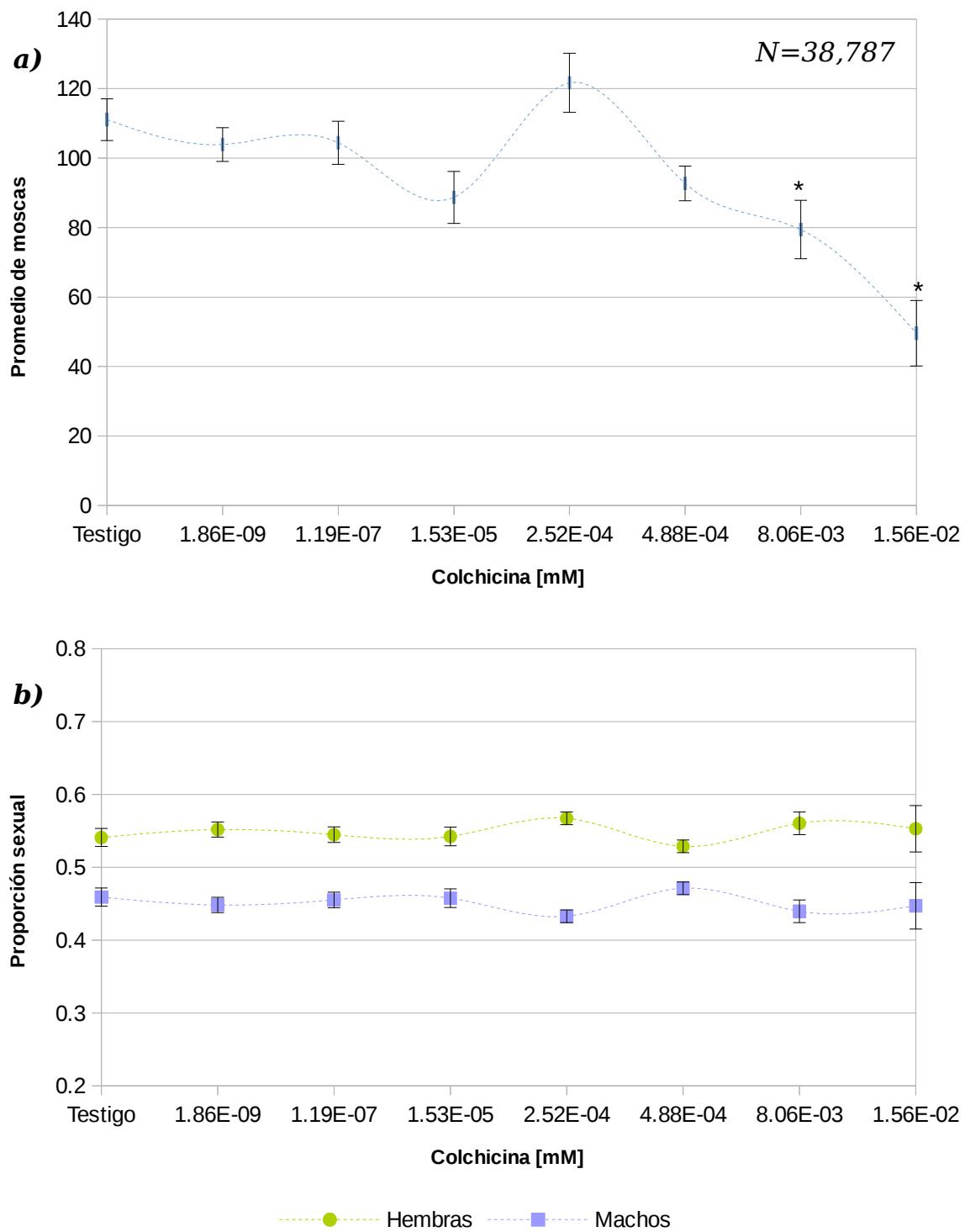


Fig. 6.6 a) Progenie F₂ promedio recobrada de la cruz de progenie regular de la F₁. b) Promedio de la Proporción sexual de moscas recobradas de la cruz de progenie regular de la F₁. El * indica diferencias significativas respecto al testigo ($p < 0.05$).

CO [mM]	Progenie regular				Progenie excepcional			PT
					Recombinantes		PET	
	♀♀	♀♀	♂♂	♂♂	♀♀	♀♀		
	yw	y^2w^a	wB^S	w^aB^S	yw^a	y^2w		
Testigo	1746	1695	1423	1438	0.00032 (2)	0.00127 (8)	0.0027 (17)	6319
1.86E-09	1691	1705	1413	1412	0.00016 (1)	0.00032 (2)	0.0021 (13)	6234
1.19E-07	1587	1679	1454	1415	0.00016 (1)	0.00162 (10)	0.0042 (26)	6161
1.53E-05	1368	1432	1298	1208	0.00038 (2)	0.00150 (8)	0.0030 (16)	5322
2.52E-04	1323	1328	1037	1046	0.00042 (2)	0.00063 (3)	0.0023 (11)	4745
4.88E-04	1395	1443	1285	1331	0.00018 (1)	0.00165 (9)	0.0029 (16)	5470
8.06E-03	815	841	695	738	0.00032 (1)	0.00065 (2)	0.0029 (9)	3098
1.56E-02	368	409	348	309	0.00070 (1)	0	0.0028 (4)	1438

Cuadro 6.7 Progenie F₂ regular y recombinante recobrada de la cruce de progenie regular de la F₁. *CO*, Colchicina; *PT*, Progenie total; *PET*, Progenie excepcional total.

[CO]	Progenie excepcional																					
	ND(♀) y ND(♂)				ND(♂)				PP(B ^S)				PP(y ⁺)									
	♀♀	♀♀	♂♂	♂♂	wB ^S	♂♂	♂♂	♂♂	♂♂	♂♂	w	♂♂	♂♂	♂♂	♂♂	♂♂	♂♂	♂♂	♂♂	♂♂	♂♂	
w ^a B ^S	yw	y ² w ^a	yw ^a	y ² w	w	w ^a	y ² w ^a B ^S	yw ^a B ^S	y ² wB ^S	y ² w ^a B ^S	yw ^a B ^S	y ² w ^a B ^S	yw ^a B ^S	y ² wB ^S	y ² w ^a B ^S	yw ^a B ^S	y ² wB ^S	y ² w ^a B ^S	yw ^a B ^S	y ² wB ^S	y ² w ^a B ^S	
Testigo	0	0.00079	0	0.00032	0	0	0	0.00032	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1.86E-09	(2)	(8)	(5)	(2)	0	0.00016	0	0.00016	0	0.00016	0	0.00032	0.00016	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1.19E-07	(2)	(3)	(1)	(1)	0.00016	0.00081	0.00016	0	0	0	0	0.00016	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1.53E-05	(2)	(5)	(5)	(1)	(1)	0	0.00019	0	0	0	0.00038	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.52E-04	(1)	(1)	(1)	(2)	0	0.00042	0	0	0	0	0	0.00021	0	0	0	0.00021	0	0	0.00021	0	0	0
4.88E-04	0	0.00073	0	0.00018	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00018	0	0	0	0	0	0
8.06E-03	0.00032	0	0	0.00129	0.00032	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1.56E-02	0	0.00070	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00139	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		(1)										(2)										

Cuadro 6.8 Progenie F₂ excepcional recobrada de la cruz de progenie regular de la F₁. CO, Colchicina; ND, No-disyunción; PP, Pérdida parcial.

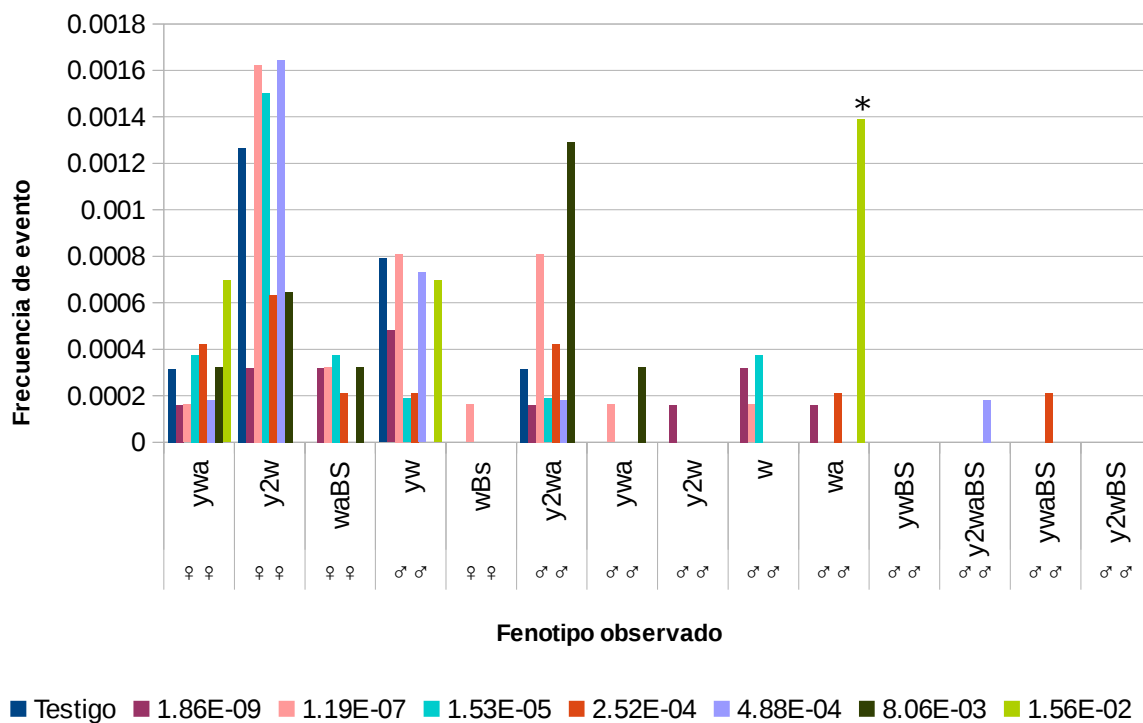


Fig. 6.7 Frecuencia de fenotipos F₂ observados de progenie excepcional provenientes de eventos de recombinación, no-disyunción o pérdida parcial de cromosomas en la cruce de progenie regular de la F₁. El * indica diferencias significativas respecto al testigo ($p < 0.05$). Nótese la diferencia en escala respecto a la figura 6.5.

No se encontraron diferencias significativas entre la progenie excepcional recuperada en el testigo con respecto a las demás concentraciones ($Z_{0,05}=1.96$; $p > 0,05$). Sin embargo, al desglosar la progenie excepcional por el tipo de evento genético, se encontraron diferencias significativas con respecto a su testigo en la frecuencia de machos w^a , que se originan por la pérdida parcial de B^S en el brazo largo del cromosoma Y, en la concentración 1.56E-02 mM ($Z_{0,05}=1.96$; $p < 0,05$) (Fig. 6.7).

6.4. Progenie excepcional entre F_1 y F_2

Para poder hacer la comparación de progenie excepcional tanto de la primera como de la segunda generación, se agruparon los fenotipos por tipo de evento, resultando en la comparación de la frecuencia de no-disyunción y la comparación de pérdidas parciales entre F_1 y F_2 . Dado que siempre hay eventos que ocurren por azar, se le restó el valor de los eventos ocurridos en el testigo al valor de eventos ocurridos por las concentraciones. A este valor le llamamos *frecuencia de progenie excepcional corregida* (Cuadro 6.9 y Fig. 6.8). Se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de no-disyunción entre F_1 y F_2 en las concentraciones 1.53E-05 y 1.56E-02 mM, mientras que en pérdidas parciales únicamente hubo diferencias significativas en la concentración 1.56E-02 mM de la segunda generación con respecto a su testigo ($Z_{0,05}=1.96$, $p < 0.05$).

[Colchicina]	Frecuencia de Progenie Excepcional Corregida					
	ND F_1	ND F_2	α	PP F_1	PP F_2	α
Testigo	0	0	-	0	0	
1.86E-09	-5.16E-05	1.51E-05	-	0	4.81E-04	-
1.19E-07	1.24E-03	1.16E-03	-	2.46E-04	1.62E-04	-
1.53E-05	1.57E-03	-3.56E-04	*	3.04E-04	3.76E-04	-
2.52E-04	-1.55E-04	-2.65E-04	-	0	4.21E-04	-
4.88E-04	-4.72E-04	-1.94E-04	-	5.97E-04	1.83E-04	-
8.06E-03	-5.68E-04	8.29E-04	-	0	0	-
1.56E-02	4.95E-03	-4.12E-04	*	0	1.39E-03	+

Cuadro 6.9 Frecuencia de progenie excepcional corregida correspondiente a no-disyunción y pérdidas parciales recuperadas en la primera y segunda generación, después de haber tratado al macho progenitor con colchicina. *ND*, No-disyunción; *PP*, Pérdida parcial; α , Prueba de Z; *, diferencias significativas entre F_1 y F_2 ; +, diferencias significativas de F_2 con respecto a su testigo, $p < 0.05$.

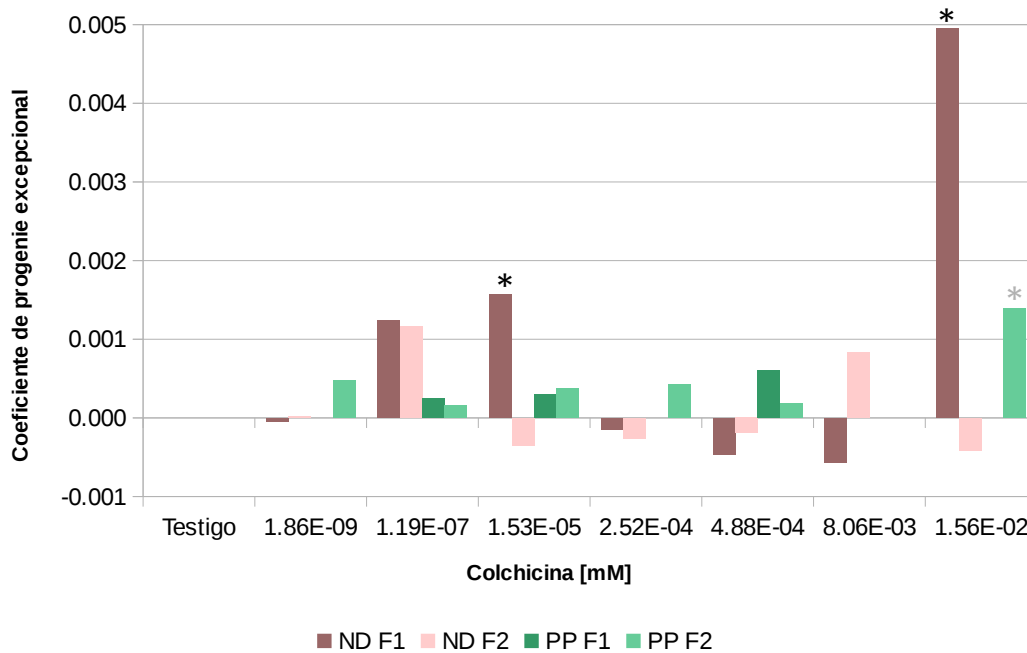


Fig. 6.8 Comparación de la frecuencia de progenie excepcional corregida inducida por eventos de no-disyunción (ND) y pérdida parcial (PP) en la F₁ y la F₂, después de haber tratado al macho progenitor con colchicina. Los asteriscos negros indican diferencia significativa entre generaciones, mientras que el asterisco gris con respecto al testigo de su misma generación ($p < 0.05$).

6.5. Fertilidad

La fertilidad es la capacidad de un organismo de tener o no hijos. Para medir la fertilidad de las moscas tratadas y de su progenie, se hicieron cruza individuales, y se contaron cuántas parejas tuvieron hijos con respecto al total de parejas colocado. Aquellas parejas que no tuvieron hijos también son tomadas en cuenta, para saber qué proporción de éstas no fueron fértiles. El tratamiento afectó la fertilidad de los machos expuestos a partir de 3.13E-02 mM (Cuadro 6.10 y Fig. 6.9). No se encontraron diferencias significativas entre la fertilidad de machos expuestos y la fertilidad de su progenie F₁ regular ($X^2_{(7, N=18)}=2.72$; $p=0.91$), sin embargo, se encontraron diferencias significativas en la fertilidad de machos expuestos con respecto a su testigo en 8.06E-03 y 1.56E-02 mM, y en la fertilidad de la progenie F₁ regular con respecto a su testigo correspondiente en 1.56E-02 mM ($Z_{0,05}=1.96$;

$p < 0.05$).

[Colchicina]	FME	FF/FS	α	FPF ₁	FF/FS	α
Testigo	0.938	59/60	-	0.950	57/60	-
1.86E-09	0.867	52/60	-	1.000	60/60	-
1.19E-07	0.950	57/60	-	0.938	59/60	-
1.53E-05	0.933	56/60	-	1.000	60/60	-
2.52E-04	1.000	40/40	-	0.975	39/40	-
4.88E-04	0.917	55/60	-	0.983	59/60	-
8.06E-03	0.725	29/40	*	0.950	38/40	-
1.56E-02	0.317	19/60	*	0.438	29/60	*
3.13E-02	0	0/40				

Cuadro 6.10 Fertilidad de machos expuestos a colchicina ($\varphi\varphi yw/yw \times y^2w^a/B^SYy^+ E$) y de su progenie F₁. FME, Fertilidad de machos expuestos a colchicina; FPF₁, Fertilidad de la progenie F₁ regular; FF/FS, Familias fértiles/Familias sembradas; α , Prueba de Z; *, diferencias significativas $p < 0.05$.

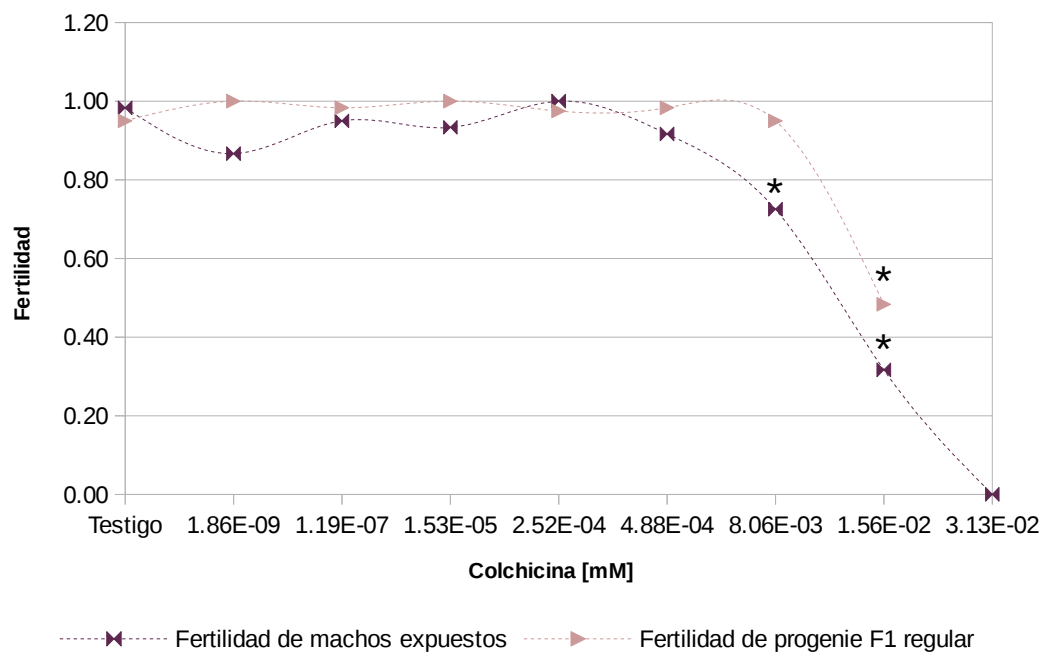


Fig. 6.9 Fertilidad de machos expuestos y^2w^a/B^SYy^+ cruzados con hembras vírgenes yw/yw y de la cruce entre progenie F₁ X F₁ regular. El * indica diferencias significativas con respecto a su testigo ($p < 0.05$).

6.6. Proporción sexual

No hubo diferencias significativas entre las proporciones sexuales de los organismos tratados con respecto a su testigo; misma situación con la proporción sexual de la primera y la segunda generación; tampoco se encontraron diferencias significativas entre la proporción de machos en las tres generaciones ($F_{2,22}=1.03$; $p > 0.05$). Sin embargo, en las tres generaciones el número de machos siempre es menor que el de hembras ($W=38, 32, 36$ respectivamente; $p < 0.05$), salvo en la sobrevivencia del tratamiento en la concentración $3.13E-02$ mM y en la primera generación en la concentración $1.56E-02$ mM (marcadas con una flecha en la figura 6.10). En la figura 6.10 están graficadas únicamente las proporciones de machos (dado que la suma de las proporciones de hembras y machos siempre es 1, no es necesario graficar ambas).

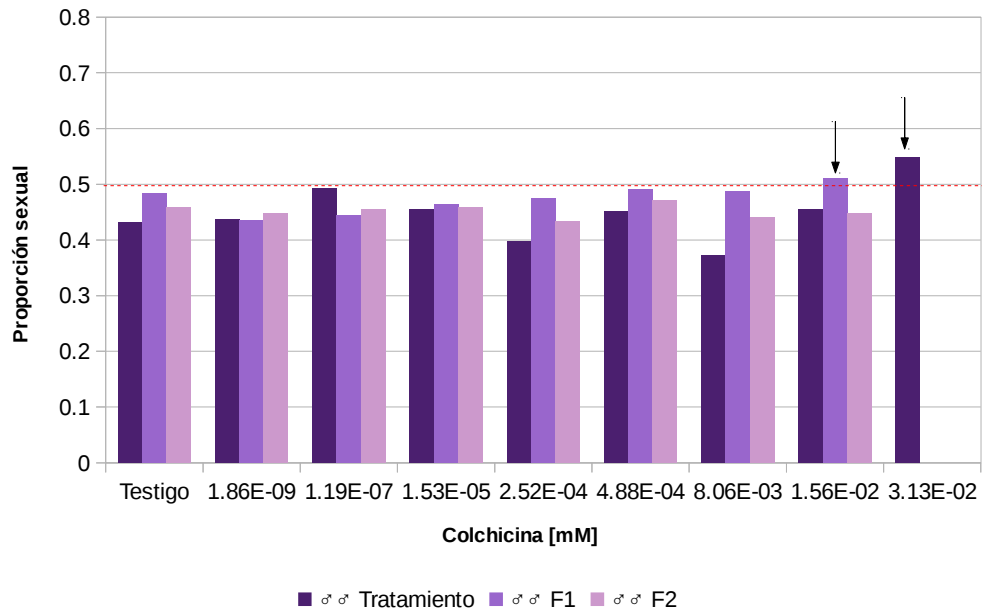


Fig. 6.10 Proporción sexual de machos en los sobrevivientes recobrados después del tratamiento con colchicina y las progenies F₁ y F₂.

6.7. Sobrevivencia y progenies promedio

Para determinar si existe efecto de la colchicina en las tres generaciones analizadas, se comparó la curva de sobrevivencia de las moscas al tratamiento, y la progenie promedio tanto de la primera como de la segunda generación. Para hacer la comparación se corrigieron los valores, llevando el testigo a uno (es decir, cada dato se dividió entre el valor del testigo). En la figura 6.11 se muestra que no hay diferencias significativas entre ellas, es decir, hay una gran similitud entre las curvas a pesar de que la colchicina sólo se administró en una ocasión (a la progenie de la crucea $\text{♀♀}y^2w^a/y^2w^a \times \text{♂♂}X^{C^2}yf/B^SYy^+$) (ANOVA, $F_{2,30}=0.34$; $p > 0.05$).

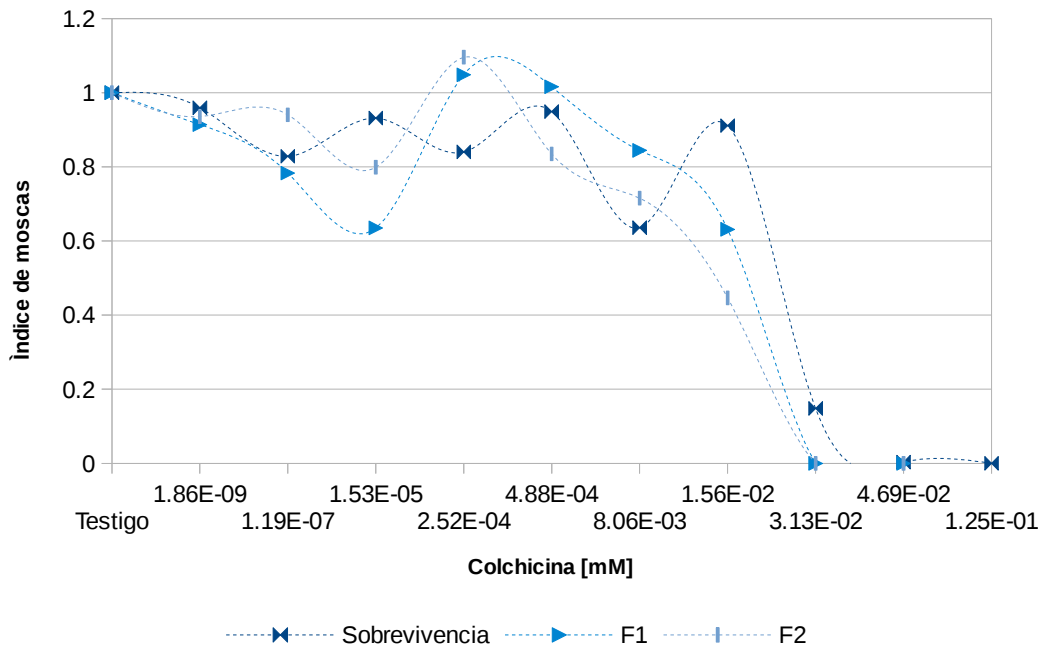


Fig. 6.11 Índice de sobrevivencia e índice de progenie promedio por familia correspondiente a la F_1 y a la F_2 .

7. Discusión

Debido a que los seres vivos están constantemente expuestos a sustancias potencialmente dañinas, capaces de poner en riesgo la integridad de los organismos, es necesario hacer evaluaciones y establecer los lineamientos para realizar diagnósticos de toxicidad y genotoxicidad. Estos estudios suelen basarse en resultados obtenidos a partir del tratamiento a especies no humanas con dosis relativamente altas y durante una exposición intensa (Ramos Morales, Herrera Bazán, Muñoz Moya, Muñoz Hernández, Rivas Martínez, Hernández Bernal y García Martínez [2006a](#)).

El modelo clásico de estudio de genotoxicidad *dosis-respuesta*, plantea que la relación entre la cantidad de compuesto y el efecto de éste sobre el organismo sigue una lógica creciente y lineal, es decir que mientras mayor sea la dosis, mayor será la respuesta observable (Klaassen y Watkins [2005](#)). Sin embargo, este modelo no presta atención a lo que sucede con las concentraciones bajas, en donde la respuesta puede incluso ser contraria que a dosis altas. Este aspecto es crítico en la determinación del daño al material genético hereditario de los sobrevivientes a la exposición de ciertas sustancias (Ramos Morales, Herrera Bazán, Muñoz Moya, Muñoz Hernández, Rivas Martínez, Hernández Bernal y García Martínez [2006a](#)).

En este trabajo se evaluó el cambio de diferentes biomarcadores: Supervivencia (S), Proporción Sexual (PS), Fertilidad (Fe), Progenie por Familia (PPF) y Eventos Excepcionales (E) relacionados con la no disyunción de las células germinales durante la formación de óvulo y espermatozoide, así como la pérdida parcial o total de cromosomas sexuales;

además de dar seguimiento al impacto de la exposición de uno de los progenitores en dos generaciones sucesivas no expuestas al tratamiento con colchicina.

7.1. Sobrevivencia al tratamiento

Con base en la sobrevivencia, que es el biomarcador que evalúa de manera global la toxicidad (Ramos Morales, Herrera Bazán, Muñoz Moya, Muñoz Hernández, Rivas Martínez, Hernández Bernal y García Martínez 2006a), a partir de 0.031 mM de colchicina el efecto del tratamiento fue tóxico de manera similar para ambos tipos de líneas de moscas expuestas; esto implica que la baja sobrevivencia en las concentraciones más altas probadas no es consecuencia de los marcadores del sistema de cruza utilizado en esta tesis (Lindsley y Zimm 1992).

La proporción sexual de las moscas silvestres se mantuvo estable, oscilando alrededor de 0.5, por lo que fue poco informativa. También para la progenie de la crucea $\text{♀♀}y^2w^a/y^2w^a \times \text{♂♂}X^{C2}yf/B^SYy^+$ (para producir a los machos y^2w^a/B^SYy^+), la proporción sexual se mantuvo sin diferencias significativas con respecto a su testigo, sin embargo, es notorio que, para todas las concentraciones con excepción de la más alta, hay más hembras que machos. Lo anterior llama la atención debido a que de acuerdo con el mecanismo de determinación del sexo en *Drosophila melanogaster*, la probabilidad de hembra o macho es de 0.5, por lo que, si este biomarcador no es afectado por el tratamiento, se esperan fluctuaciones aleatorias alrededor de este valor, lo cual no ocurrió para la línea experimental. Se ha reportado que la toxicidad de algunos compuestos puede comprometer la sobrevivencia y la proporción sexual de los organismos, además de que pueden provocar deficiencias a nivel de maduración sexual, producción de gametos, fertilización y cambios fisiológicos aunados a lo mismo, presentando finalmente alteración en la reproducción (Repetto Jiménez y Repetto Kuhn 2009) tal como se observa en la fertilidad de machos tratados.

Gracias al uso de marcadores morfológicos en la mosca del vinagre, podemos evaluar la pérdida parcial o total de cromosomas, mas no la inducción de mutaciones puntuales. En el 2011, Muñoz-Hernández encontró en la colchicina propiedades de clastógeno, además de aneuploidógeno, volviéndose importante distinguir estos eventos. Así mismo, las perturbaciones numéricas y estructurales de los cromosomas más los daños ambientales pueden inducir cambios en la meiosis, provocando *mutantes meióticos* (Baker y Hall 1976).

En la crucea ♀♀ y^2w^a/y^2w^a X ♂♂ $X^{C^2}yf/B^SYy^+$ (para producir a los machos y^2w^a/B^SYy^+) se encontraron fenotipos excepcionales, no obstante no fue posible establecer una relación de causalidad ya que no se encontró relación con la concentración de colchicina administrada, y no hubo diferencias significativas con respecto a su testigo. Aunque las diferencias no fueron significativas, es importante analizar con qué tipo de evento genético se relacionan los individuos de la progenie excepcional. Primero se explicarán las hembras B^S , las hembras w^a , los machos y^2w^a y los machos y^2 , y por último los ginandromorfos (Fig. 7.1):

- ♀ B^S : Este fenotipo es provocado por una no-disyunción de los cromosomas sexuales del macho, quedando una hembra XXY. Por la relación de dominancia de los alelos implicados se hace evidente el fenotipo B^S , debido a que con respecto a y y y^2 se expresa morfológicamente el alelo y^+ del cromosoma Y, w^a no es evidente por el alelo w^+ del cromosoma en anillo y finalmente, f es recesivo ante el alelo f^+ del cromosoma en varilla de la hembra.
- ♀ w^a : Este fenotipo puede tener dos procedencias, una menos probable que la otra. La primera y menos probable es la ocurrencia simultánea de dos eventos: una no-disyunción de los cromosomas sexuales de la hembra y la pérdida parcial del gen B^S del cromosoma Y. Solo se manifiesta fenotípicamente el alelo w^a debido a que los alelos y^2 de los cromosomas de la hembra son recesivos ante el alelo y^+ del cromosoma Y. La segunda opción podría ser por un individuo con un cromosoma X en varilla proveniente de la hembra y un cromosoma X en anillo proveniente del macho que pudo haberse abierto por ejemplo por un evento de recombinación y debido a su

inestabilidad estructural (Novitski y D. 1976) se perdió la región distal involucrando el locus y y el alelo w^+ , lo que produciría una hembra $(y^2)^- w^a f / (y^+)^- (w^+)^- f^+$.

- $\sigma^7 y^2 w^a$: Este fenotipo también puede tener varios orígenes. Una opción es una no disyunción en machos, quedando un cromosoma X de la hembra solo (macho $X0 y^2 w^a / 0$), expresando los alelos $y^2 w^a$. Otra opción es que se hayan perdido simultáneamente los fragmentos traslocados del X en el cromosoma Y que llevan los alelos B^S y y^+ . Una tercera opción es, como en el caso anterior, que el cromosoma X en anillo se rompa con la consecuente pérdida de función (Novitski y D. 1976), quedando únicamente el cromosoma X en varilla, el cual expresaría los alelos $y^2 w^a$.
- $\sigma^7 y^2$: Así como el fenotipo w^a para hembras, éste podría originarse por la apertura del cromosoma X en anillo proveniente del macho y la recombinación con el cromosoma X en varilla proveniente de la hembra. Al momento de la recombinación de los dos cromosomas, se intercambian los alelos de w (w^+ por w^a), y debido a la inestabilidad estructural del cromosoma proveniente del macho, éste pudo no haberse conservado, formando un individuo $y^2 w^+ f^+ / 0$.

Los cromosomas mitóticos en anillo no se han descrito en poblaciones silvestres de *Drosophila melanogaster*, sino que son formados por medio de radiación y pueden ser mantenidos en bancos de moscas, ya que a pesar de mostrar mosaicos genéticos o no-disyunción de manera espontánea, no se pierden con una frecuencia alta. El primer anillo fue descrito en 1922, y a partir de ahí se mantuvieron y estudiaron estas estructuras cromosómicas, siendo interesantes debido a su comportamiento espontáneo y respuesta ante la radiación a diferencia de los cromosomas en barra (Leigh 1976; Novitski y D. 1976). Se ha sugerido que los eventos que conducen a la pérdida del cromosoma X en anillo se asocian con alteraciones del tipo de intercambio de cromátidas hermanas, y de acuerdo a un estudio hecho por Ramos Morales 1994, la frecuencia de pérdida del cromosoma X es más alta cuando éste está en anillo que cuando está en varilla. Debido a esto, la presencia de no-disyunción, o de pérdida total de cromosomas en anillo son esperadas.

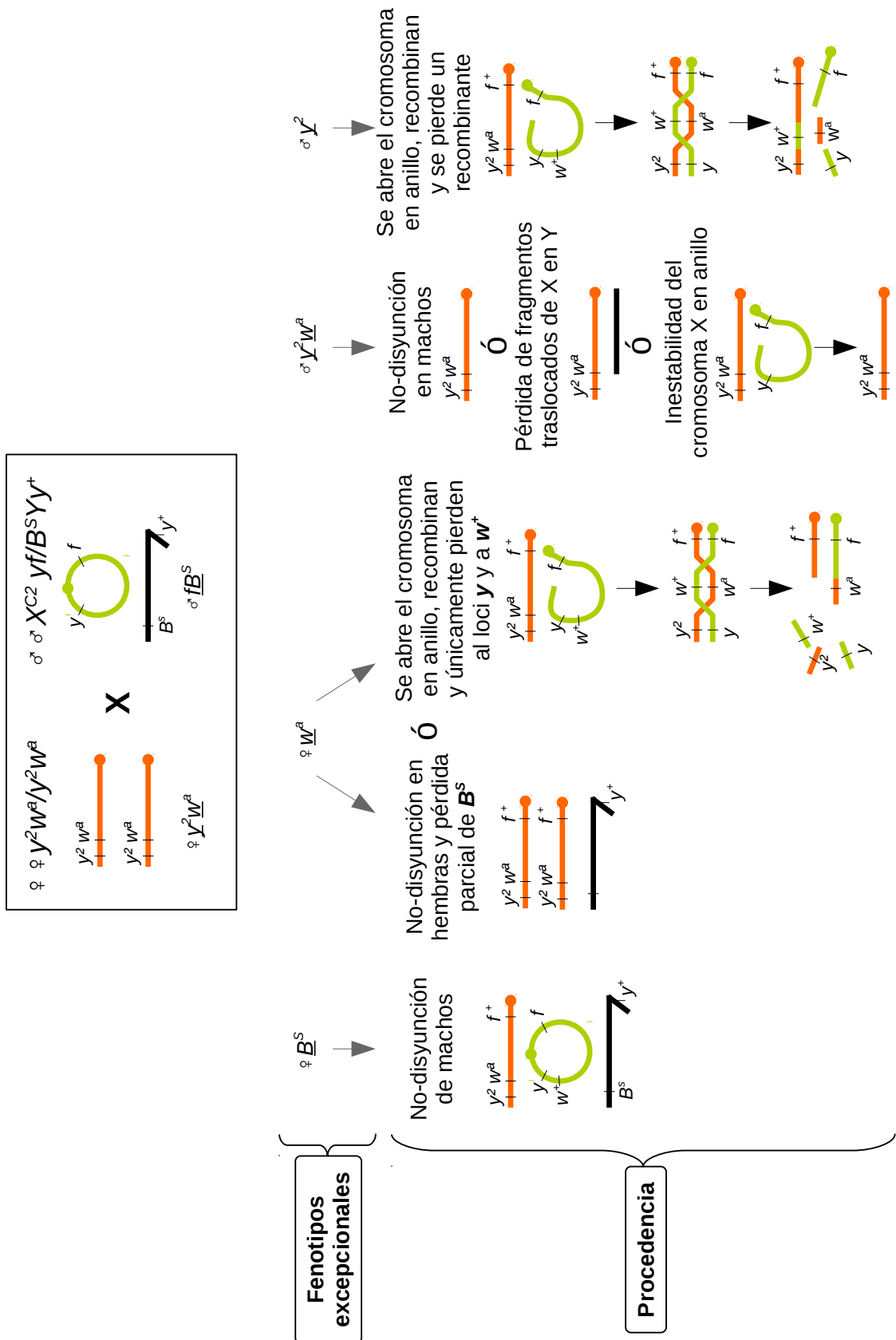


Fig. 7.1 Esquema de cada una de las posibles procedencias de los fenotipos excepcionales encontrados en el tratamiento de la cruce $♀ y^2 w^a / y^2 w^a \times ♂ X^{C2} y f / B^S Y y^+$.

Un ginandromorfo es aquel individuo que expresa un mosaico sexual, que se pueden presentar aproximadamente en una de cada dos mil moscas del vinagre. Morgan y Bridges describieron en 1919 distintos tipos de mosaicismo sexual en *D. melanogaster*. Pueden ser bilaterales, con características femeninas de un lado, y masculinas del otro. En otros casos, en lugar de la mitad, sólo un cuarto del cuerpo o menos presenta características masculinas (Crew 2015).

Los ginandromorfos encontrados en el tratamiento de la crucea $\text{♀♀}y^2w^a/y^2w^a \times \text{♂♂}X^{C2}yf/B^SYy^+$ presentan menos de un cuarto del cuerpo con una característica masculina, que es el ojo w^a . Proviene de hembras con un cromosoma X en varilla y otro cromosoma X en anillo $y^2w^af^+/yw^+f$. Esta pérdida ocurre a nivel de células somáticas, y se debe a la pérdida de heterocigosidad del alelo w , lo cual puede suceder seguido, debido a una mala segregación del cromosoma X a nivel mitótico, o debido a que la región en donde se encuentra el gen *white* es altamente cambiante. El tratamiento con diversos compuestos puede incrementar significativamente la frecuencia de aparición de mosaicismos (Miyashita y Langley 1988; Ledezma Vaca 2006; Crew 2015; Palermo y Mudry 2015) (Fig. 7.2).



Fig. 7.2 Mosca $y^2w^af^+/yw^+f$ mostrando un mosaicismo a nivel del color del ojo recuperada del tratamiento con colchicina de la crucea $\text{♀♀}y^2w^a/y^2w^a \times \text{♂♂}X^{C2}yf/B^SYy^+$. El ojo derecho expresa w^+ mientras que el izquierdo manifiesta fenotípicamente el alelo recesivo w^a .

7.2. Efecto de la colchicina en dos generaciones sucesivas no tratadas

La prueba de no disyunción y pérdida parcial de cromosomas sexuales (SCLT), ha sido utilizada en mutagénesis con la finalidad de determinar la capacidad de compuestos con riesgo potencial de causar alteraciones en el material genético (Ramos Morales 1994). Gracias a que todas las cruzas fueron individuales, lo cual es una modificación al protocolo escrito por Mason y col. 1987, fue más fácil observar el efecto del tratamiento sobre los machos tratados y su descendencia, además de poder medir la fertilidad diferencial entre machos, la fertilidad de la primera generación y la progenie por familia.

La biotransformación está definida como el conjunto de procesos que introducen cambios en las estructuras de los xenobióticos, con la finalidad de favorecer su eliminación. Dicha eliminación se da a través de reacciones químicas y sistemas enzimáticos; a esto se le llama desintoxicación (Bello Gutiérrez y Cerain Salsamendi 2001; Repetto Jiménez y Repetto Kuhn 2009).

Como lo indican los resultados en la prueba de ANOVA/Dunnett, se encontraron diferencias significativas en la progenie F_1 recuperada de la cruce de machos tratados y^2w^a/B^SYy^+ , con hembras vírgenes yw/yw , correspondientes a los machos resultantes de las concentraciones 1.52E-05 y 1.56E-02 mM. En la figura 6.4a se observa que la curva que va desde la progenie promedio del testigo hasta la de la concentración 1.52E-05 mM tiene una pendiente negativa y que, en la concentración siguiente, 2.52E-04 mM, la progenie promedio es similar a la del testigo. Este comportamiento podría explicarse por la respuesta de desintoxicación de machos expuestos ante el compuesto que se hace evidente en 2.52E-04 mM, y conforme la concentración sigue aumentando, los organismos ya no son capaces de procesarla, llegando a ser estériles, como es el caso de la concentración más alta, 3.13E-02 mM. La razón por la que este efecto no está presente en la sobrevivencia de los organismos expuestos es por un posible *trade-off* entre la sobrevivencia y el éxito re-

productivo, como sucede para el caso de *Anastrepha* (Harwood y col. 2015), resultando en una primera generación deficiente. Otra posible explicación al comportamiento observado de la progenie F₁ podría estar relacionada con la viabilidad del daño genético ocurrido. Por otro lado, las diferencias significativas encontradas en la progenie F₂ recuperada de la cruce de progenie F₁ regular, corresponden a las provenientes de machos expuestos a las concentraciones más altas, 8.06E-03 y 1.56E-02 mM (Fig. 6.6a). En este caso, un efecto de desintoxicación no es suficiente para explicar estos eventos, de manera que la pérdida de organismos, aneuploidías y la actividad clastogénica en la F₂ podrían ser el resultado de efectos epigenéticos. Así, el efecto tóxico sigue presente como muestran las notorias deficiencias en la reproducción y la presencia de progenie excepcional.

La proporción sexual de la progenie F₁ y de la progenie F₂, muestran la misma tendencia de la proporción sexual de la sobrevivencia al tratamiento. La diferencia entre las proporciones sexuales de ambas generaciones (aunque no significativa) radica en la última concentración, 1.56E-02 mM, ya que en la progenie F₁ hay un mayor número de machos, mientras que en la progenie F₂ se mantiene arriba el número de hembras. El error estándar de ambas proporciones sexuales es mínimo, lo cual indica que el efecto que provoca que la distribución de sexos siempre esté más sesgada hacia el lado de las hembras es contundente, ya que no se encontraron variaciones importantes en las mediciones.

Estos resultados indican que el compuesto no solo tiene la posibilidad de alterar los cromosomas sexuales y la determinación sexual de organismos tratados, sino que también logra afectar a los organismos de las siguientes generaciones (F₁ y F₂). Es decir, el citostático colchicina presenta un efecto transgeneracional.

7.2.1. Progenie excepcional: primera generación

Los resultados de la progenie F₁ excepcional mostraron diferencias significativas en las concentraciones 1.19E-07 y 1.56E-02 mM con respecto a su testigo, únicamente para los eventos provenientes de no-disyunción en machos ($\varphi\varphi w^a B^S$ y $\sigma\sigma yw$). Este fue un resul-

tado esperado debido a que los machos fueron los organismos expuestos a la colchicina, la cual está catalogada como un aneuploidógeno, cuya característica principal es la de interferir en el ciclo celular impidiendo que los cromosomas se separen en la metafase (Bishop y col. 1996). Uno de los valores significativos coincide con la concentración a la que los niveles de colchicina fueron críticos para la progenie promedio ($1.56E-02$ mM), sin embargo, el otro valor significativo está presente en una concentración anterior al primer nivel crítico y no en $1.52E-05$ mM, lo cual puede deberse a la pérdida de organismos por la toxicidad de la concentración debido a la viabilidad del daño genético ocurrido (Ramos Morales 1994).

7.2.2. Progenie excepcional: segunda generación

La progenie F_2 proviene de organismos regulares hijos de machos tratados, por lo que tanto machos como hembras presentan la contribución de éstos. De esta manera, no es indispensable saber si los eventos de no-disyunción provienen de hembras o de machos, dado que ambos padres recibieron la dosis cromosómica correspondiente al abuelo tratado. A pesar de esto, se separaron las categorías fenotípicas hasta donde los marcadores fenotípicos lo permitieron, obteniendo cuatro fenotipos provenientes de no-disyunción de machos, y dos fenotipos provenientes tanto de no-disyunción de machos como de hembras. Ninguno de estos fenotipos presentó diferencias significativas con respecto a su testigo, resultado esperado dado que al momento de retirar la colchicina, su carácter como aneuploidógeno se limita y se restaura el huso mitótico (Klug y col. 2013).

El entrecruzamiento de cromosomas es un evento que puede presentarse antes, durante o después de la duplicación de los cromosomas (Avers 1983), y es resultado del apareamiento de cromosomas homólogos, dando lugar a una recombinación de alelos. De acuerdo con Morgan, la frecuencia de recombinación depende directamente de la distancia a la que estén dos genes. En el caso de los genes *yellow* y *white*, la distancia es de 1.5 unidades de mapa, por lo que la frecuencia de recombinación sería de 0.015. Este evento no pudo ser

observado para la primera generación, debido a que la hembra presentaba heterocigosidad para *yw*, y sus gametos parentales son exactamente iguales a los recombinantes. Para el caso de la segunda generación, este evento pudo ser observado únicamente en hembras, ya que en machos no hubo distinción fenotípica (Fig. 7.3) (Lefevre 1976; Ramos Morales 1993; Klug y col. 2013). Así mismo, la recombinación homóloga, es un mecanismo de reparación de ADN que restaura de manera exitosa la integridad del material genético después de una ruptura de la doble cadena (Barzel y Kupiec 2008). De esta manera, el hallazgo de fenotipos recombinantes está asociado con la frecuencia de recombinación y con la reparación de rupturas de la doble hebra de ADN (pérdidas parciales), sin embargo, al momento de analizar la procedencia del evento de recombinación no podemos distinguir las provenientes de recombinación de las provenientes de reparación. Sin embargo, en los fenotipos en los que no se pudo reparar por falta de homología, hubo pérdidas parciales del cromosoma Y. Estos eventos de pérdidas parciales fueron recuperados en la progenie F₂, con una mayor frecuencia para los provenientes de la pérdida del gen *B^S*, que mostraron diferencias significativas en la concentración más alta, 1.56E-02 mM con respecto a su testigo.

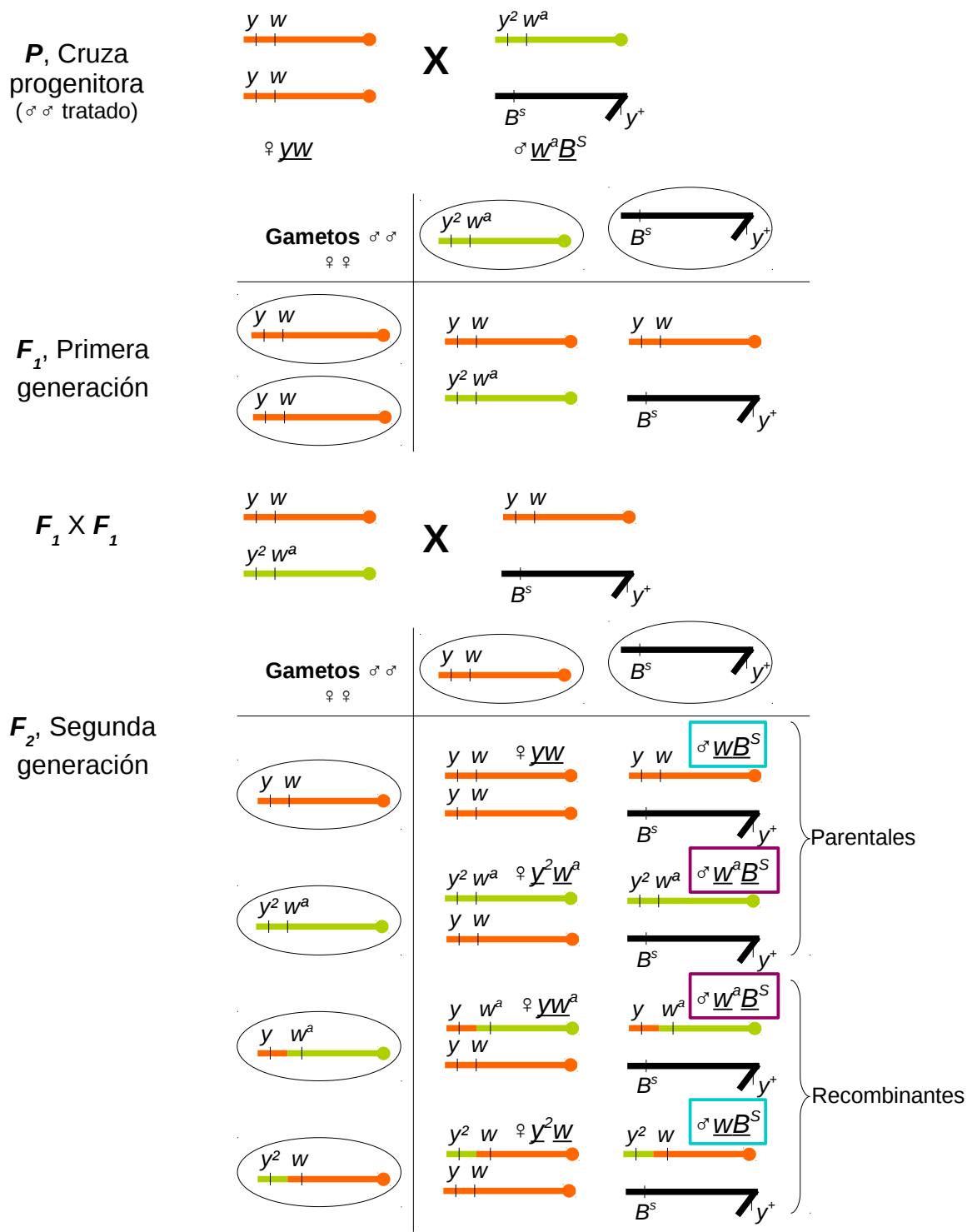


Fig. 7.3 Gametos provenientes de hembras y machos tanto para la formación de la primera como de la segunda generación. Para F₂ se señalan los gametos recombinantes. Los fenotipos encerrados en un cuadro señalan la igualdad de los mismos.

7.2.3. Progenie excepcional: primera y segunda generación

La frecuencia de no-disyunción fue mayor en la progenie F_1 que en la progenie F_2 , específicamente en las concentraciones $1.53E-05$ y $1.56E-05$ mM, en las cuales no hubo un proceso de desintoxicación exitosa por parte de los machos tratados o la viabilidad del daño genético ocurrido fue baja. Sin embargo, el hecho de que la frecuencia de no-disyunción haya disminuido en la progenie F_2 podría implicar un proceso de restablecimiento del funcionamiento del huso acromático, favoreciendo la adecuada separación de los cromosomas, comportamiento esperado debido a que la colchicina tiene una vida media de aproximadamente 9 horas (DrugBank 2016; PubChem 2016), y no es un compuesto bioacumulable. Otra posibilidad es la pérdida de organismos afectados. Así, el daño en el huso acromático únicamente se podría observar hasta la primera generación después del tratamiento con un aneuploidógeno.

Por otro lado, a pesar de que no hubo diferencias significativas en la relación de pérdidas parciales entre F_1 y F_2 , en esta última hubo un incremento con respecto a su testigo en la concentración $1.56E-02$ mM, evento no esperado. Esto podría implicar dos cosas, la primera es que el tóxico causó un efecto transgeneracional, capaz de redireccionar el daño de la colchicina y expresarse como un clastógeno, sin embargo este daño podría estar causado no directamente por la interacción con la colchicina (la cual le fue administrada a sus abuelos), sino por la interacción con alguno de sus metabolitos, como 3-dimetilcolchicina y 2-dimetilcolchicina (Tateishi y col. 1997).

Otra posible respuesta a un redireccionamiento del daño es el efecto epigenético. Ha sido sugerido que las aneuploidías pueden ser la explicación a los cambios epigenéticos, tales como el aumento o incremento de metilación de ADN (Huettel y col. 2008). Así, los efectos observados en la F_2 , podrían explicarse con posibles cambios de metilación, inclusive si éste suele ser bajo en *Drosophila* (Dunwell y Pfeifer 2014).

7.3. Efecto de la colchicina en la supervivencia de machos tratados y su descendencia

7.3.1. Fertilidad

La fertilidad es uno de los biomarcadores centrales para describir la toxicidad de una sustancia, ya que es en donde el daño a nivel de reproducción, causado por un compuesto puede ser evaluado (Ramos Morales, Herrera Bazán, Muñoz Moya, Muñoz Hernández, Rivas Martínez, Hernández Bernal, García Martínez y García Niño 2006b; Repetto Jiménez y Repetto Kuhn 2009). Gracias a que se realizaron cruces individuales, este biomarcador puede relacionar el número de parejas que tuvieron hijos con el total de ellas.

Los machos tratados con colchicina presentaron una fertilidad que fue disminuyendo conforme la concentración del compuesto aumentó, hasta que la concentración 3.13E-02 mM provocó esterilidad de machos expuestos. Las dos concentraciones más altas en donde sí hubo progenie produjeron diferencias significativas con respecto a su testigo. A su vez, estos organismos, tanto hembras como machos, los cuales no estuvieron expuestos al tratamiento, presentaron una fertilidad con la misma tendencia que la anterior, mostrando únicamente diferencias con respecto a su testigo en la concentración 1.56E-02 mM. Por lo que dicha concentración no indujo esterilidad, pero sí alteró la actividad reproductiva de su progenie, dado el bajo número de parejas que tuvieron descendencia (Fig. 6.9).

El hecho de que la fertilidad de los organismos expuestos y de la progenie F₁ hayan mostrado una tendencia similar indica que el efecto del compuesto permanece más de una generación, ya sea por las posibles metilaciones provocadas en el ADN o por posibles cambios en transcritos de ARNm en el espermatozoide, alterando este parámetro por generaciones (Campion y col. 2013), por lo que el daño producido por el citostático colchicina es transgeneracional.

7.3.2. Proporción sexual

La proporción sexual de hembras y machos de una población de *Drosophila melanogaster* no tratada oscila alrededor del 0.5, sin embargo, esta proporción se puede ver alterada por la exposición a compuestos (Markow y Hocutt 1998; Matzkin y col. 2007; Repetto Jiménez y Repetto Kuhn 2009), tal como es el caso de la colchicina.

En general, la proporción sexual no tuvo diferencias significativas con respecto a su testigo o a las demás proporciones, sin embargo, llama la atención que no se presenten fluctuaciones aleatorias en la proporción de hembras y machos por lo que se aplicó la prueba de Wilcoxon para evaluar la probabilidad de que la aparición de hembras en todas las concentraciones sea un evento estocástico o no. La prueba de Wilcoxon salió positiva, lo cual nos hace ver que hay un sesgo de la proporción de hembras sobre la de machos en los machos tratados y su descendencia, y que el sesgo no puede ser explicado por el azar.

En la figura 6.10 se muestra esta tendencia sin importar la generación, indicando que la colchicina podría tener un efecto similar a la *N*-nitrosodimetilamina, en donde se asume que hay un efecto preferencial del tóxico hacia un género específico (Ramos Morales, Herrera Bazán, Muñoz Moya, Muñoz Hernández, Rivas Martínez, Hernández Bernal, García Martínez y García Niño 2006b). Sin embargo, analizando el comportamiento de machos respecto a su testigo podemos notar que la sobrevivencia de machos al tratamiento con colchicina incrementó en la concentración más alta, indicando que ésta podría interferir con la producción de hembras, probablemente debido a la pérdida de función de uno de los cromosomas, lo que llevaría a la formación de machos. En el caso de la primera generación hay una tendencia creciente más marcada, en donde hay más machos conforme la dosis aumenta, haciendo evidente un efecto de pérdida de función de uno de los cromosomas, tendencia que se pierde para la segunda generación.

7.3.3. Efecto transgeneracional del tratamiento con colchicina al macho progenitor

Una vez medidos los biomarcadores indicadores de toxicidad en los machos expuestos a tratamiento y sus dos generaciones sucesivas, así como analizado algunos de ellos en relación a la generación siguiente, hay evidencias contundentes de un daño transgeneracional. Por esta razón, se hizo la comparación de la sobrevivencia promedio con las progenies promedio F_1 y F_2 , buscando información que apoyara dicho resultado.

En la figura 6.11 podemos observar que la tendencia de las tres distribuciones no presenta diferencias significativas (analizado con una prueba ANOVA/Tukey), es decir, las tres presentan una pendiente negativa. Esto hace notar que a concentraciones bajas de cierto compuesto los organismos pueden sobrevivir, sin embargo, llevan alteraciones no observables fenotípicamente, que provoca que tengan descendencia alterada o que ésta a su vez presente problemas de fertilidad o un comportamiento irregular en la proporción sexual.

Efectos transgeneracionales son típicamente considerados por daño materno, ya que la hembra invierte más recursos en la producción de óvulos. Sin embargo, se han hecho varios estudios en donde se muestra que el aporte genético del macho tratado puede provocar un efecto transgeneracional. Un posible mecanismo para que la variación en la descendencia sea causada directamente por machos tratados de *Drosophila melanogaster* con colchicina es la reactividad alta de este compuesto para biomoléculas como lípidos (Muñoz-Hernández 2011), incidiendo la variación en las proteínas y lípidos contenidos en el fluido seminal, ya que el espermatozoide completo es incorporado al huevo durante la fertilización, junto con el fluido espermático, el cual contiene las proteínas seminales, pudiendo tener una función relevante durante el desarrollo (Pischedda y col. 2011; Valtonen y col. 2012).

El cáncer es una enfermedad que podría originarse por la presencia de efectos transgeneracionales. Una posible explicación a que la incidencia de cáncer infantil esté aumentando en las últimas décadas sin haber existido un largo periodo de latencia después de la ex-

posición de niños ante agentes genotóxicos, es la exposición de sus padres o abuelos ante éstos. El daño provocado por sustancias a las que estamos expuestos día con día no necesariamente se expresa morfológicamente o sintomáticamente durante nuestra vida, en algunos casos, dado que el daño puede llegar a nivel de células germinales (Pischedda y col. [2011](#); Valtonen y col. [2012](#)), se observaría hasta una o incluso dos generaciones después.

Gracias al uso de biomarcadores como fertilidad, progenie promedio, proporción sexual y progenie excepcional, en este trabajo se obtuvieron las evidencias de un daño reprotóxico y transgeneracional proveniente de la exposición de machos al citostático colchicina.

8. Conclusiones

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

- El tratamiento con colchicina a machos de *Drosophila melanogaster* afecta a sus dos generaciones sucesivas, por lo que el efecto de ésta es transgeneracional.
- El tratamiento con colchicina provocó efectos en la fertilidad de los organismos tratados, es decir, es causante de daño reprotóxico.
- La actividad citostática de la colchicina fue evidente en la concentración más alta probada y en la primera generación en las que por pérdida de función asociada con los cromosomas X se recobraron más machos.
- La actividad citostática de la colchicina no indujo pérdida de función asociada con los cromosomas X en la segunda generación.
- Los biomarcadores: sobrevivencia, progenie promedio por familia, proporción sexual y fertilidad, en conjunto con los marcadores fenotípicos para progenie excepcional, son capaces de evidenciar el efecto de un compuesto y mostrar si éste es tóxico y si produce un efecto reprotóxico y transgeneracional.
- El daño causado por un compuesto debe ser evaluado a lo largo de las generaciones para entender de manera integral su efecto sobre los organismos tratados.

A. ANEXO

Línea ♀♀ = $yf/B^S Y y^+$ X ♂♂ $X^{c2} yf/B^S Y y^+$

Está constituida por hembras XXY con dos cromosomas X unidos en forma reversa con un solo centrómero y por un cromosoma Y compuesto con dos translocaciones del X, una en el brazo corto (y^+) y otra en el brazo largo (B^S). Los machos tienen el mismo cromosoma Y que las hembras y un cromosoma X en anillo. Los machos heredan el cromosoma X del macho progenitor y el cromosoma Y de la hembra progenitora (Fig. A.1).

Línea de machos

La línea de machos está formada por la cruce de hembras $y^2 w^a / y^2 w^a$ y por machos de la línea ♀♀ = $yf/B^S Y y^+$ X ♂♂ $X^{c2} yf/B^S Y y^+$. Están formados por el cromosoma X de la hembra y el cromosoma Y del macho, el cual porta dos translocaciones del cromosoma X, una en el brazo corto (y^+) y otra en el brazo largo (B^S). El fenotipo final de los machos es *white apricot, Bar of Stone* (Fig. A.2).

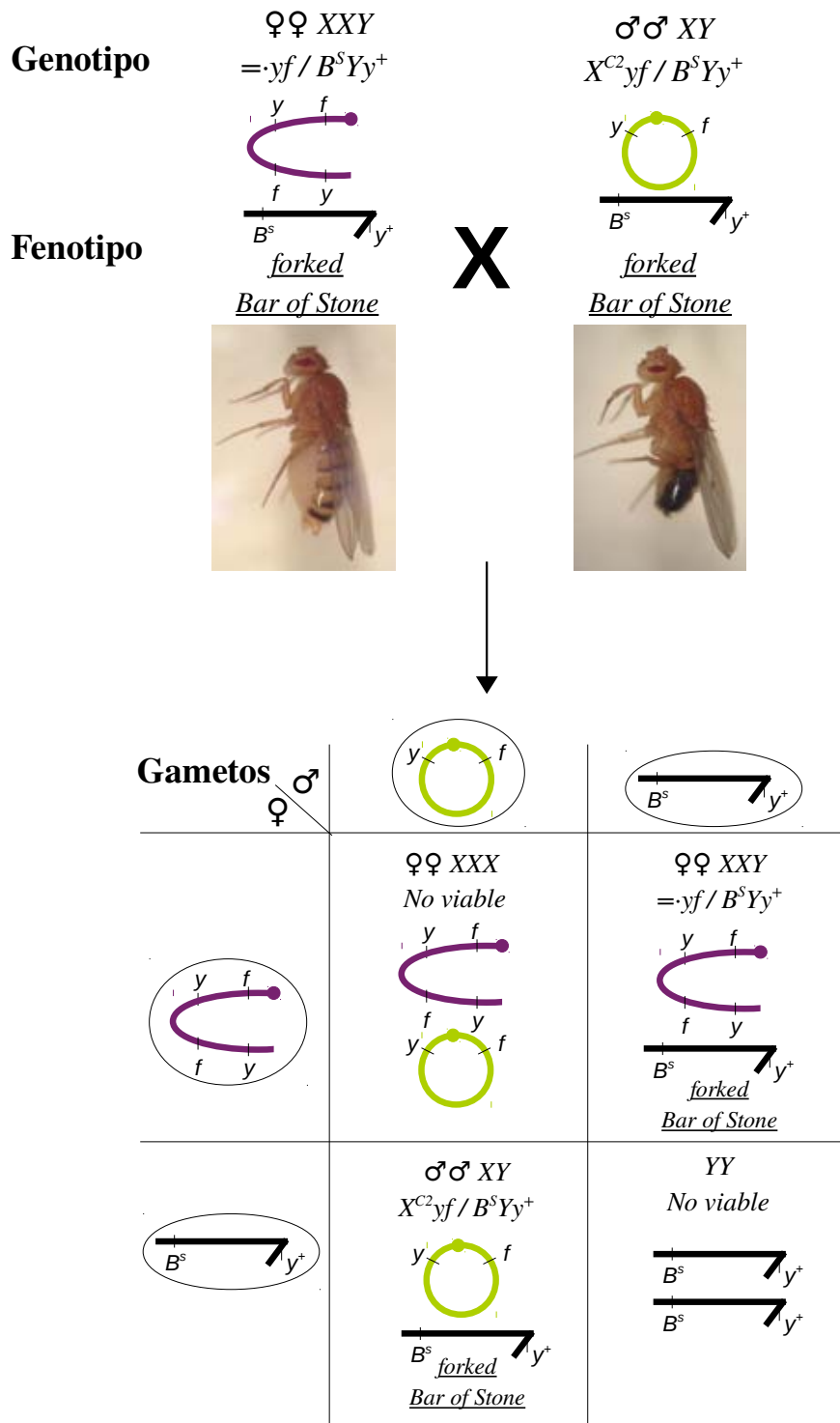


Fig. A.1 Línea ♀♀ = $\cdot yf / B^S Y y^+$ X ♂♂ $X^{c^2} yf / B^S Y y^+$.

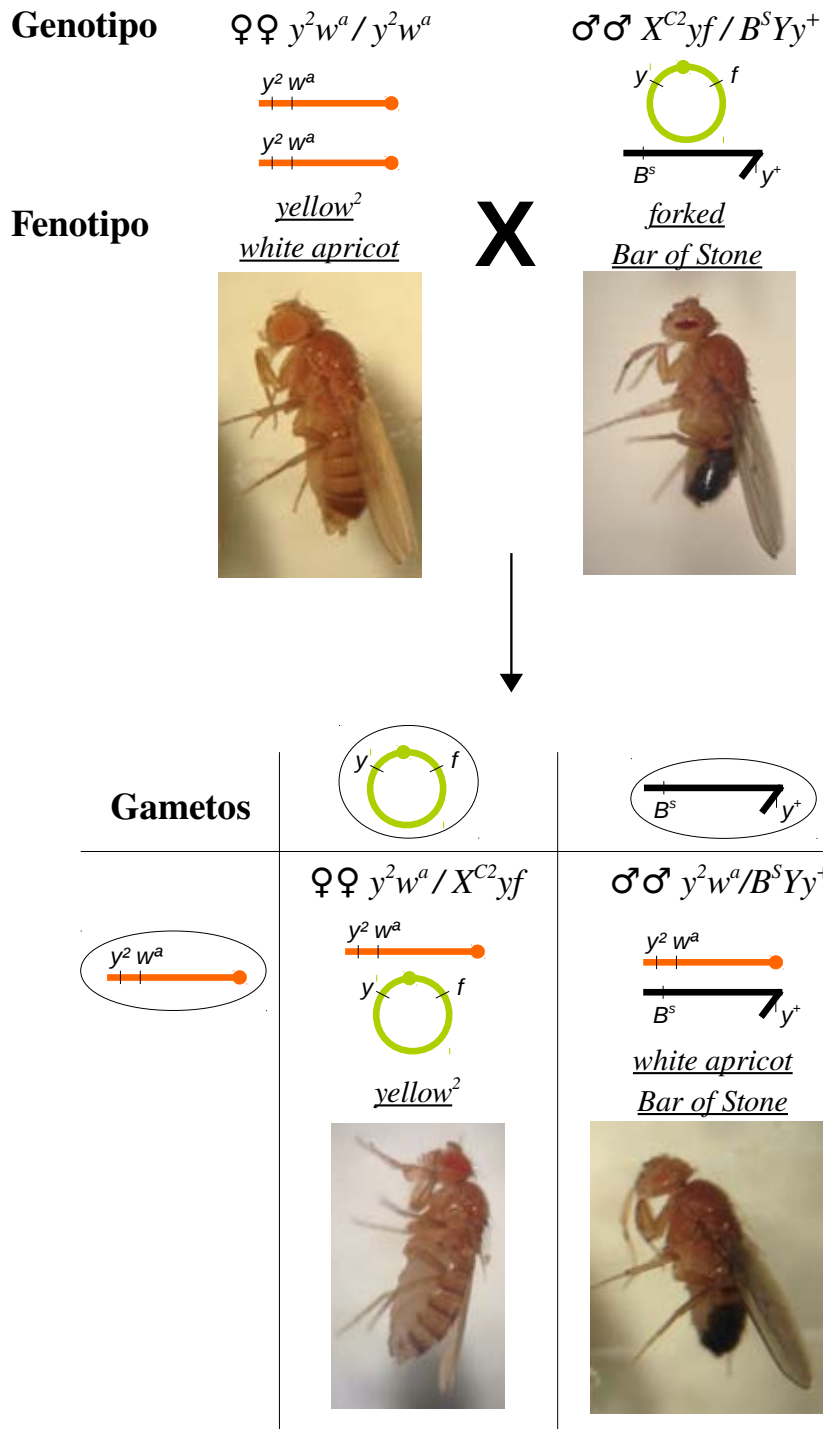


Fig. A.2 Construcción de la línea de machos.

Bibliografía

Adams, Mark D., Susan E. Celniker, Robert A. Holt, Cheryl A. Evans, Jeannine D. Gocayne, Peter G. Amanatides, Steven E. Scherer, Peter W. Li, Roger A. Hoskins, Richard F. Galle, Reed A. George, Suzanna E. Lewis, Stephen Richards, Michael Ashburner, Scott N. Henderson, Granger G. Sutton, Jennifer R. Wortman, Mark D. Yandell, Qing Zhang, Lin X. Chen, Rhonda C. Brandon, Yu-Hui C. Rogers, Robert G. Blazej, Mark Champe, Barret D. Pfeiffer, Kenneth H. Wan, Clare Doyle, Evan G. Baxter, Gregg Helt, Catherine R. Nelson, George L. Gabor, Miklos, Josep F. Abril, Anna Agbayani, Hui-Jin An, Cynthia Andrews-Pfannkoch, Danita Baldwin, Richard M. Ballew, Anand Basu, James Baxendale, Leyla Bayraktaroglu, Ellen M. Beasley, Karen Y. Beeson, P. V. Benos, Benjamin P. Berman, Deepali Bhandari, Slava Bolshakov, Dana Borkova, Michael R. Botchan, John Bouck, Peter Brokstein, Phillipe Brottier, Kenneth C. Burtis, Dana A. Busam, Heather Butler, Edouard Cadieu, Angela Center, Ishwar Chandra, J. Michael Cherry, Simon Cawley, Carl Dahlke, Lionel B. Davenport, Peter Davies, Beatriz de Pablos, Arthur Delcher, Zuoming Deng, Anne Deslattes Mays, Ian Dew, Suzanne M. Dietz, Kristina Dodson, Lisa E. Doup, Michael Downes, Shannon Dugan-Rocha, Boris C. Dunkov, Patrick Dunn, Kenneth J. Durbin, Carlos C. Evangelista, Concepcion Ferraz, Steven Ferriera, Wolfgang Fleischmann, Carl Fosler, Andrei E. Gabrielian, Neha S. Garg, William M. Gelbart, Ken Glasser, Anna Glodek, Fangcheng Gong, J. Harley Gorrell, Zhiping Gu, Ping Guan, Michael Harris, Nomi L. Harris, Damon Harvey, Thomas J. Heiman, Judith R. Hernandez, Jarrett Houck, Damon Hostin, Kathryn A. Houston, Timothy J. Howland, Ming-Hui

Wei, Chinyere Ibegwam, Mena Jalali, Francis Kalush, Gary H. Karpen, Zhaoxi Ke, James A. Kennison, Karen A. Ketchum, Bruce E. Kimmel, Chinnappa D. Kodira, Cheryl Kraft, Saul Kravitz, David Kulp, Zhongwu Lai, Paul Lasko, Yiding Lei, Alexander A. Levitsky, Jiayin Li, Zhenya Li, Yong Liang, Xiaoying Lin, Xiangjun Liu, Bettina Mattei, Tina C. McIntosh, Michael P. McLeod, Duncan McPherson, Gennady Merkulov, Natalia V. Milshina, Clark Mobarry, Joe Morris, Ali Moshrefi, Stephen M. Mount, Mee Moy, Brian Murphy, Lee Murphy, Donna M. Muzny, David L. Nelson, David R. Nelson, Keith A. Nelson, Katherine Nixon, Deborah R. Nusskern, Joanne M. Pacleb, Michael Palazzolo, Gjange S. Pittman, Sue Pan, John Pollard, Vinita Puri, Martin G. Reese, Knut Reinert, Karin Remington, Robert D. C. Saunders, Frederick Scheeler, Hua Shen, Bixiang Christopher Shue, Inga Sidén-Kiamos, Michael Simpson, Marian P. Skupski, Tom Smith, Eugene Spier, Allan C. Spradling, Mark Stapleton, Renee Strong, Eric Sun, Robert Svirskas, Cyndee Tector, Russell Turner, Eli Venter, Aihui H. Wang, Xin Wang, Zhen-Yuan Wang, David A. Wassarman, George M. Weinstock, Jean Weissenbach, Sherita M. Williams, Trevor Woodage, Kim C. Worley, David Wu, Song Yang, Q. Alison Yao, Jane Ye, Ru-Fang Yeh, Jayshree S. Zaveri, Ming Zhan, Guangren Zhang, Qi Zhao, Liansheng Zheng, Xiangqun H. Zheng, Fei N. Zhong, Wenyan Zhong, Xiaojun Zhou, Shiaoping Zhu, Xiaohong Zhu, Hamilton O. Smith, Richard A. Gibbs, Eugene W. Myers, Gerald M. Rubin y J. Craig Venter (2000). «The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*». En: *Science* 287.5461, págs. 2185-2195. DOI: [10.1126/science.287.5461.2185](https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2185).

Avers, C. (1983). *Biología celular*. Editorial Iberoamericana.

Baker, B. S y J. C. Hall (1976). «Meiotic Mutants: Genic Control of Meiotic Recombination and Chromosome Segregation». En: *Ashburner, M. y E. Novitski. (1976). The Genetics and Biology of Drosophila. Volumen 1a. Academic Press*, págs. 352-435.

Barzel, A. y M. Kupiec (2008). «Finding a match: how do homologous sequences get together for recombination?» En: *Nat Rev Genet* 9, págs. 27-37. DOI: [10.1038/nrg2224](https://doi.org/10.1038/nrg2224).

Beckingham, K. M., J. D. Armstrong, M. J. Texada, R. Munjaal y D. A. Baker (2005). «*Drosophila melanogaster* - The model organism of choice for the complex biology of

- multi-cellular organisms». En: *Gravit Space Biol Bull* 18.2, págs. 17-29. eprint: <http://gravitationalandspacebiology.org/index.php/journal/article/view/343/344>.
- Bello Gutiérrez, J.B. y A.L. de Cerain Salsamendi (2001). *Fundamentos de Ciencia Toxicológica*. Díaz de Santos. URL: https://books.google.com.mx/books?id=EwQk094%5C_1KcC.
- Bishop, J. B., V. L. Dellarco, T. Hassold, L. R. Ferguson, A. J. Wyrobek y J. M. Friedman (1996). «Aneuploidy in germ cells: Etiologies and risk factors». En: *Environmental and Molecular Mutagenesis* 28.3, págs. 159-166. DOI: [10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1996\)28:3<159::AID-EM1>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1996)28:3<159::AID-EM1>3.0.CO;2-9).
- Brusick, D. (1987). *Principles of Genetic Toxicology*. Springer US. URL: <https://books.google.com.mx/books?id=X4hkk1B-KYwC>.
- Cabrero Roura, L. y D. Saldivar Rodriguez (2007). *Obstetricia y medicina materno-fetal*. Editorial Médica Panamericana. URL: <https://books.google.com.mx/books?id=AGh8rK1Mm0sC>.
- Campion, S., J. Aubrecht, K. Boekelheide, D. W. Brewster, V. S. Vaidya, L. Anderson, D. Burt, E. Dere, K. Hwang, S. Pacheco, J. Saikumar, S. Schomaker, M. Sigman y F. Goodsaid (2013). «The current status of biomarkers for predicting toxicity». En: *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 9.11, págs. 1391-1408. DOI: [10.1517/17425255.2013.827170](https://doi.org/10.1517/17425255.2013.827170).
- Chia, W., G. Howes, M. Martin, Y. B. Meng, K. Moses y S. Tsubota (1986). «Molecular analysis of the yellow locus of *Drosophila*». En: *The EMBO* 5.13, págs. 3597-3605. eprint: <http://dx.doi.org/10.1517/17425255.2013.827170>.
- Crew, F.A.E. (2015). *The Genetics of Sexuality in Animals*. Cambridge University Press. URL: <https://books.google.com.mx/books?id=uEcPCAAQBAJ>.
- Derelanko, M.J. y C.S. Auletta (2014). *Handbook of Toxicology*. Taylor & Francis. URL: <https://books.google.com.mx/books?id=r48-AwAAQBAJ>.
- DrugBank (2016). *DrugBank: Colchicine*. Data updated on 13/11/2016. URL: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01394#identification>.

- Dunwell, T. L. y G. P. Pfeifer (2014). «Drosophila genomic methylation: new evidence and new questions». En: *Epigenomics* 6.5, págs. 459-461. DOI: [10.2217/epi.14.46](https://doi.org/10.2217/epi.14.46).
- Garesse, R (1988). «*Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA: gene organization and evolutionary considerations». En: *Genetics* 118.4, págs. 649-663. eprint: <http://www.genetics.org/content/118/4/649.full.pdf>.
- Gersen, S.L. y M.B. Keagle (2013). *The Principles of Clinical Cytogenetics*. Springer New York. URL: <https://books.google.com.mx/books?i=PT9DAAAAQBAJ>.
- Gilbert, S.F. (2000). *Developmental biology*. Sunderland (MA): Sinauer Associates. URL: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1096-8628\(2000\)9999:999%3C00::AID-AJMG1133%3E3.0.CO;2-G/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1096-8628(2000)9999:999%3C00::AID-AJMG1133%3E3.0.CO;2-G/abstract).
- (2005). *Biología del desarrollo*. Médica Panamericana. URL: <https://books.google.com.mx/books?id=F6se5w-Z6uAC>.
- González García, H., A. Blanco Quirós, C. Valbuena Crespo, P. Gutiérrez Meléndez, S. Tamames Gómez y J. Castrodeza Sanz (2010). «Incidencia del cáncer infantil en la comunidad de Castilla y León (2003-2007)». En: *Anales de Pediatría* 73.4, págs. 169-179. DOI: [10.1016/j.anpedi.2010.07.003](https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2010.07.003).
- Griffiths, A.J.F., S. R. Wessler, S. B. Carrol y J. Doebley (2012). *Introduction to Genetic Analysis*. W. H. Freeman y Company. URL: <https://books.google.es/books?id=dyPlTgEACAAJ>.
- Griffiths, A.J.F., S. R. Wessler, R. C. Lewontin y S. B. Carrol (2008). *Introduction to Genetic Analysis*. W.H. Freeman y Company. URL: <https://books.google.com.mx/books?id=14QoAQAAMAAJ>.
- Hall, J. C., W. M. Gelbart y D. R. Kankel (1976). «Mosaic Systems». En: *Ashburner, M. y E. Novitski. (1976). The Genetics and Biology of Drosophila. Volumen 1a. Academic Press*, págs. 265-314.
- Harwood, J. F., K. Chen, P. Liedo, H. G. Muller, J. L. Wang, A. E. Morice y J. R. Carey (2015). «Female access and diet affect insemination success, senescence, and the cost of reproduction in male Mexican fruit flies *Anastrepha ludens*». En: 40.1, págs. 65-71. URL: <http://doi.org/10.1111/phen.12089>.

- Huettel, B., D. P. Kreil, M. Matzke y A. J. M. Matzke (2008). «Effects of Aneuploidy on Genome Structure, Expression, and Interphase Organization in *Arabidopsis thaliana*». En: *PLOS Genetics* 4.10, págs. 1-13. DOI: [10.1371/journal.pgen.1000226](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000226). URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000226>.
- Ishihara, H., Y. Ohno, M. Fujii, J. Hara y M. Soda (2017). «Epidemiological analysis of childhood cancer in Japan based on population-based cancer registries, 1993-2009». En: *Japanese Journal of Clinical Oncology*, págs. 1-4. DOI: [10.1093/jjco/hyx041](https://doi.org/10.1093/jjco/hyx041).
- Karp, G. (2014). *Biología Celular y Molecular*. McGraw-Hill Interamericana de España S.L.
- Klaassen, C.D. y J.B. Watkins (2005). *Fundamentos de toxicología*. McGraw-Hill. URL: <https://books.google.es/books?id=4fyCAAAACA AJ>.
- Klug, W.S., M.R. Cummings, C.A. Spencer y M. A. Palladino (2013). *Conceptos de genética*. Pearson.
- Kuo, C., H. Hsieh, W. Pan, C. Chen, J. Liou, S. Lee, Y. Chang, L. Chen, C. Chen y J. Chang (2004). «BPR0L075, a Novel Synthetic Indole Compound with Antimitotic Activity in Human Cancer Cells, Exerts Effective Antitumoral Activity in Vivo». En: *Cancer Research* 64.13, págs. 4621-4628. DOI: [10.1158/0008-5472.CAN-03-3474](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3474).
- Lacadena, J.R. (1996). *Citogenética*. Editorial Complutense. URL: <https://books.google.es/books?id=VcmrQY8Fdk sC>.
- Ledezma Vaca, Pablo Antonio (2006). *Actividad genotóxica de afloramientos externos del confinamiento de residuos de cromo de "Cromatos de México" en Lechería, Edo. de México*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Lefevre, G. Jr. (1976). «A Photographic Representation and Interpretation of the Polytene Chromosomes of *Drosophila melanogaster* Salivary Glands». En: *Ashburner, M. y E. Novitski. (1976). The Genetics and Biology of Drosophila. Volumen 1a. Academic Press*, págs. 32-67.
- Leigh, B. (1976). «Ring Chromosome and Radiation induced Chromosome Loss». En: *Ashburner, M. y E. Novitski. (1976). The Genetics and Biology of Drosophila. Volumen 1b. Academic Press*, págs. 505-528.

- Lindsley, D.L. y G.G. Zimm (1992). *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press. URL: <https://books.google.es/books?id=sklm5UmoGykc>.
- Markow, T. A. y G. D. Hocutt (1998). «Reproductive Isolation in Sonoran Desert *Drosophila*.» En: *Howard, D. J. y S. H. Berlocher. (1998). Endless Forms: Species Speciation. Oxford University Press*, págs. 234-244. URL: <https://books.google.com.mx/books?id=pLzY1-wyOKwC>.
- Mason, J. M., C. S. Aaron, W. R. Lee, P. D. Smith, A. Thakar, R. Valencia, R. C. Woodruff, F.E. Würigler y S. Zimmering (1987). «A guide for performing germ cell mutagenesis assays using *Drosophila melanogaster*». En: *Mutation Research/Genetic Toxicology* 189.2, págs. 93-102. DOI: [10.1016/0165-1218\(87\)90015-2](https://doi.org/10.1016/0165-1218(87)90015-2).
- Matzkin, L., T. D. Watts y T. A. Markow (2007). «Desiccation Resistance in Four *Drosophila* Species: Sex and Population Effects». En: *Fly* 1.5, págs. 268-273. DOI: [10.4161/fly.5293](https://doi.org/10.4161/fly.5293).
- Miyashita, N. y C. H. Langley (1988). «Molecular and phenotypic variation of the *white* locus region in *Drosophila melanogaster*». En: *Genetics* 120.1, págs. 199-212. eprint: <http://www.genetics.org/content/120/1/199.full.pdf>.
- Mount, S. M., M. M. Green y G. M. Rubin (1988). «Partial Revertants of the Transposable Element-Associated Suppressible Allele *White-Apricot* in *Drosophila melanogaster*: Structures and Responsiveness to Genetic Modifiers». En: *Genetics* 118.2, págs. 221-234. eprint: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1203276/pdf/ge1182221.pdf>.
- Muñoz-Hernández, Adriana (2011). *Comparación del efecto de compuestos citostáticos en la reparación, recombinación y no disyunción mitóticas en Drosophila*. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, División de estudios de posgrado. UNAM.
- NIH-NCI (2015). *NIH-NCI: National Institutes of Health-National Cancer Institute. About Cancer*. Data updated on 09/02/2015. URL: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.
- (2016). *NIH-NCI: National Institutes of Health-National Cancer Institute. Colchicine*. Data updated on 31/10/2016. URL: <https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/>

[ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns%20=NCI_Thesaurus&code=C385](#).

- Nöthiger, R. (1970). «Sucrose density separation: a method for collecting large numbers of *Drosophila* larvae». En: *DrosInfServ* 45, pág. 177.
- Novitski, E. y Childress D. (1976). «Compound Chromosome Involving the X and the Y Chromosomes». En: *Ashburner, M. y E. Novitski. (1976). The Genetics and Biology of Drosophila. Volumen 1b. Academic Press*, págs. 487-504.
- Ostrosky Wegman, P. y M. E. Gonsebatt (1997). «Biomarcadores moleculares en la determinación de efectos xenobióticos». En: *Gaceta Médica de México* 133, págs. 93-96. eprint: http://www.anmm.org.mx/bgmm/1864_2007/1997-133-SUP1-93-96.pdf.
- Palermo, A. M. y M. D. Mudry (2015). «Daño genético y del desarrollo inducido por acetaldehído en *Drosophila melanogaster*». En: *Basic and Applied Genetics* 26.2, págs. 75-81.
- Pérez Aytés, A. (2010). «Trisomía 18: Síndrome de Edwards». En: *Protoc diagn ter pediatr*. 1, págs. 96-100. URL: http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/trisomia_18.pdf.
- Pierce, B.A. (2009). *Genética: Un enfoque conceptual*. Editorial Médica Panamericana. URL: <https://books.google.es/books?id=ALR9bgLtFhYC>.
- Pischedda, A., A. D. Stewart, M. K. Little y W. R. Rice (2011). «Male genotype influences female reproductive investment in *Drosophila melanogaster*». En: *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 278.1715, págs. 2165-2172. DOI: [10.1098/rspb.2010.2272](https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2272).
- PubChem (2016). *PubChem: Open Chemistry Database. Compound Summary for Colchicine*. Data updated on 05/11/2016. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6167#section=Top>.
- Pujol, C. J. A., C. L. Bertone y L. D. Acosta (2014). «Morbimortalidad por cáncer infantil en la República Argentina 2006-2008». En: *Arch Argent Pediatr* 112.1, págs. 50-54. DOI: [10.5546/aap.2014.50](https://doi.org/10.5546/aap.2014.50).
- Ramos Morales, P. (1993). *Manual de Laboratorio de Genética para Drosophila melanogaster*. McGraw-Hill Interamericana de México.

- Ramos Morales, P. (1994). *Efectos genotóxicos de algunas sales de arsénico en Drosophila melanogaster*. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, División de estudios de posgrado. UNAM.
- Ramos Morales, P., J. Herrera Bazán, A. Muñoz Moya, A. Muñoz Hernández, H. Rivas Martínez, B. Hernández Bernal y V. García Martínez (2006a). «Comparación de cuatro biomarcadores en la curva de concentración-efecto de moscas expuestas a la NDMA». En: *Memorias del Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Genética*.
- Ramos Morales, P., J. Herrera Bazán, A. Muñoz Moya, A. Muñoz Hernández, H. Rivas Martínez, B. Hernández Bernal, V. García Martínez y W. R. García Niño (2006b). «N-nitrosodimethylamine: from lethal concentrations to NOEC. Survival and genotoxic activity-concentration curve: effects on fertility and transgenerational induction of somatic mutation». En: *Environmental & Molecular Mutagenesis* 47.6, pág. 437.
- Repetto Jiménez, M. y G. Repetto Kuhn (2009). *Toxicología fundamental*. Ediciones Díaz de Santos. URL: <https://books.google.es/books?id=WheuVgivN6wC>.
- Salz, H. y J. W. Erickson (2010). «Sex determination in Drosophila: The view from the top». En: *Fly* 4.1, págs. 60-70. DOI: [10.4161/fly.4.1.11277](https://doi.org/10.4161/fly.4.1.11277).
- Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT), Instituto Nacional de (1999). *NTP 354: Control biológico de la exposición a genotóxicos: técnicas citogenéticas*. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales España. URL: http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/501a600/ntp_586.pdf.
- Tateishi, T., P. Soucek, Y. Caraco, F. P. Guengerich y A. J. J. Wood (1997). «Colchicine biotransformation by human liver microsomes». En: *Biochemical Pharmacology* 53.1, págs. 111-116. DOI: [10.1016/S0006-2952\(96\)00693-4](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(96)00693-4).
- Tortajada, J. F., J. García-Castell, López-Andreu J. A. y O. B. Tornero (1999). «Factores ambientales asociados a cánceres pediátricos». En: *Revista Española de Pediatría* 55.1, págs. 166-177. URL: <http://www.pehsu.org/cancer/cancerenviron/cancerenviron.htm>.
- Valencia, R., S. Abrahamson, W. R. Lee, E. S. Von Halle, R. C. Woodruff, F. E. Würgler y S. Zimmering (1984). «Chromosome mutation tests for mutagenesis in *Drosophila*

- melanogaster*». En: *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 134.1, págs. 61-88. DOI: [10.1016/0165-1110\(84\)90015-0](https://doi.org/10.1016/0165-1110(84)90015-0).
- Valtonen, T. M., K. Kangassalo, M. Pölkki y M. J. Rantala (2012). «Transgenerational Effects of Parental Larval Diet on Offspring Development Time, Adult Body Size and Pathogen Resistance in *Drosophila melanogaster*». En: *PLOS ONE* 7.2, págs. 1-9. DOI: [10.1371/journal.pone.0031611](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031611).
- Voet, D. y J.G. Voet (2006). *Bioquímica*. Médica Panamericana. URL: https://books.google.es/books?id=r5bedH%5C_aST0C.
- Vogel, E. W., U. Graf, H. J. Frei y M. M. Nivard (1999). «The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens». En: *IARC scientific publications* 146, págs. 427-470. URL: <http://europepmc.org/abstract/MED/10353398>.
- Youngson, N. A. y E. Whitelaw (2008). «Transgenerational Epigenetic Effects». En: *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 9, págs. 233-257. DOI: [10.1146/annurev.genom.9.081307.164445..](https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164445..)