



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A GENOTÓXICOS EN CÉLULAS GERMINALES
FEMENINAS DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* Y SU IMPACTO EN LA
DESCENDENCIA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. ESTEFANIA ARROYO JILOTE

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. PATRCIA RAMOS MORALES
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. RAFAEL CAMACHO CARRANZA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
Dr. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

CD. MX.

SEPTIEMBRE, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A GENOTÓXICOS EN CÉLULAS GERMINALES
FEMENINAS DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* Y SU IMPACTO EN LA
DESCENDENCIA**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

BIÓL. ESTEFANIA ARROYO JILOTE

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. PATRCIA RAMOS MORALES
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: Dr. RAFAEL CAMACHO CARRANZA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
Dr. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM**

MÉXICO, CD. MX.

SEPTIEMBRE, 2019

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

OFICIO FCIE/DAIP/0658/2019

ASUNTO: Oficio de Jurado

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 27 de mayo de 2019 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** de la alumna **ARROYO JILOTE ESTEFANIA** con número de cuenta **101001450** con la tesis titulada "Evaluación de la exposición a genotóxicos en células germinales femeninas de *Drosophila melanogaster* y su impacto en la descendencia", realizada bajo la dirección de la DRA. PATRICIA RAMOS MORALES:

Presidente:	DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
Vocal:	DRA. REGINA DORINDA MONTERO MONTOYA
Secretario:	DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA
Suplente:	DR. LUIS HUMBERTO MOJICA VÁZQUEZ
Suplente:	DRA. MARICELA VILLAGRÁN SANTA CRUZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 12 de agosto de 2019


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGNS/VMVA/ASR/gr*

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE POSGRADO

Edificio D, 1º Piso, Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán, C. P. 04510 CDMX

Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México**, por permitir mi formación como Maestra en Ciencias Biológicas y por el apoyo brindado durante la elaboración de la tesis.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada durante mis estudios de Maestría correspondientes de agosto 2014 a julio 2016. Registro de becario 630455.

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

Al **Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP)** por el apoyo recibido para asistir al congreso "46th Annual Meeting of the Environmental Mutagenesis and Genomics Society" realizado del 26 al 30 de septiembre de 2015 en New Orleans Louisiana, USA, en el cual pude presentar mis resultados preliminares.

A la **Dra. Patricia Ramos Morales**, por hacer posible dicha investigación, por su confianza, paciencia y apoyo para concluir el proyecto.

Al Comité Tutor: **Dr. Rafael Camacho Carranza** y **Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano** por las aportaciones que hicieron para enriquecer y mejorar el trabajo de investigación.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y formarme como profesionista y ahora como Maestra en Ciencias.

A los miembros del jurado: **Dra. María Eugenia Gonsebatt Bobaparte, Dra. Regina Dorinda Montero Montoya, Dr. Rafael Camacho Carranza, Dr. Luis Humberto Mojica Vázquez y Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz** por su valioso tiempo para la revisión de la tesis, por las aportaciones y correcciones que hicieron para mejorar este trabajo.

Agradecimientos técnicos a la Dra. Adriana Muñoz Hernández, a la M. en C. Yaneli Trujillo Varela y al Biól. Hugo Rivas Martínez por el apoyo académico ofrecido durante la investigación.

A la Dra. Patricia Ramos Morales por ser un ejemplo extraordinario a seguir, una fuente inagotable de inspiración, por su gran dedicación y entrega a sus alumnos, pero sobre todo por creer en mí, por brindarme su confianza, por apoyarme en buenos y malos momentos, por compartirme su conocimiento y enseñarme a vencer cualquier reto que se presente. “El profesor mediocre dice. El buen profesor explica. El profesor superior demuestra. El gran profesor inspira” Willian Arthur Ward

A Adriana por el apoyo cotidiano en el laboratorio, por sus críticas constructivas, por su conocimiento y su constancia, por brindarme de su tiempo.

A Hugo por su amistad, por los regaños y consejos, por escuchar pacientemente mis aventuras, inquietudes y dudas, por apoyarme y darme ánimos para seguir adelante.

A Blanca por brindarme tu amistad y ser un gran ejemplo de vida, por enseñarme que siempre se puede seguir adelante y por darme el valor para vencer las adversidades.

A Yaneli por estos años de amistad, por compartir buenos y no tan buenos momentos, por las discusiones con y sin solución.

A Dra. Tania Arroyo Ramírez por su insistencia para concluir esta etapa, por las correcciones realizadas en la redacción de la tesis, por apoyarme académica y moralmente en situaciones adversas.

A Gris por estar siempre al pendiente por ser una hermana mayor.

A Tania Alonso por llegar de repente y convertirme en una amiga muy especial.

A, Karla, Mayra, Gaby, Gabriel, Daniel, Rubí, Jorge y los chicos del Taller por los gratos momentos que pasamos en el laboratorio que hacen el trabajo arduo más ligero.

A mis padres Angélica y Gudmaro por su amor infinito y su apoyo incondicional, por sostenerme ante toda adversidad, por ser un ejemplo de vida.... las son insuficientes para agradecer todo lo que hacen por mí.

A Eva por su cariño y apoyo en todo momento, por estar disponible ante cualquier situación.

A Sandra y Sara por ser mis pequeñas cómplices, por compartir mis locuras, por ser y estar siempre

A Adrián Meneses Cárdenas, por estar siempre y en toda situación, por apoyarme en momentos cruciales, por compartir buenos y malos momentos, por ser mi compañero de vida.

DEDICATORIA

A mi familia:

Angélica Jilote Salazar
Gudmaro Arroyo García
Evangelina Arroyo García
Sandra Arroyo Jilote
Sara Arroyo Jilote
Adrián Meneses Cárdenas

A los Arroyo y anexados: Emigdio, Concha, Lupita, Gris, Tania, Edith, Hugo, Alejandra, Alex. Diana, Rogelio, Güero, Elías, Artemio, Boris y los sobrinos pequeños

A los Jilote: Hortencia, Cleto, Pablo, Javier, Yazmín, Marco, César, Alejandro y sus descendientes.

por el apoyo incondicional en todo momento, por ser el motor que me ayuda a seguir adelante.

A mis profesores, en especial a:

Blanca Rosa Hernández Bernal
Cecilia Verduzco Martínez
Rosalba Mayen

A mis alumnos, particularmente a:

Rubí, Dani, Ragde, Karen, Juan, Luis, Jeimy, Karla y Brenda

A mis amigos: Rosita, Lore, Mari, Diana, Karla, Iván, Thalía, Zarco, Sandra, Tukán, Kalid, Rorro, Irus, Porras, Mayra, Tole, Yaneli, Karla L., Dafne, Tania, Gabo, Robi, Lili, Manu y BamBam.

A:

Rogelio Arroyo por quererme tanto y ser un ejemplo de vida
Manu por ser mi gran amiga
Tyson por enseñarme a disfrutar la vida

Este trabajo se realizó en:

El laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental



Con el apoyo del:

Banco de Moscas



Facultad de Ciencias

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
I. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Modelos animales, un enfoque para evaluar células germinales.....	7
1.2 <i>Drosophila melanogaster</i> : un modelo <i>in vivo</i> para evaluar daño en células germinal	9
1.2.1 Generalidades.....	10
1.2.2 Células germinales primordiales de <i>Drosophila melanogaster</i>	11
1.3 Formación y maduración de las células germinales de la línea paterna	14
1.4 Formación y maduración de las células germinales de la línea materna.....	16
1.4.1 Determinación del ovocito y meiosis.....	20
1.4.2 Componentes citoplasmáticos del ovocito.....	23
1.5 ¿Cómo evaluar el daño en células germinales de <i>Drosophila melanogaster</i> ?.....	25
1.5.1 Capacidad reproductiva: una herramienta adicional para evaluar genotoxicidad en células germinales	25
1.5.2 Frecuencia de recombinación. Una alternativa para medir el daño potencial en células germinales.....	26
II. ANTECEDENTES.....	28
2.1 Objetivos.....	30
2.2 Hipótesis.....	31
2.3 Justificación.....	32
III. METODOLOGIA GENERAL.....	33
3.1 Compuesto para tratamiento: MMS.....	33
3.2 Marcadores fenotípicos.....	33

3.3 Sistema de cruza.....	34
3.4 Protocolos.....	35
3.5 Análisis Estadístico.....	38
3.5.1. Toxicidad del MMS.....	38
3.5.2. Efecto del MMS en las células germinales: fertilidad, cantidad de progenie y frecuencia de recombinación.....	38
3.6.3. Selección precigótica y postcigótica por exposición al MMS.....	39
IV. PROTOCOLO 1. EXPOSICIÓN DIRECTA.....	40
4.1 Método del protocolo 1	40
4.1.1 Obtención de larvas para el tratamiento.....	40
4.1.2 Administración del tratamiento.....	40
4.1.3 Esquemas de cruza de las moscas F ₁ expuestas.....	41
4.1.4 Selección precigótica y postcigótica por exposición al MMS.....	43
4.2 Resultados del protocolo 1.....	45
4.2.1 Toxicidad de las moscas expuestas a MMS.....	45
4.2.2 Capacidad reproductiva de las moscas F ₁ expuestas a MMS	47
4.2.3 Recombinación en las células germinales de las hembras F ₁	50
4.2.4 Selección precigótica y postcigótica por la exposición directa a MMS.....	51
V. PROTOCOLO 2. EXPOSICIÓN INDIRECTA.....	60
5.1 Método del protocolo 2.....	60
5.1.1 Administración del tratamiento.....	60
5.1.2 Esquemas de cruza de las moscas progenitoras expuestas al MMS y de su progenie F ₁	60
5.2 Resultados del protocolo 2.....	64
5.2.1 Toxicidad de las moscas progenitoras expuestas a MMS.....	64

5.2.2 Capacidad reproductiva de las moscas progenitoras expuestas a MMS	66
5.2.3 Capacidad reproductiva de las moscas F ₁ no expuestas provenientes de hembras o machos expuestos a MMS	69
5.2.4 Frecuencia de recombinación en las células germinales de las hembras F ₁ hijas de hembras o machos tratados.....	74
5.3 Comparación de la exposición directa e indirecta de las células germinales de la línea materna y paterna.....	76
VI. DISCUSIÓN.....	79
6.1 Toxicidad del MMS	79
6.2 ¿La capacidad reproductiva de los organismos expuestos en etapas tempranas a MMS fue afectada?.....	80
6.2.1. ¿La capacidad reproductiva de hembras y machos expuestos a MSS fue similar?.....	81
6.2.2 ¿La respuesta diferencial entre la capacidad reproductiva de hembras y machos se debe a mecanismos de selección?.....	82
6.2.3. ¿Cómo la capacidad reproductiva de las hembras puede ser modulada por los machos?.....	84
6.3 ¿La exposición directa a MMS no afectó a las células germinales de la línea materna?.	85
6.3.1 Evidencias de daño en las células germinales de la línea materna por MMS...	87
6.3.2 Modificaciones en la frecuencia de recombinación.....	90
VII. CONCLUSIONES.....	92
VIII. LITERATURA CITADA.....	94

RESUMEN

Las células germinales son células limitadas a ser ovocitos o espermatozoides, como resultado de un proceso de división y diferenciación celular prolongada y compartimentalizada en tiempo y espacio. Los agentes genotóxicos pueden afectar este proceso, modificando el tipo y la proporción de los gametos producidos, dañando su integridad, su capacidad para contribuir a la formación de la siguiente generación, e incluso alterar la viabilidad y desarrollo de sus descendientes. La mayoría de los estudios que evalúan este efecto, tanto en otros modelos biológicos como en *Drosophila melanogaster*, se han enfocado en la línea germinal paterna.

Por lo anterior, existe poca información acerca del efecto de los genotóxicos en la capacidad reproductiva en la línea germinal materna, y la escasa información que encontramos se encuentra limitada a las células germinales femeninas tardías (no embrionarias), de ahí que sea importante la caracterización de la respuesta genotóxica en las células germinales tempranas de las hembras, ya que además de contribuir con la mitad de la información genética, los ovocitos son células que contribuyen con proteínas, RNA y otros factores esenciales para el desarrollo del embrión y la formación del nuevo individuo (Dworkin *et al.*, 1990; Greiner *et al.*, 2015; Despic *et al.*, 2017).

El objetivo general de este trabajo fue evaluar y caracterizar el efecto *in vivo* del genotóxico metil metano sulfonato (MMS) en las células germinales tempranas de la línea femenina de *Drosophila melanogaster* a través de biomarcadores de la capacidad reproductiva (fertilidad y cantidad de prole por pareja) y de la frecuencia de recombinación entre los genes *white-miniature* estimada en sus descendientes. Se utilizó un sistema de cruce modificado al tradicional de mapeo genético (Sturtevant, 1913) para los genes ligados al cromosoma X; *white* (*w*) y *miniature* (*m*). Se hizo la cruce progenitora: hembras w^+m^+ / w^+m^+ X machos wm/Y se recuperó la prole F_1 y se siguieron parejas individuales para analizar la frecuencia de recombinación en la generación F_2 entre los genes *w* y *m*.

Con la finalidad de comparar el efecto de la exposición directa e indirecta de las células germinales de las hembras F_1 al MMS se realizaron dos protocolos con el sistema de cruce descrito anteriormente. En el primer protocolo se evaluó la exposición directa, larvas F_1 fueron alimentada con diluciones sucesivas de MMS (0.24 μ M - 1 mM) o agua destilada (testigo negativo), con las moscas recobradas del tratamiento se realizaron tres esquemas de cruce: hembras tratadas y machos tratados (T X T), hembras tratadas por machos no tratados (T X NT) y hembras no tratadas por machos tratados (NT X T) con la finalidad de caracterizar el efecto en la generación inmediata (F_2).

Las concentraciones 5mM y 10 mM de MMS fueron letales. En las cruzas: TXT y NTXT la fertilidad y progenie promedio disminuyó en las concentraciones más altas. La frecuencia de recombinación entre los genes *w-m* en la progenie de los individuos expuestos se modificó en algunas concentraciones. La progenie de la crusa TXT fue la más afectada, las células germinales de machos F₁ expuestos al MMS fueron aparentemente más afectadas que las células germinales de hembras F₁.

Para determinar si la respuesta diferencial entre las células germinales de hembras y machos expuestas se debe a un proceso de selección de las células germinales en las hembras antes de la formación del cigoto o después, se midieron los siguientes biomarcadores de selección: porcentaje de tubos con huevos, número de huevos ovopositados, cantidad de progenie adulta recobrada, viabilidad y pérdida de individuos. En las cruzas que involucraban los progenitores machos (NT x T y T x T) el porcentaje de tubos con huevos, la viabilidad y progenie promedio se vieron altamente afectados en las concentraciones más altas de MMS, mientras que los efectos aparentemente más leves se observaron en la crusa (T X NT). La cual presentó una mayor proporción de hembras que ovopositaron pero el número de huevos que puso cada hembra fue menor en todas las concentraciones.

El segundo protocolo evaluó la exposición indirecta, en la que el tratamiento con MMS se dio a los progenitores, los cuales se cruzaron en dos esquemas: T x NT y NT x T. De la progenie F₁ se sembraron parejas de hermanos para obtener la F₂. La progenie se clasificó por fenotipo para calcular las frecuencias de recombinación entre los genes. Las concentraciones 5mM y 10mM de MMS fueron letales. La fertilidad y la progenie por pareja de los machos tratados disminuyó por el tratamiento. La fertilidad y la progenie por pareja de la progenie F₁ no expuesta se afectó en mayor grado en los descendientes (F₂) de las hembras progenitoras tratadas que en la progenie F₂ proveniente de los machos tratados. Las frecuencias entre los genes *w-m* presentaron diferencias dependiendo del progenitor tratado.

El efecto *in vivo* del MMS en las células germinales tempranas de la línea femenina de *D. melanogaster* mostró modificaciones en la capacidad reproductiva dependiendo del contexto ambiental en el que se formaron, es decir, en función del progenitor tratado con MMS, esta respuesta fue más evidente en las concentraciones más altas. Los resultados sugieren que existen mecanismos de selección precigótica y postcigótica que podrían explicar parcialmente las diferencias entre la respuesta de hembras tratadas, machos tratados o ambos progenitores. El tratamiento con MMS de las células germinales de los progenitores altera la capacidad reproductiva de la generación F₁, y la frecuencia de recombinación de las células germinales de las hembras F₁.

ABSTRACT

Germ cells are limited to be eggs or sperm, as a result of a process of division, differentiation and compartmentalized in the time and the space. The genotoxic agents can affect this process, modifying the type and proportion of the produced gametes, their integrity and ability to contribute to the formation of the next generation. They can even alter the viability and development of their descendants. The most studies have focused on the effect in paternal germ line, both in other biological models and in *Drosophila melanogaster*.

Due to the above, there is little information about the effect of genotoxicity on reproductive capacity in the maternal germ line, and the limited information we find is limited to late female germ cells (non-embryonic). For these reason is important assess of the genotoxic response in the early germ cells of females, because in addition to contributing half of the genetic information, the ovules provide proteins, RNA and other factors essential for the development of the embryo and the formation of new individual (Dworkin et al, 1990; Greiner, et al, 2015; Despici et al, 2017).

The principal goal of this work is to asses and characterize the *in vivo* effect of genotoxic methyl methane sulfonate (MMS) on the early germ cells of the female line of *Drosophila melanogaster* through biomarkers of reproductive capacity (fertility and number of progeny per couple) and the recombination frequency between the white-miniature genes estimated in their descendants. We used a cross system modified to the traditional genetic mapping (Sturtevant, 1913) for genes linked to the X chromosome: *white* (*w*) and *miniature* (*m*). Parental cross was females $w+m+/w+m+$ X males wm/Y , F_1 progeny was recovered and individual mates followed to analyze the recombination frequency in the F_2 generation between *w* and *m* genes.

In order to compare the effect of direct and indirect exposure of the germ cells of the F_1 females to the MMS, two protocols were performed with the cross system described. In the first protocol the direct exposure was evaluated, the F_1 larvae were fed with successive dilutions of MMS (0.24 μ M - 1mM) or distilled water (negative control), with the flies recovered from the treatment three crossing schemes were made: treated females and males treated (TXT), females treated by untreated males (TX NT) and females not treated by treated males (NT XT) in order to characterize the effect in the immediate generation (F_2).

The concentrations 5 mM y 10 mM of MMS were lethal. In crosses: TXT and NTXT fertility and average progeny decreased at the highest concentrations. The recombination frequency between the *w-m* genes

in the progeny of the exposed individuals was modified in some concentrations. The progeny of the TXT crosses were the most affected, the germ cells of F₁ males exposed to MMS were apparently more affected than the germ cells of F₁ females.

To determine if the differential response between the germ cells of exposed females and males is due to an process of selection of the germ cells in females prior to zygote formation or post-zygotic loss, the following selection biomarkers were measured: percentage of tubes with eggs, number of oviposited eggs, number of adult progeny recovered, viability and loss of individuals. In the crosses with treated male parental (NT x T and T x T) the percentage of tubes with eggs, the viability and average progeny were highly affected while the apparently milder effects were observed in the cross (T X NT). The cross (T X NT) had a higher proportion of females that oviposited but the number of eggs decrease in all concentrations.

The second protocol evaluated the indirect exposure, the treatment with MMS was given to the parents, which were crossed in two schemes: T x NT and NT x T. The F₁ was cross in individual couples to obtain the F₂. The F₂ progeny were classified by phenotype to calculate the recombination frequencies between the genes. The concentrations 5 mM y 10 mM of MMS were lethal. Fertility and progeny of treated males decreased by treatment. The fertility and progeny of the unexposed F₁ offspring were affected to a greater degree in the descendants of the treated females than in the offspring from the treated males. The recombination frequencies between the *w-m* genes presented differences depending on the treated parent.

The *in vivo* effect of the MMS on the early germ cells of the female line of *D. melanogaster* showed modifications in the reproductive capacity depending on the environmental context in which they were formed, that is to say, in function of the parental treated with MMS. This response is most evident at the highest concentrations. The results suggest mechanisms of prezygotic and postzygotic selection that could partially explain the differences between the response of treated females, treated males or both parents. The exposure of the germ cells of the parentals to the MMS alters the reproductive capacity of the F₁ generation and the recombination of the germ cells of the F₁ females.

I. INTRODUCCIÓN

Las células germinales tienen una función única en el cuerpo; no son necesarias para la supervivencia o función inmediata fisiológica del individuo, más bien, están dotadas con la capacidad para contribuir a la formación de la siguiente generación (Lehmann, 2012). Como tal, el desarrollo adecuado de las células germinales y la integridad de su genoma son fundamentales para la salud de los futuros organismos y la supervivencia de las especies (Ferreira y Allard, 2015).

Si bien es cierto que la unión de las células germinales masculinas y femeninas da origen a todas las células en el nuevo individuo, durante su formación, éstas son células unipotentes limitadas a ser óvulos o espermatozoides, luego de un proceso de diferenciación prolongado, compartimentalizado en tiempo y espacio que incluye tanto división celular por mitosis y diferenciación por meiosis, así como la interacción con varios tipos celulares (Lehmann, 2012; Lesch y Page, 2012; Yauk *et al.*, 2015a). Tales características generan que las células germinales tengan atributos particulares y específicos que las hacen diferentes de las células somáticas, en el cuadro 1 se indican algunos de estos aspectos.

Cuadro 1 Características particulares de las células germinales. Modificado de Yauk *et al.*, 2015a.

<ul style="list-style-type: none">➤ División celular:<ul style="list-style-type: none">* Mitosis y Meiosis➤ Formación, maduración y diferenciación prolongada:<ul style="list-style-type: none">* los ovocitos son arrestados en la profase I hasta la pubertad (humanos)* los ovocitos completan la meiosis después de la fecundación➤ Interacción en el desarrollo y durante la diferenciación con células somáticas especializadas➤ Presentan cambios morfológicos importantes:<ul style="list-style-type: none">* los óvulos incrementan su volumen* los espermatozoides reducen su volumen y adquieren motilidad➤ Reducción del nivel de ploidía.➤ Estructura y organización de la cromatina:<ul style="list-style-type: none">* los espermatozoides reemplazan las histonas por proteínas de transición y luego protaminas.➤ Mecanismos de reparación:<ul style="list-style-type: none">* las etapas finales de la espermatogénesis son deficientes en reparación* la maquinaria de reparación del ADN del óvulo en el embrión temprano repara los daños de las fases tardías de la espermatogénesis

Durante el proceso de diferenciación, las células germinales pueden ser sensibles a influencias ambientales, como la exposición a contaminantes o a algún compuesto físico, químico o biológico; tales influencias podrían alterar la cantidad, calidad, expresión o arreglo del material genético mediante mecanismos como la: mutación puntual, delección, adición de bases, translocaciones, duplicación, rompimientos de cromosomas, no disyunción o recombinación, entre otros (Winder y Bonin,1983; Wyrobek *et al.*,2007).

Las alteraciones en las células germinales pueden comprometer la capacidad reproductiva de los organismos expuestos, así como provocar una amplia variedad de resultados, algunos de los cuales pueden ser perjudiciales en la descendencia, desde la letalidad embrionaria hasta enfermedades genéticas (Singer y Yauk, 2010; Yauk *et al.*, 2015a; Yauk *et al.*, 2015b). De ahí que el estudio del efecto de los genotóxicos en las células germinales de organismos expuestos y su impacto en las siguientes generaciones sea importante y de gran interés (DeMarini,2012).

A pesar de esto, la reducción del daño genético en la línea germinal no fue una preocupación prioritaria durante varias décadas, en comparación con la prevención del daño en células somáticas, como es el caso del cáncer (Singer y Yauk,2010). En gran medida, ello se debió a que en la mayoría de las agencias regulatorias consideraban los siguientes puntos:

- a) Supuesto de que las células germinales son menos susceptibles al daño genético que las células somáticas (Shelby *et al.*, 1993).
- b) Desconocimiento del origen y el impacto de las mutaciones en la línea germinal (Singer y Yauk, 2010).
- c) Falta de pruebas definitivas de mutágenos germinales (Wyrobek *et al.*,2007; DeMarini, 2012).
- d) Falta de métodos prácticos y rutinariamente utilizados para las células germinales (Yauk *et al.*, 2013; Yauk *et al.*, 2015b).
- e) Extrapolación de las pruebas de mutagenicidad somática para detectar mutágenos de la línea germinal (Yauk *et al.*, 2015a).

No obstante, en las últimas décadas la evidencia científica de que la exposición a agentes mutágenos puede inducir mutaciones germinales ha incrementado, demostrando que las células germinales son susceptibles al daño genético, por lo tanto, las consecuencias del posible daño genético se han convertido en una preocupación que se ha visto reflejada en el desarrollo de políticas que prioricen la protección de la línea germinal y de las generaciones futuras (Singer y Yauk, 2010; DeMarini, 2012; Yauk *et al.*, 2013; Yauk *et al.*, 2015a; Yauk *et al.*, 2015b).

1.1 Modelos animales, un enfoque para evaluar células germinales.

Debido a las características particulares de las células germinales, la capacidad de explorar de manera eficiente los efectos inducidos por la exposición ambiental a partir de células somáticas es limitada (Wyrobek *et al.*, 2007), por lo que, para evaluar con precisión el impacto de mutágenos ambientales en la integridad de las células germinales, son indispensables estudios que contemplen los aspectos únicos de la línea germinal (Adler, 1996; Singer y Yaulk, 2010; Ferreira y Allard, 2015).

Diferentes enfoques y metodologías han demostrado, incluidos los mamíferos, la mutagenicidad en las células germinales en una variedad de organismos (Shelby *et al.*, 1993; DeMarini, 2012; Lehmann, 2012; Yaulk *et al.*, 2015a) pero, hasta la fecha, no se ha identificado ningún mutágeno de células germinales humanas, aunque se conocen cerca de 50 mutágenos potenciales (DeMarini, 2012). La falta de evidencias se debe fundamentalmente a dos causas: la primera, la escasa evidencia epidemiológica y la segunda, la extrapolación y correlación de los resultados *in vitro* vs *in vivo* (Shelby *et al.*, 1993).

En cuanto a la primera, hace referencia a las deficiencias en la evidencia epidemiológica de que la exposición a mutágenos puede producir efectos genéticos hereditarios en humanos, pues es complicado identificar a las poblaciones expuestas, ya que los niveles de exposición son a menudo bajos, el tamaño de la población de descendientes potencialmente afectados es pequeño, los grupos controles son cuestionables (Shelby *et al.*, 1993; DeMarini, 2012).

Ahora bien, en cuanto a la segunda causa, los ensayos *in vitro* de alto rendimiento utilizados en la actualidad para clasificar rápidamente miles de productos químicos mutagénicos pueden no capturar adecuadamente los resultados particulares para las células germinales (Singer y Yaulk, 2010; Yauk *et al.* 2013), porque la investigación de porciones subcelulares de diferentes órganos y tipos celulares de gónadas femeninas y masculinas evalúan solo una pequeña fracción de espacio biológico, sin considerar las interacciones con otros tipos celulares fundamentales en la formación y maduración de los gametos (Avanesian, 2009; Truong *et al.*, 2016).

De esta manera, los sistemas de prueba *in vitro*, aunque son esencialmente útiles para investigar el potencial de toxicidad y para identificar los posibles mecanismos de acción de las sustancias mutagénicas, tienen una capacidad limitada para evaluar funciones reproductivas integrativas complejas, incrementando la incertidumbre de la extrapolación de los resultados *in vitro* a niveles más altos de organización, por lo que su uso para predecir un potencial de riesgo humano es limitado (IPCS, 2001; Avanesian, 2009; Truong, *et al.*, 2016).

Por estas razones, los modelos animales juegan un papel importante y fundamental para estimar los efectos hereditarios de mutágenos ambientales. En este sentido, los modelos más utilizados han sido los roedores, dada su cercanía evolutiva con los humanos, no obstante, las células germinales de mamíferos, por su largo tiempo de desarrollo y la dificultad de acceso, presentan desafíos para su estudio (Lundby *et al.*, 2016); además, los recientes enfoques bioéticos han reducido drásticamente los ensayos con estos animales (EPA, 1996).

De ahí que el empleo de modelos alternativos ha adquirido importancia, pues permiten solucionar algunas de estas brechas en las pruebas de efectos genéticos hereditarios. Estos modelos alternativos presentan ventajas sobre modelos de mamíferos, entre ellos el manejo y la manipulación, la realización de análisis de alto rendimiento, el bajo costo de mantenimiento, la reducción de espacio y, además, permiten, estudiar aspectos biológicos difíciles en otros modelos, (IPCS, 2001; Allard, 2015; Ferreira y Allard, 2015).

Dentro de estas ventajas, una esencial, es que se puede trabajar utilizando organismos *in vivo*, lo cual permite:

- ❖ Detectar rápidamente diferentes modos de bioactividad de los genotóxicos, (Truong, *et al.*, 2016).
- ❖ Medir la respuesta de los organismos considerando interacciones complejas tanto de distintos tipos celulares como de expresión de genes (IPCS, 2001).
- ❖ Determinar si la capacidad reproductora de los organismos expuestos es afectada, si son capaces de formar nuevos individuos y el estado de estos (Avanesian, 2009, Trujillo, 2015).
- ❖ Establecer si una sustancia produce perturbaciones durante el desarrollo induciendo cambios en el fenotipo (Avanesian, 2009).
- ❖ Seguir efectos genéticos hereditarios ocasionados por agentes mutagénicos (Shelby *et al.*, 1993).
- ❖ Evaluar el impacto de la exposición a genotóxicos a largo plazo (Ferreira y Allard, 2015).
- ❖ Estudiar la resistencia y susceptibilidad en poblaciones de organismos expuestos (Islas, 2006).

Entre los modelos alternativos destacan: *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio* y *Drosophila melanogaster*, organismos de los que se tiene un profundo conocimiento biológico, que sirve como base sólida para una amplia gama de recursos genéticos, moleculares y herramientas citológicas para el estudio de las células germinales (Allard, 2015; Ferreira y Allard, 2015). Además,

tienen una aceptación y aplicación a la toxicidad de células germinales (Ferreira y Allard, 2015; Truong, *et al.*, 2016; Lundby, 2016).

1.2 *Drosophila melanogaster*: un modelo *in vivo* para evaluar daño en células germinales

Drosophila melanogaster se ha utilizado desde hace más de 100 años en la investigación científica, su larga trayectoria lo ha convertido en un modelo canónico de la genética moderna y los descubrimientos fundamentales que se han originado de su uso han sido claves para la comprensión de muchos campos que incluyen bioquímica, transducción de señales, biología molecular, fisiología, biología del desarrollo, genética, genómica y evolución (Michell, y Combes, 1984; Würzler y Graf, 1985; Rubin y Lewis, 2000).

En el año 2000 se publicó el genoma completo de *Drosophila melanogaster*, un genoma complejo de 180 megabases con 13, 601 genes de los cuales comparte con los humanos el 60%, incluyendo aspectos del desarrollo y el comportamiento (Adams, *et al.*, 2000); tales factores han consolidado a la mosca del vinagre como un modelo ideal para el estudio de procesos biológicos complejos como enfermedades humanas, entre las que destacan cáncer, diabetes, autismo, Alzheimer, Parkinson (Beckingham *et al.*, 2005; Botas, 2007).

La versatilidad de este modelo ha facilitado el desarrollo de herramientas genéticas y moleculares que han permitido realizar estudios *in vivo* e *in vitro* que permiten analizar a detalle la estructura y función de los genes (Beckingham *et al.*, 2005). En el campo de la toxicología genética, se han generado metodologías que permiten la detección del daño genético ocasionado por varios eventos inducidos en distintos tipos celulares, tanto para hembras como para machos, entre los que se encuentran: rompimiento de DNA, mutaciones puntuales, deleciones, translocaciones e inversiones cromosómicas, no disyunciones y recombinación, entre otros (Sobels, 1974; Vogel, 1974; Sobels y Vogel, 1976; Dezzani *et al.*, 1982).

La mayoría de estas pruebas son metodologías *in vivo* que ocupan organismos completos, gracias a que existe una colección de aproximadamente 12,000 mutantes genéticos que presentan marcadores fenotípicos (Lindsley y Zimm, 1992), lo cual facilita la identificación de variaciones o arreglos genéticos específicos que permiten realizar diferentes sistemas de cruce para detectar y caracterizar la acción de agentes mutagénicos (Vogel, 1974) y evaluar efectos hereditarios de mutágenos ambientales a largo plazo rastreando la transmisión de los cromosomas de una generación a la siguiente (Ferreira y Allard, 2015).

Asimismo, *D. melanogaster* es considerada una especie clave para pruebas *in vivo* de sustancias genotóxicas, debido a que es capaz de realizar las mismas reacciones de activación metabólica que los

mamíferos (Sobels, 1976; Zimmering *et al.*, 1986), dada la presencia de un complejo enzimático microsomal parecido a la fracción S9 del hígado de los mamíferos (Sobels y Vogel, 1976; Baars *et al.*, 1980), dicho complejo contiene numerosas enzimas de la familia P450 (Adams *et al.*, 2000), las cuales participan de manera importante en la activación de promutágenos y en el metabolismo de xenobióticos (Clark, 1982; Hällstrom *et al.*, 1981a, Hällstrom y Grafstrom, 1981b) por lo que no se requiere un sistema metabólico exógeno como con otros modelos (Zijlstra y Vogel, 1988).

Las características antes mencionadas son cruciales para el empleo de *D. melanogaster* como modelo *in vivo* para identificar agentes mutagénicos tanto en células somáticas como en células germinales. En el caso de la mutagenicidad de células germinales, *D. melanogaster*, fue el primer organismo en el que se caracterizaron dichos efectos (Muller, 1930) y, desde entonces, ha sido uno de los organismos de prueba más utilizados para detectar mutaciones en células germinales (Lee *et al.*, 1983).

1.2.1. Generalidades

La mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, es un insecto holometábolo, que pertenece al orden Diptera, (Demerec, 1994) dentro del grupo artificial llamado melanogaster del subgénero Sophophora (Jeffs *et al.*, 1994; Russo, 1995). Es una especie cosmopolita (Bock y Wheeler, 1972), se encuentra principalmente en las frutas donde la fermentación se ha iniciado y en alimentos con alto contenido de ácido acético (Ramos *et al.*, 1993; Powell, 1997).

En la figura 1.1 se presenta el ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*, el cual dura de 10 a 12 días a 25°C y 60% de humedad y consta de cuatro fases: huevo, larva, pupa y adulto (Vogel, 1985). Los huevos fértiles usualmente se ovopositan pocas horas después del apareamiento, aproximadamente a las 22-24 horas eclosionan las larvas e inmediatamente comienzan a alimentarse; éstas a su vez, presentan tres estadios, 1, 2 y 3, que duran 24, 24 y 48 horas, respectivamente (Sokal *et al.*, 1960). La siguiente fase, es decir, la de pupa, inicia a las 120 horas y dura aproximadamente de cuatro a cinco días, cuando finalmente, los imagos o moscas adultas emergen (Ashbuner *et al.*, 2005).

Los adultos miden entre 2 y 3 mm por lo que se requiere de poco espacio para su desarrollo, de igual forma su mantenimiento resulta de bajo costo (Sobels y Vogel, 1976; Vogel, 1987); además, las moscas adultas tienen un tiempo de maduración corto y se presenta dimorfismo sexual entre machos y hembras, lo que hace fácil su identificación y clasificación, permitiendo hacer cruzas específicas que facilitan dar seguimiento a su descendencia (Ferreira y Allard 2015). La cantidad de progenie que se obtienen en las cruzas es numerosa debido a que las hembras llegan a ovopositar hasta 100 huevos por día (Ashbuner *et al.*, 2005), con una cantidad de progenie promedio de 500 individuos a lo largo de su vida (Vogel,

1987); por su parte, los machos llegan a tener una progenie de 10000 a 14000 descendientes a lo largo de su vida (Ashbuner *et al.*, 2005).

En suma, las características generales de *D. melanogaster*, su corto tiempo generacional, la progenie numerosa que facilita el seguimiento a través de varias generaciones, así como el uso de un equipo de laboratorio básico y de bajo costo hacen de la mosca del vinagre un sistema de prueba eucariótico de genotoxicidad *in vivo* en células germinales (Vogel, 1974).

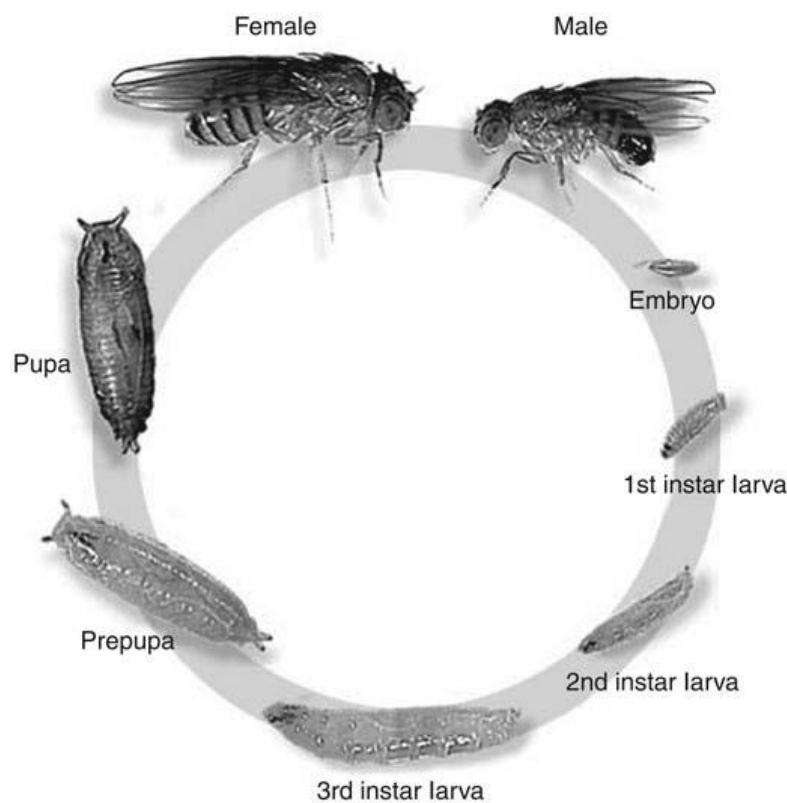


Fig. 1.1 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. Modificado de Martínez, 2008 en *Drosophila Methods and Protocols*.

Adicionalmente, *Drosophila melanogaster* ofrece también otra serie de ventajas para evaluar efectos genéticos de mutaciones germinales heredables. En el aspecto metabólico hay evidencia de que diferentes estadios de la espermatogénesis presentan especificidad en la respuesta a la actividad mutagénica (Auberbark, 2005; Chandley y Bateman, 1962); en el aspecto morfológico y fisiológico, se encuentran múltiples similitudes con el sistema reproductivo de mamíferos, como por ejemplo las estructuras de los órganos

reproductivos, las hormonas sexuales, las proteínas conservadas implicadas en desarrollo genitourinario y los mecanismos moleculares del proceso de formación y maduración de las células germinales (Avanesian, 2009).

1.2.2. Células germinales primordiales de *Drosophila melanogaster*

El embrión de *D. melanogaster* se desarrolla a partir del óvulo fertilizado a través de una serie de divisiones nucleares sincronizadas y rápidas en un sincicio (Williamson y Lehmann, 1996). Después de la décima ronda de división de 8 a 20 núcleos migran al polo posterior del embrión y, una vez que llegan al germoplasma del polo posterior, se rodean de membrana celular, estas primeras células tienen de

cero a dos divisiones adicionales no sincrónicas dando lugar a cerca de 40 células polares, precursoras de la línea germinal (Sonnenblick, 1950; Wieschaus *et al.*, 1981; Lehmann, 1995).

Después de la celularización, las células polares arrestan su ciclo celular, inhiben la transcripción y quedan comprometidas con el destino de las células germinales (Williamson and Lehmann, 1996). Como en otros organismos, las células germinales primordiales muestran un comportamiento invasivo y migratorio desde su lugar de origen hasta el componente somático de la gónada con el que están estrechamente asociadas (Jaglarz y Howard, 1994). La migración es indispensable, ya que las células germinales y el tejido gonadal somático se forman en diferentes lugares y en tiempos desiguales durante el desarrollo embrionario (Santos y Lehmann, 2004).

Durante la gastrulación las células germinales primordiales asociadas a las células que darán origen al intestino medio se extienden al lado dorsal del embrión en estrecha asociación con el intestino medio primordial posterior; conforme el intestino medio primordial se invagina, las células germinales se transportan al interior del embrión. Posteriormente, éstas migran activamente a través de varias capas del epitelio del primordio del intestino medio hasta llegar al mesodermo adyacente, donde se asocian con las células precursoras gonadal somáticas (Jaglarz y Howard, 1994; Santos y Lehmann, 2004). En la figura 1.2 se muestran las diferentes etapas de migración de las células germinales de *D. melanogaster*.

Al final de la embriogénesis, las células germinales primordiales quedan encapsuladas por las células somáticas gonadales, formando las gónadas embrionarias ubicadas en el quinto segmento abdominal de cada embrión (Sonnenblick, 1950). El número de células germinales primordiales incorporadas en las gónadas embrionarias es diferente para hembras y machos, en promedio las gónadas femeninas contienen menos células polares que las gónadas masculinas (Sonnenblick, 1941, Poirié *et al.*, 1995).

La determinación sexual en las células germinales está controlada por señales propias de la línea germinal y por interacciones inductivas con la línea somática, en contraste con el mecanismo de determinación del sexo independiente para cada célula somática, (Williamson and Lehman, 1996). Por lo tanto, ni las células germinales XX ni las XY pueden desarrollar una gametogénesis regular en ausencia de señales específicas de los tejidos somáticos que se encuentran a su alrededor (Nöthiger *et al.*, 1989, Steinmann-Zwicky *et al.*, 1989, Steinmann-Zwicky, 1994).

Etapas del desarrollo embrionario

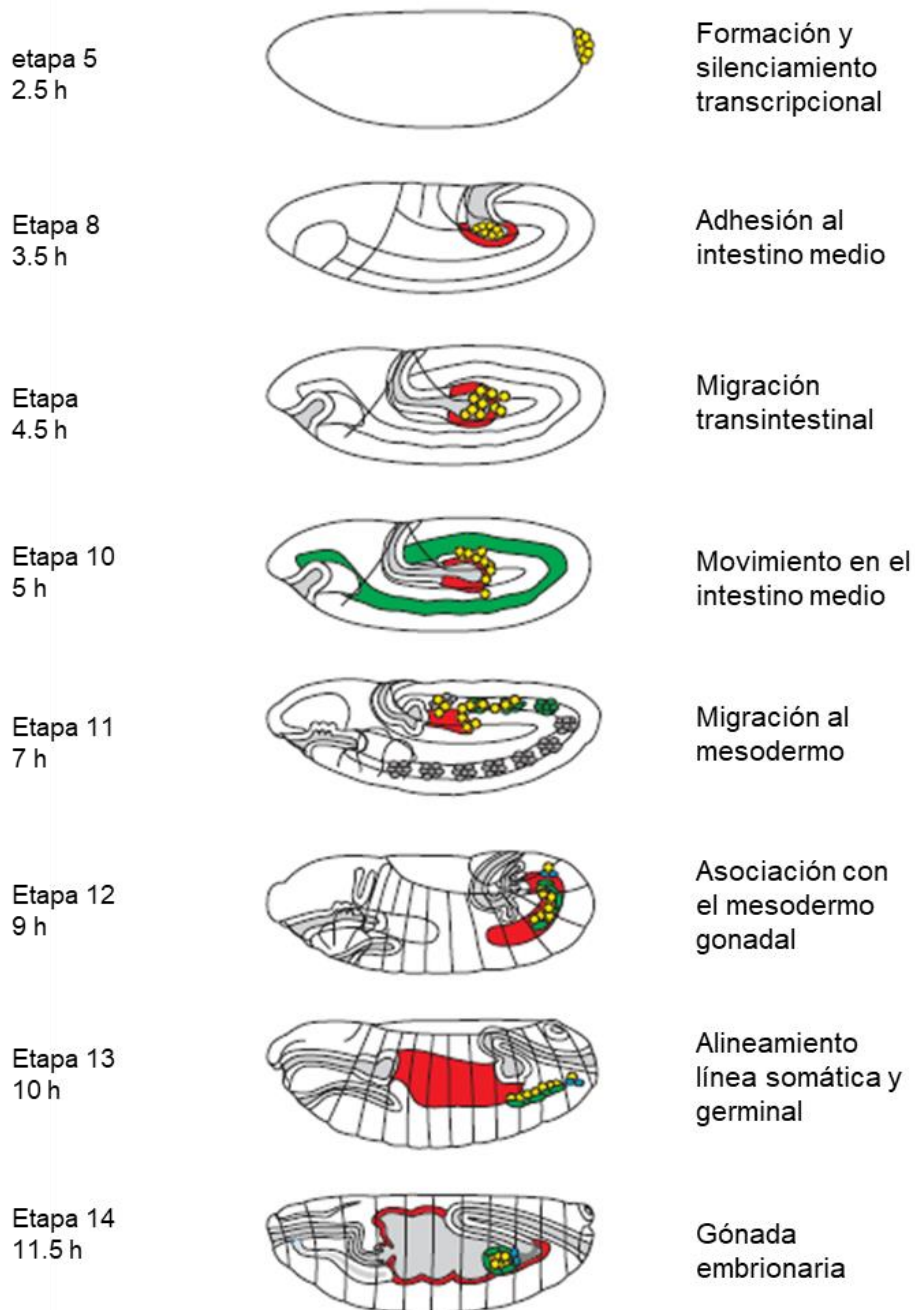


Fig. 1.2 Migración de las células precursoras germinales durante el desarrollo embrionario. Amarillo, células germinales; rojo, intestino medio; verde, mesodermo; azul, precursores gonadales somáticos masculinos dibujados como en morfogénesis de las gónadas masculinas. Modificado de Santos y Leghman, 2004.

1.3. Formación y maduración de las células germinales de la línea paterna.

La línea germinal masculina comienza a diferenciarse al final de la embriogénesis; las células germinales XY inician la diferenciación hacia la línea germinal masculina independientemente del sexo del tejido circundante; sin embargo, las células germinales requieren un ambiente somático masculino para que puedan diferenciarse completamente en espermatozoides móviles (Steinmann-Zwicky *et al.*, 1989).

La diferenciación del testículo comienza tan pronto la larva eclosiona del huevo, en las larvas de tercer estadio las estructuras testiculares somáticas son visibles, ya en las pupas y en los adultos los testículos se encuentran bien definidos y maduros (Fig. 1.3) (Sonnenblick, 1941; Fuller, 1993). Durante gran parte de la fase larvaria, las espermatogonias se dividen por mitosis y los espermatocitos primarios crecen en volumen, esta condición se mantiene hasta la pupación, etapa en la cual los espermatocitos primarios completan su crecimiento e inician la meiosis. Este proceso continúa durante toda la etapa reproductiva de los machos (Demereck, 1994; Giansanti *et al.*, 2012).

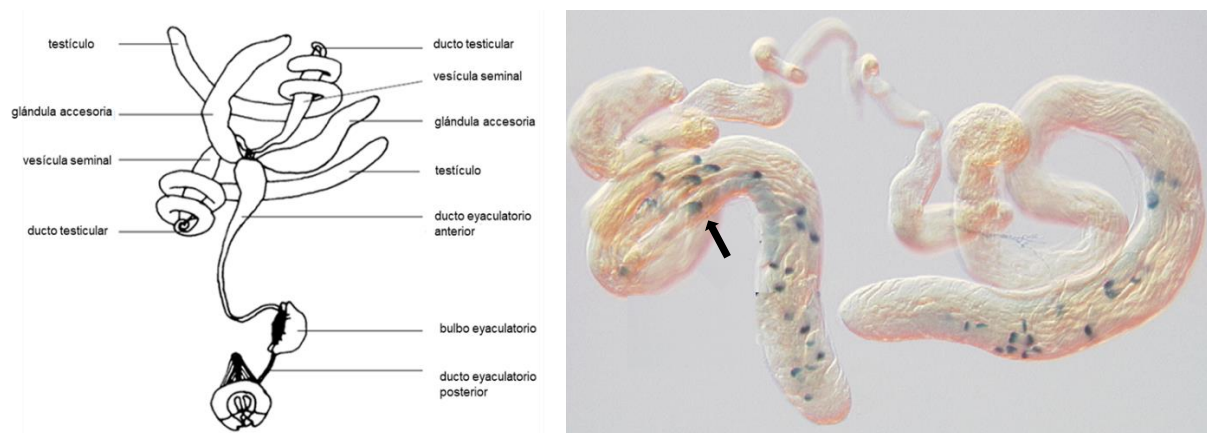


Fig. 1.3 Del lado izquierdo se representa el sistema reproductivo de los machos de *Drosophila melanogaster*, del lado derecho se muestran los dos testículos maduros de un macho, marcados para el RNA del gen stanley-cup. Las células germinales se encuentran en la parte anterior del testículo, el crecimiento y maduración se lleva a cabo a lo largo del testículo, el nivel más alto de tinción se observa en las puntas distales de los haces de espermátidas (flecha). Modificado de Sullivan *et al.*, 2000 y White-Cooper, 2009.

Las células germinales masculinas, para formar gametos funcionales (espermatozoides) requieren de una serie de divisiones sucesivas y transformaciones morfológicas, este proceso consta de dos procesos: la espermatogénesis y la espermiogénesis. La primera incluye a la meiosis, división celular en la que se reduce el nivel de ploidía y se producen células haploides (White-Cooper, 2009); en cambio, la espermiogénesis se refiere a las transformaciones morfológicas que adquieren las células haploides

(espermátidas) para diferenciarse en espermatozoides (Lindsley y Tokuyasu, 1980; Demarco *et al.*, 2014).

La espermatogénesis inicia cuando una de las células madre de la línea germinal que se sitúan en el extremo apical de los testículos se divide asimétricamente para formar dos células hijas (Fig. 1.4), una de esas células generalmente se auto renueva manteniendo la identidad de célula madre mientras que la otra inicia su diferenciación como espermatogonia (Fuller y Spradling, 2007; Giansanti *et al.*, 2012). Las células madre de la línea germinal se dividen en sincronía con las células progenitoras del quiste somático, cada espermatogonia está flanqueada por un par de células somáticas (Giansanti *et al.*, 2012).

La espermatogonia entra en cuatro rondas de división mitótica para producir un quiste con 16 células germinales interconectadas por puentes llamados canales anulares (Fig.1.4). Los quistes asumen una conformación en forma de disco y se alinean perpendicularmente a la pared del testículo (Giasanti y Fuller, 2012; Demarco *et al.*, 2014). En la luz de los testículos, estas células inician la fase S premeiótica y durante G₂ comienzan un proceso de maduración aumentando 25 veces su volumen, a estas 16 células maduras se les llama espermatocitos primarios (Spradling, 1993).

Estos espermatocitos primarios se sincronizarán para entrar a la meiosis y producir 32 espermatocitos secundarios, producto de la primera división meiótica, entrarán posterior y rápidamente a la segunda división de la meiosis para formar 64 espermátidas haploides todavía interconectadas por canales anulares (Orr-Weaver, 1995; White-Cooper,2009; Cabernard, 2012). Luego se llevará a cabo la espermiogénesis, proceso en el que las espermátidas se alargan, individualizan; y enrollan sus colas para generar espermatozoides móviles (Fig.1.4) (Lindsley y Tokuyasu, 1980).

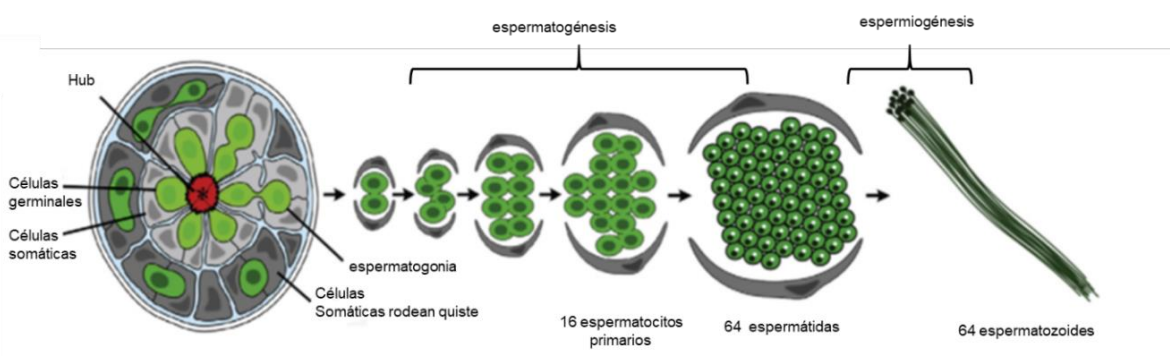


Fig. 1.4 Formación y maduración de las células germinales de *Drosophila melanogaster*. Modificado de Demarco *et al.*, 2014.

Durante la espermiogénesis, las espermátidas presentan una reorganización drástica de las mitocondrias, esta organización facilita la producción de la energía (adenosín trifosfato, ATP) requerida para la motilidad de los espermatozoides (Yamashita, 2018), al mismo tiempo que promueve la degradación del DNA mitocondrial (mt) por la actividad de la endonucleasa G. Por lo tanto, los espermatozoides maduros al no tener DNAm pierden la capacidad de transmitir el genoma mitocondrial a la próxima generación. (DeLuca y O'Farrell, 2012).

Otro proceso relacionado específicamente con la diferenciación de las células germinales masculinas es la reorganización de la cromatina, que consiste en la sustitución de las histonas por proteínas cromosómicas más básicas, generalmente protaminas (Hecht, 1986; Hecht, 1987; Jayaramaiah y Renkawitz-Pohl, 2005; Rathke *et al.*, 2014). La reorganización de la cromatina conduce a un empaquetado más estricto, que da como resultado una compactación del 30% en los espermatozoides maduros en comparación con un cromosoma metafásico mitótico (Hennig, 1986; Hennig y Kremer, 1991).

Los espermatozoides maduros, con un alto nivel de compactación del DNA nuclear y sin DNA mt, se transfieren a las hembras junto con el fluido seminal. El fluido seminal contiene más de 80 proteínas y péptidos, estos tienen sitios de acción dentro y fuera del tracto reproductivo femenino, y causan una gran variedad de respuestas en las hembras (Chapman y Davis, 2004). Los componentes del fluido seminal participan en la receptividad de las hembras, en el almacenamiento y recuperación del esperma, en la producción, ovulación y ovoposición de huevos. También contienen sustancias con actividad antibacteriana y antifúngica y enzimas como las proteasa y lipasas (Markow, 2015).

1.4. Formación y maduración de las células germinales de la línea materna.

El momento de la determinación sexual de las células germinales de las hembras es desconocida, no obstante, la proteína sex-lethal (Sx) ha sido detectada en células germinales XX embrionarias tempranas, aunque las isoformas específicas de ovogénesis parecen afectar hasta la formación de la cámara de huevos (Bopp *et al.*, 1993). A diferencia de los machos, se ha demostrado que las células germinales con un contenido cromosómico XX requieren señales inductivas del tejido somático para diferenciarse hacia la línea femenina (Steinmann *et al.*, 1989).

Las gónadas femeninas larvales están formadas por pequeñas células somáticas, localizadas en los polos anterior y posterior (Brower *et al.*, 1981) y células germinales grandes, que se encuentran en la región central de la gónada (Lasko y Ashburner, 1990). Las células de la línea germinal dentro de la gónada comienzan una segunda ronda de divisiones aproximadamente en el momento en que la larva

eclosiona del huevo (Sonnenblick, 1950), este primordio inicialmente pequeño crece lentamente y 36 horas después de la pupación se observan ovocitos y células nodrizas (King, 1970; Wieschaus y Szabad, 1979). Durante el desarrollo de las larvas, las células germinales y las células somáticas de las gónadas se reorganizan en ovariolas individuales, es decir, las unidades funcionales del ovario (De Cuevas, 2015).

En la etapa del tercer estadio larvario comienza la diferenciación del ovario, las células somáticas gonadales del polo anterior se dividen en 16-20 grupos, durante la metamorfosis, estas células darán origen a las células del filamento terminal de cada ovariola (King, 1970; Ogienko *et al.*, 2007). Los oviductos, las glándulas accesorias, el útero, la vagina y los genitales externos del adulto hembra se originan de las células del disco imagal genital (Ogienko *et al.*, 2007). Las hembras adultas de *Drosophila* tienen dos ovarios conectados a un oviducto que desemboca en el útero (Fig. 1.5), cada ovario está formado de 16-20 ovariolas (Spradling, 1993).

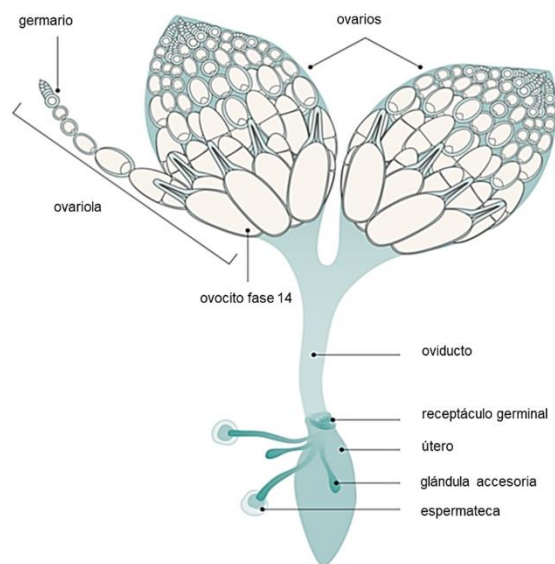


Fig. 1.5 Estructura morfológica de los ovarios de *Drosophila melanogaster*. Modificado de Hughes *et al*, 2018.

Las ovariolas son las unidades funcionales de la producción de huevos, están formadas por un filamento terminal, un germario y una cadena de seis a siete cámaras de huevos ordenadas en forma secuencial dependiendo del grado de maduración y conectadas entre sí, como se muestra en la figura 1.6 (Williamson y Lehiman, 1996; Roth y Lynch, 2009). El germario se encuentra en la parte anterior de cada ovariola y contiene las células madre de la línea germinal y de la línea somática, las cuales están en contacto con el filamento terminal, de la misma manera, el germario es el sitio donde se origina el ovocito (Bastock y St Johnston 2008; Gates, 2012).

La ovogénesis es un proceso más sofisticado que la espermatogénesis de los machos ya que involucra la coordinación de las células de la línea germinal y somática para la obtención de un óvulo maduro (Ogjenko *et al.*, 2007) en este proceso interviene la activación de muchos genes, el control del ciclo celular, la polarización celular y la morfogénesis epitelial (Ogjenko *et al.*, 2007; Bastock y Johnston, 2008). Este proceso puede dividirse en dos fases: la previtelogénica, y la vitelogénica, la primera corresponde a la determinación del ovocito primario y se lleva a cabo en el germario, mientras que la segunda atañe al proceso de maduración del ovocito (Wieschausy Szabad, 1979).

El germario se divide en cuatro regiones funcionales establecidas con base en la morfología del quiste: 1, 2A, 2B y 3 (Fig.1. 6) (Decotto y Spradling, 2005). En la región 1 se encuentran dos o tres células madre de la línea germinal; la región 2A contiene quistes recién formados de 16 células; la región 2B

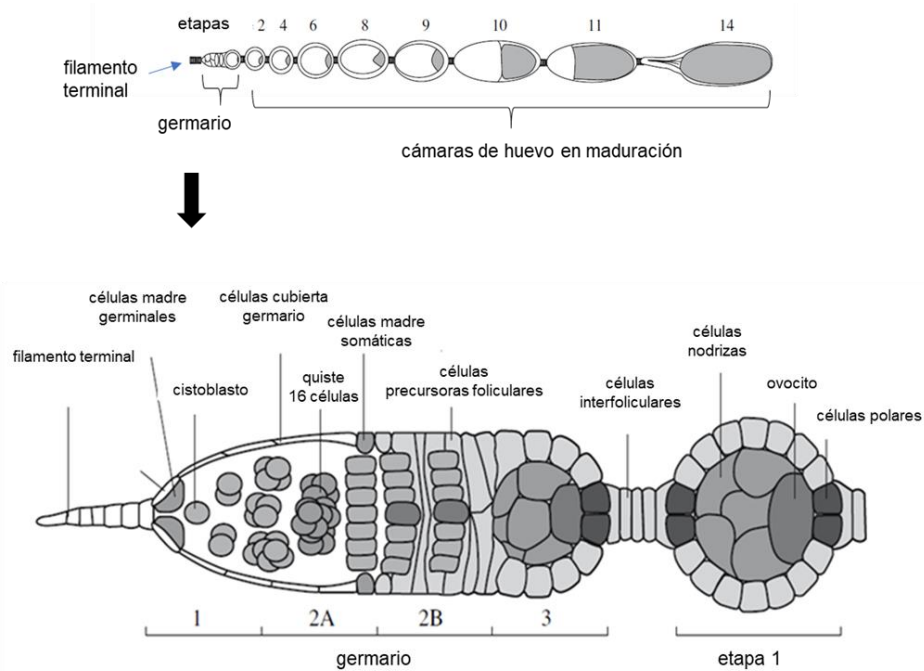


Fig. 1.6 En la parte superior se muestra la estructura general de las ovarias: filamentos terminales, germario y cámaras de huevos secuenciales. En la parte inferior se muestra una ampliación del germario y sus subdivisiones. Modificado de Ogjenko *et al.*, 2007.

contiene quistes con forma más ovalada; finalmente, la región 3 contiene un quiste redondo rodeado por una capa de células foliculares (De Cuevas, 2015; Roth y Lynch, 2009). En la región 1 las células madre germinales se dividen asimétricamente, para producir una célula madre y una célula hija, llamada cistoblasto, que se diferenciará en ovogonia (Fig. 1.7) (Spradling, 1993; Page y Orr-Weaver, 1997; Ogjenko *et al.*, 2007).

Esta célula diferenciada se divide cuatro veces por mitosis con citocinesis incompleta para formar un quiste con 16 células interconectadas por canales anulares (Fig. 1.7) (Page y Orr- Weaver, 1997; Heifetz *et al.*, 2001; Ogienko *et al.*, 2007; Bastock y Johnston, 2008). Estas cuatro divisiones ocurren aproximadamente en 24 horas; durante este proceso, las células no duplican su tamaño antes de cada división, por lo que los cistocitos (aproximadamente miden $50 \mu\text{m}^3$) son más pequeños que un cistoblasto (aproximadamente miden $200 \mu\text{m}^3$) (de Cuevas, 2015).

Después la última ronda de división, 15 de estos cistocitos se desarrollarán como células nodrizas poliploides mientras que la otra célula formará un ovocito (Spradling, 1993; Page y Orr- Weaver, 1997; Ogienko *et al.*, 2007; Bastock y Johnston, 2008). Posteriormente, los quistes se rodean de aproximadamente 16 células foliculares, derivadas de las dos células madre somáticas ubicadas en la región 2A y 2B del germario (Margolis y Spradling, 1995). Los quistes germinales se desplazan a lo largo de la ovariola, conforme las células madre germinales se continúan dividiendo (Williamson y Lehman, 1996; Roth y Lynch, 2014).

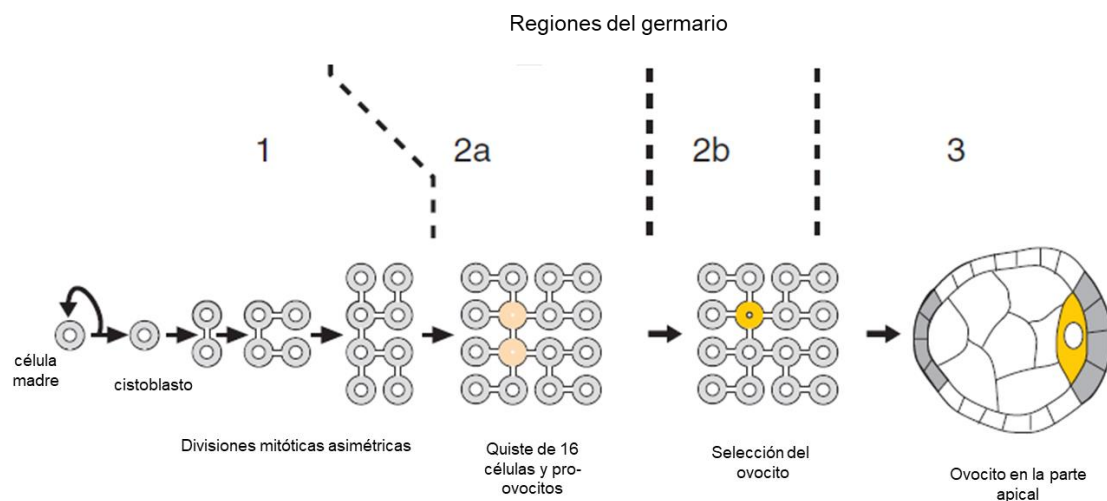


Fig. 1.7 Etapa previtelogénica de la ovogénesis de *Drosophila melanogaster*. Modificado de Huynh y Johnston, 2004.

Conforme el quiste se mueve a través de la región 2, el ovocito se mueve hacia la parte apical; este reposicionamiento está mediado por moléculas de adhesión celular entre el ovocito y las células foliculares posteriores. Por lo tanto, en la región 3 del germario, el ovocito puede ser identificado porque se encuentra invariablemente en el extremo posterior del quiste (Fig. 1.7) (De Cuevas, 2015). Después de pasar por la tercera región, el quiste sale del germario, para iniciar la etapa vitelogénica que usualmente se divide en 14 fases de acuerdo con las características morfológicas de la cámara de huevos (Wieschausy Szabad, 1979; Bastock y Johnston, 2008; Gates, 2012).

Durante las diferentes fases de la etapa vitelogénica, el volumen del ovocito incrementa cuatro órdenes de magnitud, esto se debe principalmente a la acción de las células nodrizas, las cuales producen muchas macromoléculas y organelos que son transportados de las células nodrizas al ovocito a través de los canales anulares (Mahajan-Miklos y Cooley, 2009; Roth y Lynch, 2009). El transporte consta de dos fases: lenta y rápida; la primera se lleva a cabo antes de la fase 10 y consiste en la absorción de proteínas y hemolinfa; por su parte, la fase rápida comienza a partir de la fase 11, cuando las células nodrizas vierten su contenido citoplasmático permitiendo que el ovocito alcance su volumen final (Gates, 2012).

En la etapa 14, el ovocito maduro está listo para la fertilización. El tiempo que tarda una célula madre germinal para convertirse en un ovocito maduro es aproximadamente diez días, de manera que la etapa previtelogénica tiene una duración aproximada de siete días (Wieschaus y Szabad, 1979); de los cuales, se requerirán tres días para que el cistoblasto se convierta en un quiste de 16 células (Spradling, 1993). Las 14 fases vitelogénicas son aparentemente muy rápidas y requieren un tercio del tiempo total requerido, es decir, la maduración del ovocito dura cerca de tres días (Wieschaus y Szabad, 1979).

1.4.1 Determinación del ovocito y meiosis

La formación de los gametos en hembras y machos de *Drosophila* comienza en la parte apical de las gónadas. En ambos casos, como se muestra en la figura 1.8, los gametos son producidos por grupos de células madre germinales que comparten citoplasma a través de puentes citoplásmicos originados de una serie de divisiones mitóticas incompletas (Decotto y Spradling, 2005; Huynh, 2006). La conformación y el comportamiento de los fusomas, estructuras membranosas ramificadas del citoplasma que vincula todas las células del quiste, así como de los canales de comunicación son altamente similares en ambos sexos (De cuevas y Spradling, 1998).

Los gametos masculinos retienen estos puentes intercelulares durante la mayor parte de la diferenciación y son importantes para la sincronización de las divisiones celulares, así como para compartir productos genéticos después de la finalización de la meiosis. En las hembras, los puentes intercelulares forman estructuras estables llamadas canales anulares, los cuales, además de permitir la comunicación entre las células germinales tienen una función adicional pues permite la especialización de una célula del quiste en ovocito (Huynh, 2006).

En las hembras, de las 16 células producidas por las cuatro divisiones mitóticas continuas se obtienen: ocho células con un canal anular; cuatro células con dos canales; dos células con tres canales y dos

células con cuatro canales anulares, llamadas pro-ovocitos (Fig.1.9), de las cuales sólo una se diferenciará a ovocito (Spradling 1993; Roth y Lynch, 2009).

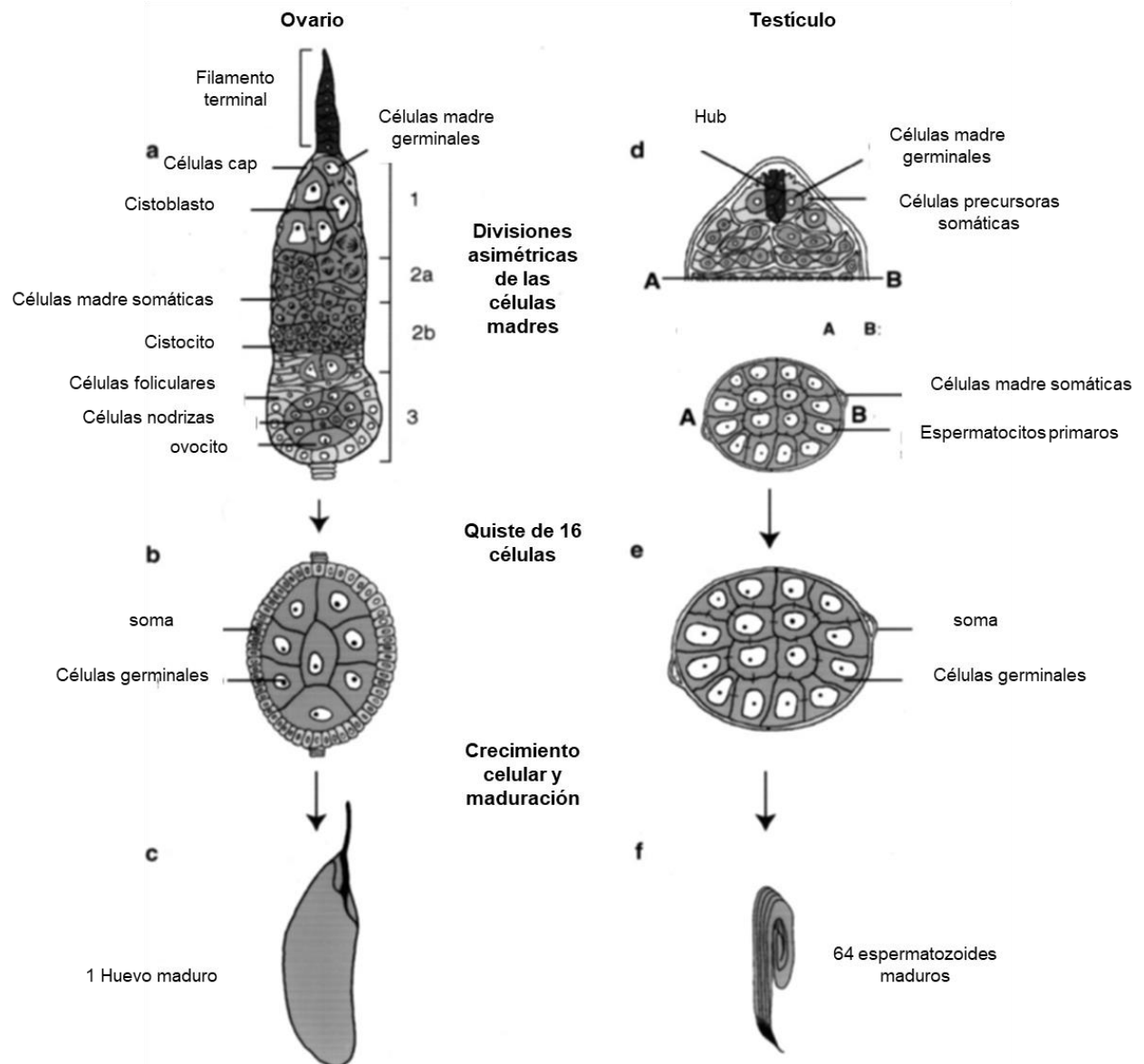


Fig. 1.8 Comparación de la formación y maduración de las células germinales de hembras y machos de *Drosophila melanogaster*. Modificado de Williamson y Lehmann, 1996.

En las hembras, de las 16 células producidas por las cuatro divisiones mitóticas continuas se obtienen: ocho células con un canal anular; cuatro células con dos canales; dos células con tres canales y dos células con cuatro canales anulares, llamadas pro-ovocitos (Fig.1.9), de las cuales sólo una se diferenciará a ovocito (Spradling 1993; Roth y Lynch, 2009). Existen dos modelos para explicar el mecanismo de selección de uno de los dos pro-ovocitos; uno se basa en la competencia entre los dos

pro-ovocitos, la célula ganadora se convierte en el ovocito y la célula perdedora en una célula nodriza; en el otro modelo se propone que la selección del ovocito ocurre por el establecimiento de algunas asimetrías del fusoma en las primeras divisiones del cistoblasto (Huynh, 2006).

Ahora bien, durante la primera división, un tercio del espectrosoma, que es un organelo membranoso específico de la línea germinal con una morfología esférica, es heredado por el cistoblasto para dar lugar al fusoma (Yamashita, 2018). En las siguientes divisiones el fusoma se adhiere a uno de los polos del huso mitótico, esto genera que sólo una de las células hijas reciba el fusoma (Fig. 1.9). Sin embargo, durante la interfase, en cada canal anular se sintetiza nuevo fusoma, el cual se fusiona con el viejo mediante el movimiento de los canales anulares. Esto produce una direccional en el crecimiento y en la ramificación del fusoma, que a su vez ocasiona una polaridad en el quiste (Fig.1.9), las dos células con mayor cantidad de fusoma que darán en la parte anterior y se especificarán en pro-ovocitos (Huynh,2006; Roth y Lynch, 2009).

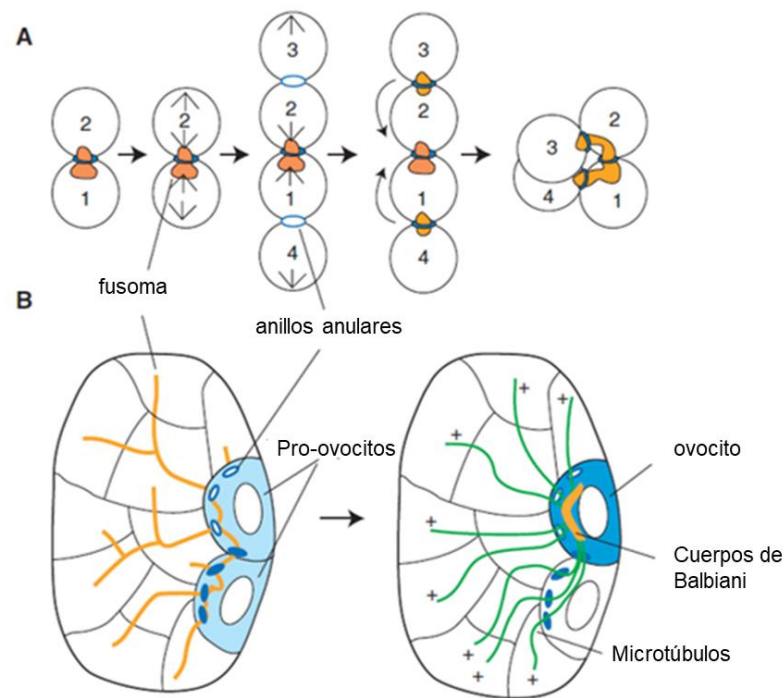


Fig. 1.9. A. Formación del fusoma durante el desarrollo del quiste en las hembras de *Drosophila melanogaster*. B Determinación del ovocito en *Drosophila melanogaster*. Modificado de Roth y Lynch,2009.

Las 16 células del quiste comienzan la profase de la meiosis I, pero sólo las células con tres y cuatro canales forman el complejo sinaptonémico, el cual es visible en la región 2A del germario (Carpenter, 1975); tres de las cuatro células que inicialmente forman el complejo sinaptonémico lo desensamblan y un solo pro-ovocito lo mantiene hasta la fase 8 de la cámara de huevo (Spradling, 1993). El ovocito

seleccionado continuará con la maduración mientras que los otros 15 cistocitos saldrán de la división meiótica para comenzar con los ciclos endomitóticos característicos de las células nodrizas (Spradling 1993; Roth y Lynch, 2014; Huges, *et al.*, 2018).

Después de la designación del ovocito, en la región tres del germario, el núcleo se reorganiza para formar una estructura llamada cariosoma (Ogienko *et al.*, 2007; Huges, *et al.*, 2018). La meiosis es arrestada de manera transitoria en Profase I hasta la fase 10 de desarrollo de la cámara de huevo donde continúa hasta la Metafase I en la que el ovocito puede permanecer arrestado hasta dos días (King, 1970; Ogienko *et al.*, 2007). El paso de los ovocitos a través del oviducto conduce a la activación del ovocito y a la reanudación de la meiosis (Page y Orr-Weaver, 1997; Heifetz *et al.*, 2001); después de la activación, la anafase I y la meiosis II se completan en aproximadamente 20 minutos (Riparbelli y Callaini 1996).

El resultado final de la meiosis es una célula haploide con material genético distinto al de las células que le dieron origen. La meiosis se puede simplificar en tres pasos claves: el apareamiento de los cromosomas homólogos, la sinapsis entre ellos y su segregación de manera correcta; estos pasos, que ocurren en las primeras etapas de la meiosis (Gerton y Hawley 2005), junto con los entrecruzamientos cromosómicos, son eventos considerados muy importantes durante la formación de los gametos, de ahí que hayan sido utilizados en estudios genéticos como la herramienta principal para evaluar la fidelidad de la meiosis, medida directamente en los cambios de la frecuencia de recombinación (Gerton y Hawley 2005).

1.4.2 Componentes citoplasmáticos del ovocito

Una vez que se determina la célula que será el ovocito, este incrementa su volumen al recolectar materiales celulares suministrados desde las células nodrizas utilizando la red polarizada de microtúbulos que atraviesa toda la cámara del huevo (Yamashita, 2018). Las células nodrizas sintetizan muchos de los materiales necesarios para que el ovocito progrese a través de la ovogénesis y la embriogénesis temprana (King y Burnett, 1959). Al final de la ovogénesis, el ovocito maduro contiene en su citoplasma un rico depósito de ARNm, proteínas, mitocondrias, ribosomas y otros organelos celulares (Dworkin y Dworkin-Rastl, 1990; Yamashita, 2018).

En particular, los ARNm: oskar (*osk*), gurken (*grk*), bicoid (*bcd*) y nanos (*nos*) y su distribución espacio temporal en las diferentes etapas de maduración del ovocito (Fig. 1.10), juegan un papel crítico en el inicio del desarrollo embrionario, específicamente, en la determinación de los ejes del cuerpo anterior-posterior y dorsal-ventral del nuevo individuo (Dworkin y Dworkin-Rastl, 1990; Yamashita, 2018).

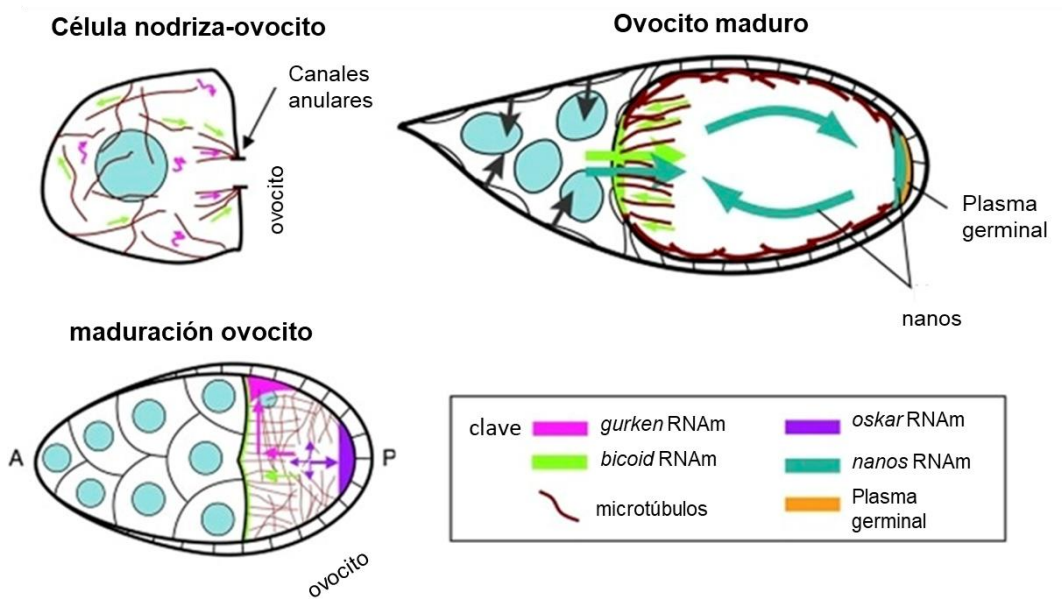


Fig. 1.10. Localización y transporte de RNAm durante la maduración del ovocito de *Drosophila melanogaster*. Modificado de Yamashita, 2018.

En el citoplasma del ovocito también se acumulan mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, ribosomas y centrosomas. En *D. melanogaster*, las mitocondrias, responsables de la producción de ATP, y los otros organelos son heredadas exclusivamente por vía materna (Greiner *et al.*, 2014; Yamashita, 2018). Al inicio de la ovogénesis, estos se asocian al fusoma y una vez determinado el ovocito, se agregan y forman el cuerpo de Balbiani, como se muestra en la figura 1.11, en las siguientes etapas de maduración, las mitocondrias restantes de las células nodrizas pasan al ovocito (Yamashita, 2018)

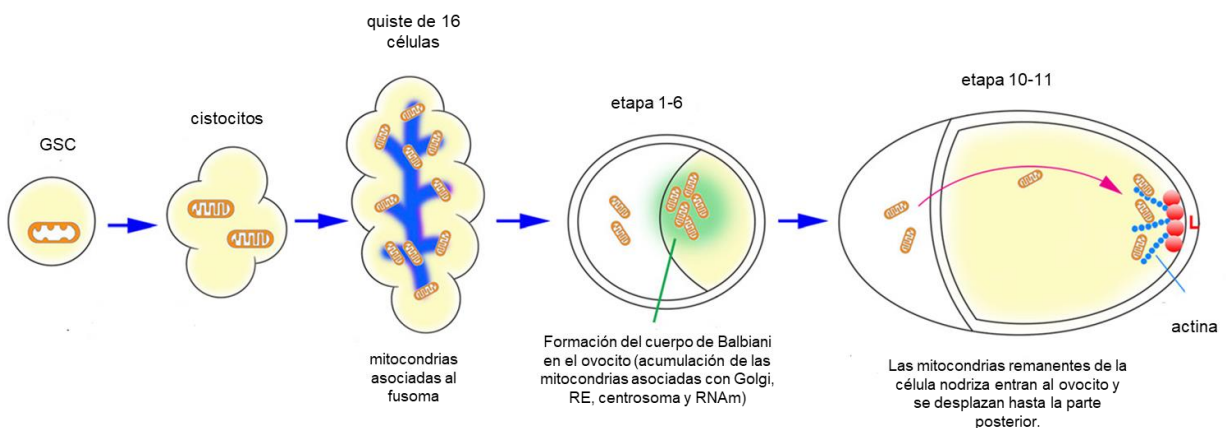


Fig. 1.11. Comportamiento de las mitocondrias y otros organelos durante la formación y maduración de los ovocitos. Modificado de Yamashita, 2018.

1.5 ¿Cómo evaluar el daño en células germinales de *Drosophila melanogaster*?

1.5.1 Capacidad reproductiva: una herramienta adicional para evaluar genotoxicidad en células germinales

Los estudios de toxicidad reproductiva son una importante fuente de información relacionada con la genotoxicidad en las células germinales, dado que proporcionan una gran cantidad de evidencia indirecta de daño en las células germinales masculinas, femeninas y tejidos gonadales, así como sobre los efectos citotóxicos que pueden ocurrir después de la exposición a genotóxicos (Yaulk *et al.*, 2015a).

La manifestación de tal toxicidad puede incluir, aunque no se limita a, efectos adversos que van desde la muerte prematura de los organismos; problemas en la madurez sexual; las alteraciones en la producción y maduración de los gametos, las irregularidades del ciclo reproductivo; variaciones en el comportamiento sexual, afectaciones en la capacidad de apareamiento; fertilidad; fecundidad; viabilidad de las crías; toxicidad del desarrollo; reproducción prematura; senescencia; en otras (EPA, 1996).

Drosophila melanogaster es un sistema de prueba que permite detectar reacciones adversas inducidas químicamente en las células germinales y en los órganos reproductores (Gupta *et al.*, 2007; Avanesian, 2009) y más importante aún, permite evaluar el desempeño reproductivo, tanto a nivel de selección de pareja y frecuencia de apareamientos (Trujillo, 2015) como si los gametos dañados son capaces de formar nuevos individuos, la cantidad y el estado de éstos, a través de marcadores de daño reprotóxico como la fertilidad y la fecundidad (Wakimoto, 2004; Meza, 2015).

De acuerdo con la guía para evaluar efectos reproductivos de la EPA (1996), la fertilidad es la capacidad de concebir hijos viables mientras que la fecundidad es la capacidad de producir descendencia dentro de un período de tiempo determinado, de igual forma, para las especies que producen grandes camadas, se especifica que el tamaño de la camada es un componente de la fecundidad. Por lo tanto, en *D. melanogaster*, la fertilidad representa la capacidad de tener hijos y la fecundidad es una medida de la cantidad de progenie que tienen las parejas fértiles.

De manera tradicional, la metodología para medir estos marcadores es cruzando o apareando organismos sexualmente maduros (generación progenitora) con la finalidad de obtener la siguiente generación F₁; de esta manera, es a partir de la ausencia o presencia de progenie y de la cantidad de hijos recobrados que se extrae información relacionada con la fertilidad y la fecundidad de los organismos progenitores (Gulati *et al.*, 1991); incluso, algunos estudios se extienden hasta la segunda

generación evaluando la fertilidad y fecundidad de los organismos no expuestos de la primera generación (OECD, 2001).

1.5.2. Frecuencia de recombinación, una alternativa para medir el daño potencial en células germinales

Uno de los procesos celulares más importantes que ocurre durante la formación de los gametos, es la recombinación meiótica, ésta consiste en el intercambio de un segmento de un cromosoma homólogo con un segmento equivalente del otro cromosoma homólogo. Durante este proceso, los genes que se encuentran en estos segmentos son combinados generando gametos con nuevos arreglos genéticos evidentes en la descendencia. (Morgan, 1915; Morgan, 1919; Morgan *et al.*, 1922).

Por tal razón, la recombinación homóloga en las células germinales es considerada como un proceso genético crucial, así como una fuerza evolutiva fundamental. Sin embargo, como otros procesos celulares, puede alterarse por factores internos o modificarse en respuesta a condiciones ambientales (Hunter y Sing, 2014) como la edad (Bridges, 1915; Bridges, 1927), la temperatura (Plough, 1917; Plough, 1921; Stern, 1926), la exposición a rayos X (Mavor, 1923; Mavor y Svenson, 1924; Müller, 1925), o bien, a los rayos gamma (Whittinghill, 1951) y a genotóxicos (Würgler, 1991; Arroyo, 2014).

Estos últimos son agentes genotóxicos que pueden inducir recombinación (conversión de genes, recombinación recíproca entre homólogos, intercambios de cromátidas hermanas) en el material genético tanto en células somáticas como en células germinales; todos los mecanismos señalados implican rompimientos de doble cadena en el DNA y reunión de cromosomas (Vogel y Nivard, 1999). De esta manera, los compuestos capaces de inducir recombinación indican una actividad clastogénica con un alto potencial carcinogénico, debido a que todos los carcinógenos de referencia probados son poderosos inductores de la recombinación (Vogel, 1989).

La mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, fue uno de los primeros sistemas de ensayo para evaluar agentes físicos y químicos con efectos recombinogénicos, tales efectos son observables tanto en las células somáticas como en las células de la línea germinal (Würgler, 1991). En el caso de la recombinación germinal en *D. melanogaster*, las células de las hembras son las únicas que presentan este proceso ya que en las células de los machos la recombinación se encuentra ausente (Cooper, 1949; Cooper, 1950). La metodología tradicional para estimar intercambios cromosómicos en las células germinales *in vivo* es mediante el sistema de cruce utilizado para mapeo genético por Sturtevant en 1913.

Esta metodología consiste en seguir los eventos de intercambio cromosómico de hembras heterocigóticas para dos genes con marcadores morfológicos visibles. Para ello primero se realiza una cruce entre líneas puras con la finalidad de obtener las hembras heterocigóticas; posteriormente, éstas se deberán cruzar con machos hemicigotos (si los genes están ligados al X) para la expresión de los marcadores morfológicos seleccionados. La descendencia recobrada se clasifica y cuenta por fenotipo, de tal forma que los fenotipos parentales, indicarán que no hubo intercambio cromosómico, mientras que los fenotipos recombinantes indican que hubo eventos de intercambio entre los genes (Würgler, 1991).

La proporción de recombinantes en la descendencia total de la progenie es una medida indirecta del número de entrecruzamientos que ocurrieron durante la formación de los gametos; así el porcentaje de recombinantes genéticos observables se convierte directamente en el porcentaje de entrecruzamiento durante la formación de los gametos (Sturtevant, 1913). En última instancia, determinar si un genotóxico modifica este proceso, implicará obtener el porcentaje de recombinantes tanto para el grupo expuesto, así como para un grupo de control sin exposición al compuesto de prueba (Levine y Levine, 1955; Chinnici, 1974).

II. ANTECEDENTES

La recombinación en las células germinales ha sido una de las herramientas más utilizadas para estimar los cambios en el material genético que ocurren durante el proceso de formación de las gametas. Para el caso, de *D. melanogaster*, la mayoría de los estudios se han enfocado en la inducción de este proceso en la línea germinal masculina, pues, aunque de manera regular no ocurre en los machos, la exposición a algunos agentes genotóxicos como promutágenos, alquilantes, intercalantes, quelantes y agentes que rompen DNA inducen el proceso de recombinación inducida en las células germinales masculinas, por lo que resulta una metodología eficiente para evaluar actividad recombinogénica (Würgler, 1991).

En el caso de las hembras se han realizado pocos estudios que miden el efecto de los genotóxicos en la recombinación germinal, la mayoría se han centrado en la exposición de hembras heterocigotas adultas. En dos de estos estudios se encontró que la radiación con rayos X redujo la frecuencia de recombinación entre genes del cromosoma tres (Whittinghill, 1951) y del cromosoma X (Valentin, 1973); se tiene referencia que la exposición a EMS (Etil metano sulfonato) disminuye la frecuencia de recombinación entre genes del cromosoma X (Valentin, 1973); y que el tratamiento con mitomicina C incrementa la frecuencia de recombinación entre los genes del cromosoma tres (Susuki, 1964).

Para el caso de la exposición a aflatoxina B, no existe aún evidencia de que la frecuencia de recombinación entre genes del cromosoma X se modifique, pero se sabe que afecta la fertilidad y la progenie promedio de las hembras adultas expuestas (Chinnici, 1976). Por su parte, la inyección de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) a hembras en estadio larvario, específicamente antes de la pupación, modificó la frecuencia de recombinación entre los genes *w*, *m* y *f*, del cromosoma X (Kaufmann *et al.*, 1957). Tales resultados muestran que la respuesta a la exposición directa a hembras adultas es más compleja y no es tan contundente como en los machos, ya que en algunos casos ésta no se altera y cuando se modifica puede incrementar o disminuir.

Recientemente, se ha utilizado a *D. melanogaster* para evaluar el efecto *in vivo* de genotóxicos en la recombinación en las células germinales y se ha encontrado que la frecuencia de recombinación obtenida en los descendientes (F_2) de la progenie de machos expuestos al mutágeno azida de sodio es alterada, modificando el tipo y proporción de los genotipos en sus descendientes (Arroyo, 2014).

En dicho trabajo se encontró que la frecuencia de recombinación entre los genes *white-miniature* se incrementó en todas las concentraciones de azida de sodio, por lo que el número de recombinantes en la F_2 aumentó. Este efecto también se presentó en algunas concentraciones de azida de sodio al analizar las frecuencias de recombinación entre los genes *yellow-white* y *miniature-forked*. Estos resultados

sugieren la existencia de un mecanismo en el que las hembras F_1 no expuestas, responden a la exposición del macho parental.

En términos generales, se advierte que existe escasa información acerca de los efectos *in vivo* en la línea germinal materna en etapas tempranas, aunque hay evidencia de que hembras no expuestas a genotóxicos pueden responder al tratamiento del macho parental, de ahí que surja la necesidad de responder a interrogantes como:

- ¿La exposición a genotóxicos de células germinales tempranas de las hembras heterocigotas puede afectar su capacidad reproductora y modificar procesos como la recombinación germinal?
- ¿Las hembras heterocigotas no expuestas pueden afectar su capacidad reproductora y la recombinación germinal por la exposición temprana a genotóxicos de las células germinales de los machos que las fecundan?
- ¿Si hembras heterocigotas no expuestas a genotóxicos pueden responder al tratamiento del macho parental también pueden detectar el efecto si el tratamiento ocurre en las hembras parentales? ¿Estos cambios son similares a los efectos observados en la línea germinal paterna?
- ¿El impacto de la exposición directa de las células germinales de las hembras heterocigotas es similar al efecto que se observa en las hembras heterocigotas no expuestas pero cuyos parentales estuvieron expuestos?

2.1 Objetivos

Objetivo general

Evaluar y caracterizar el efecto *in vivo* del genotóxico metil metano sulfonato (MMS) en las células germinales tempranas de la línea femenina de *Drosophila melanogaster* a través de su capacidad reproductiva y de la frecuencia de recombinación entre los genes w-m estimada en sus descendientes.

Objetivos particulares

- ❖ Evaluar la fertilidad, cantidad de progenie y la frecuencia de recombinación germinal de las hembras F₁ heterocigotas en tres contextos ambientales:
 1. Las células germinales de las hembras se forman y maduran en presencia de MMS
 2. Las células germinales de las hembras no están expuestas a MMS, pero sí las células germinales de los machos que las fecundan.
 3. Las células germinales de hembras y machos están expuestas a MMS durante su formación y maduración.

- ❖ Establecer si la exposición a MMS de las células germinales de los progenitores alteran la capacidad reproductiva de la generación F₁ no expuesta de manera directa y la frecuencia de recombinación germinal de las hembras F₁ heterocigotas estimada en su descendencia.

- ❖ Comparar los efectos del MMS en las células germinales femeninas con los efectos en la línea germinal paterna y determinar si existe una respuesta diferencial entre ambos sexos.

- ❖ Contrastar si el impacto de la exposición directa, durante la formación y maduración de las células germinales de las hembras F₁ heterocigotas es similar al efecto que se observa en células germinales de las hembras heterocigotas no expuestas pero cuyos parentales estuvieron expuestos.

2.2 Hipótesis

El efecto de los genotóxicos en la estirpe germinal temprana de las hembras heterocigotas F_1 estimado por la capacidad reproductora será diferente al efecto cuando los machos son los expuestos, debido a que las células germinales de la línea materna además de contribuir con la mitad del contenido genético de sus descendientes, al igual que los machos, tienen un aporte citoplasmático indispensable para el desarrollo del embrión. En el caso de la frecuencia de recombinación solo se modificará cuando las hembras son expuestas ya que este proceso ocurre antes de la fecundación además de que las células germinales de los machos expuestas no realizan este proceso de manera regular.

La capacidad reproductiva y la frecuencia de recombinación de las hembras heterocigotas F_1 no expuestas se modificará por la exposición de las hembras parentales y esta respuesta será similar a los efectos de la exposición de los machos parentales. El impacto en este caso será menor que cuando se exponen las células germinales de manera directa.

2.3. Justificación

Uno de los objetivos primordiales de cualquier ser vivo es dejar descendencia, en este proceso los organismos deben asegurar que sus descendientes reciban la información genética de la mayor calidad posible. En el caso de los organismos con reproducción sexual, las gametas son las células especializadas en transmitir la información genética de una generación a otra, por lo que durante su formación es indispensable mantener la integridad del material que será heredado a las siguientes generaciones (Lehmann, 2012).

No obstante, en la naturaleza los seres vivos están continuamente expuestos a diferentes condiciones ambientales, que pueden afectar el linaje de las células germinales comprometiendo la capacidad reproductiva de los organismos expuestos, así como la calidad del material genético que será transmitido a los nuevos individuos. De ahí que el estudio del efecto de los genotóxicos en las células germinales de organismos expuestos y su impacto en las siguientes generaciones haya despertado un gran interés en las últimas décadas (DeMarini, 2012).

Sin embargo, la mayoría de estos estudios, tanto en otros modelos biológicos como en *Drosophila melanogaster* se han centrado en el efecto de la línea germinal paterna en etapas postmeióticas (Hernando *et al.*, 2004) debido principalmente a dos razones: a) se dispone de más información acerca de la espermatogénesis que de la ovogénesis; y b) la manipulación de las células germinales masculinas es más sencilla ya que el acceso a diferentes etapas es facilitado por la diferenciación meiótica continua (Hernando *et al.*, 2004; Susiarjo *et al.*, 2009).

Dado lo anterior, existe poca información acerca del efecto de los genotóxicos en la capacidad reproductiva en la línea germinal materna, y la escasa información que encontramos se encuentra limitada a las células germinales femeninas tardías (no embrionarias), de ahí que sea importante la caracterización de la respuesta genotóxica en las células germinales de las hembras, pues además de contribuir con la mitad de la información genética, los óvulos son células de gran tamaño con proteínas, RNA y otros factores esenciales para el desarrollo del embrión y la formación del nuevo individuo (Dworkin *et al.*, 1990; Greiner, *et al.*, 2015; Despici *et al.*, 2017).

III. METODOLOGÍA GENERAL

3.1 Compuesto para el tratamiento: Metil metano sulfonato (MMS)

El MMS es un líquido incoloro soluble en agua y ligeramente soluble en solventes no polares (O'Neil, 2013) inicialmente fue utilizado como insecticida y agente quimioterapéutico, aunque actualmente ya no se produce comercialmente para dichos usos, sólo con fines de investigación (IARC, 1990). Es considerado un agente alquilante de acción directa, es decir, no necesita ser metabolizado para que añada grupos metilo al DNA en los sitios nucleofílicos de las bases nitrogenadas (Beranek, 1990; Wyatt y Pittman 2006). También es un alquilante monofuncional ya que de los dos grupos metilos que tiene solo dona uno a los nitrógenos u oxígenos de las bases nitrogenadas (Wyatt y Pittman 2006; Hryciw, *et al.*, 2002).

El MMS (Fig. 3.1) actúa principalmente metilando el N⁷ de la guanina y N³ de la adenina aunque también puede afectar al O⁶ de la guanina y el O⁴ de la timina estos dos últimos causan desapareamiento de las bases, mientras que la metilación de la adenina inhibe la replicación del DNA; ambos mecanismos se considera que son la causa de los rompimientos de la doble cadena (Hryciw, *et al.*, 2002). En *Drosophila melanogaster* induce inversiones cromosómicas (Parkash y Miglani, 1976), pérdida parcial de cromosomas sexuales (Valencia *et al.*, 1985), mutaciones letales recesivas ligadas al sexo (Vogel y Nivard, 1997) y mutación y recombinación somática (Vogel y Zijlstra, 1987).

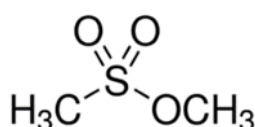


Fig. 3.1 Estructura química del metilmetano sulfonato.

3.2 Marcadores fenotípicos

Para valorar si la exposición a MMS altera el tipo y proporción de los gametos a través de la frecuencia de recombinación, es indispensables utilizar marcadores morfológicos que permitan identificar y cuantificar organismos con diferentes fenotipos. Para ello se utilizaron dos cepas de *Drosophila melanogaster*: la cepa silvestre (Canton-S) y la cepa mutante *wm* formada por dos marcadores morfológicos, uno para el color de los ojos y otro para el tamaño de las alas.

Los marcadores fenotípicos que componen a la cepa mutante *wm* se encuentran localizados en el cromosoma X (Fig.3.2) y presentan un patrón de herencia recesiva.

- *w* (*white*), las moscas con este marcador presentan los ojos blancos (Lindsley y Zimm, 1992), este gen se encuentra localizado a 1.5 unidades de mapa (um) (Mickey, 1963, Farmer, 1974; Lindsley y Zimm, 1992) entre la secuencia de bases 2,790,599 y 2,796,466 (Fly base).
- *m* (*miniature*), provoca que las moscas con este fenotipo tengan alas reducidas, de color gris oscuro y opacas (Lindsley y Zimm, 1992). El gen se encuentra a 36.1 um (Kaufman, 1969; Lindsley y Zimm, 1992), entre el par de bases 11,754,273 y 11,769,508 (Fly base).

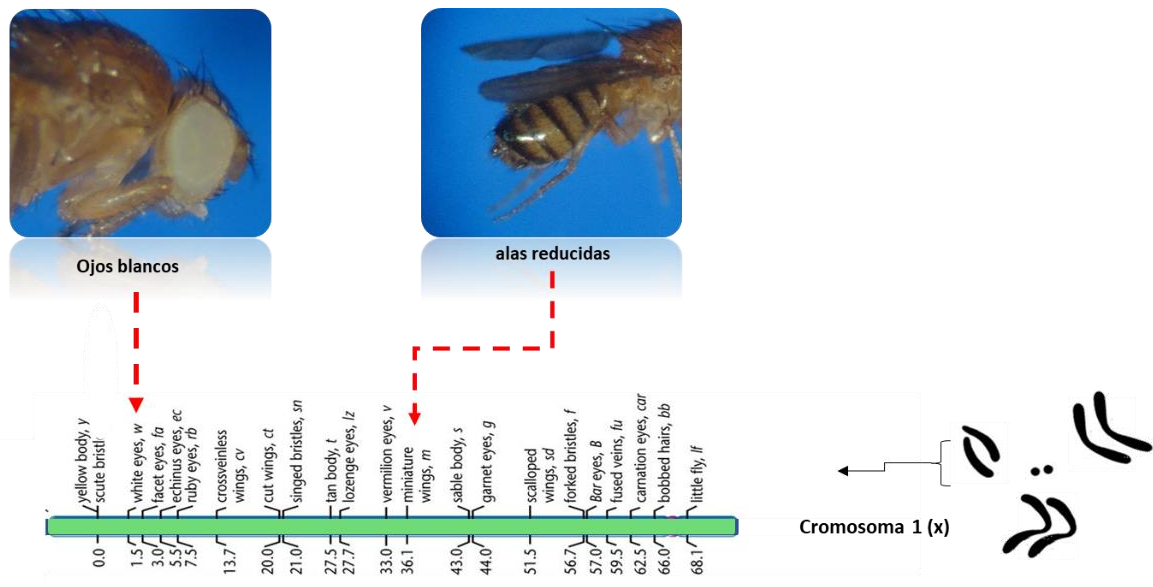


Fig. 3.2 Localización de los marcadores que forman la cepa *wm*. Modificado de Morgan, 1915 y Pierce, 2014. Fotografías Hugo Rivas Martínez.

3.3 Sistema de cruce

Con la finalidad de evaluar *in vivo* el efecto del MMS en la capacidad reproductiva de los organismos expuestos así como en la modificación del tipo y proporción de los gametos a través de la frecuencia de recombinación germinal de la línea femenina, se utilizó un sistema de cruce modificado al tradicional de mapeo genético para dos genes ligados al cromosoma X propuesto por Sturtevant (1913), que consiste en hacer una cruce progenitora, con individuos de las cepas puras, para obtener en la progenie F₁ hembras heterocigotas para los dos genes y machos hemicigotos, los cuales son cruzados entre sí para producir la progenie F₂.

A partir de las líneas puras w^+m^+ y wm se realizó la cruce progenitora: ♀♀ w^+m^+ / w^+m^+ X ♂♂ wm / Y para obtener la progenie F₁, formada por hembras dihíbridas w^+m^+ / wm y machos hemicigotos w^+m^+ / Y ,

la progenie se cruzó entre sí para generar la F_2 . En la progenie F_2 se obtuvieron hembras fenotípicamente silvestres (ojos rojos y alas largas) y machos con cuatro fenotipos: ojos rojos y alas largas, ojos blancos y alas pequeñas, ojos rojos y alas cortas, ojos blancos y alas largas, los dos últimos resultados de un intercambio cromosómico durante la formación de las gametas de la hembra F_1 (Fig. 3.3).

La cuantificación de la progenie F_2 por categoría fenotípica permite estimar la frecuencia de recombinación que es una medida indirecta del número de intercambios cromosómicos en las gametas producidos por las hembras F_1 .

3.4 Protocolos

En este trabajo se realizaron dos protocolos: el primero evalúa la exposición directa de las células germinales al MMS a través de biomarcadores de la capacidad reproductiva y la frecuencia de recombinación germinal de las hembras F_1 heterocigotas cuando:

1. Las células germinales de las hembras se forman y maduran en presencia de MMS (T x NT).
2. Las células germinales de las hembras no están expuestas a MMS, pero si las células germinales de los machos que las fecundan (NT x T).
3. Las células germinales de hembras y machos están expuestas a MMS durante su formación y maduración (T x T).

En el segundo protocolo se evalúa la capacidad reproductiva y la frecuencia de recombinación germinal de la exposición indirecta de hembras y machos F_1 , es decir, cuando las células germinales de las moscas F_1 no maduran en presencia del compuesto, pero sí las células germinales de sus progenitores (hembras o machos).

En la figura 3.4 se comparan los dos protocolos, en el primer protocolo el tratamiento se administró a las moscas F_1 para caracterizar el efecto en la generación inmediata (F_2). En el segundo protocolo, el tratamiento se dio a los progenitores de la F_1 a fin de determinar si la exposición de éstos altera la formación y maduración de las células germinales de las hembras F_1 no expuestas.

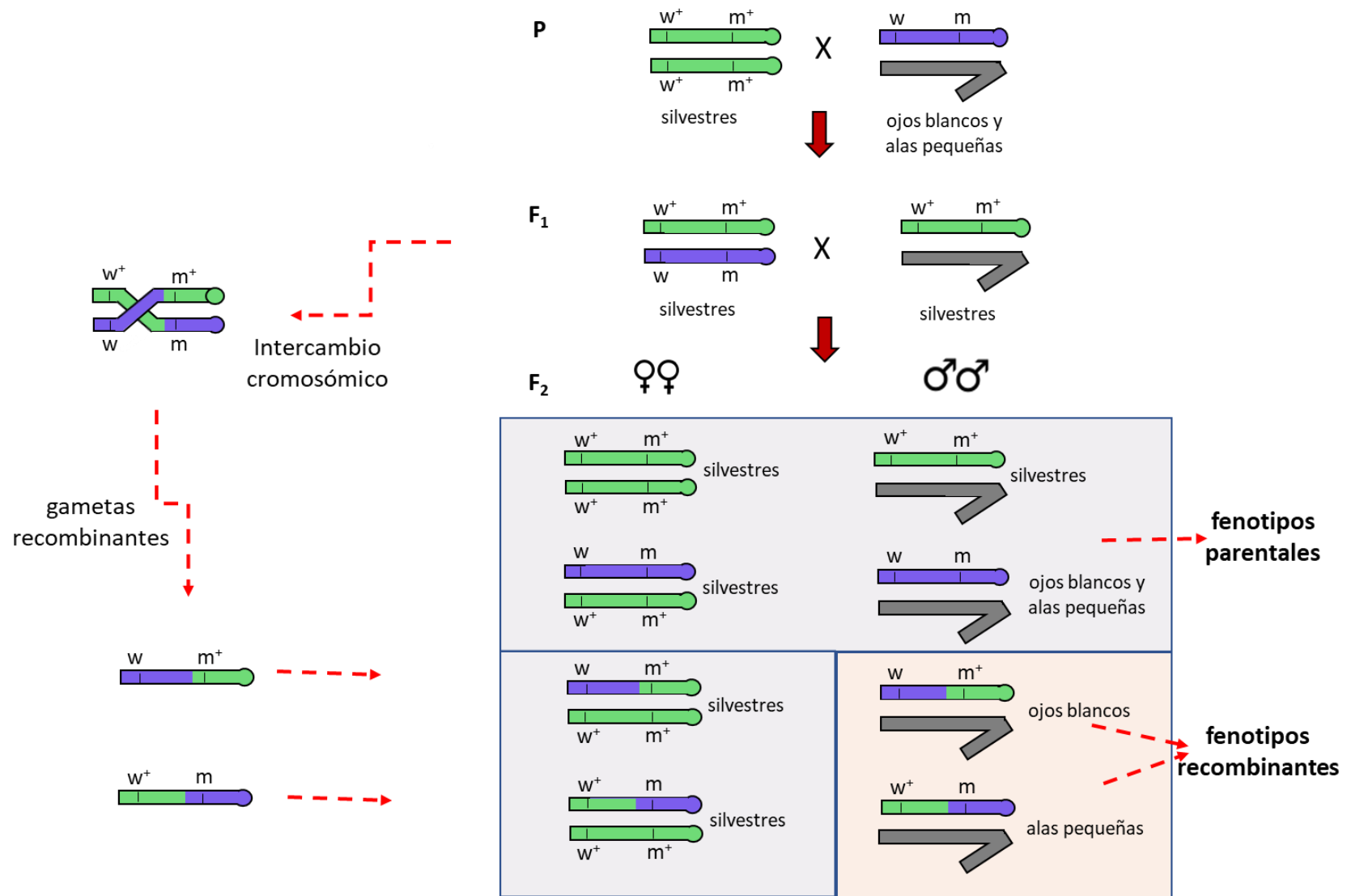


Fig. 3.3 Sistema de cruce progenitor (P) para mapeo de dos genes ligados al cromosoma X

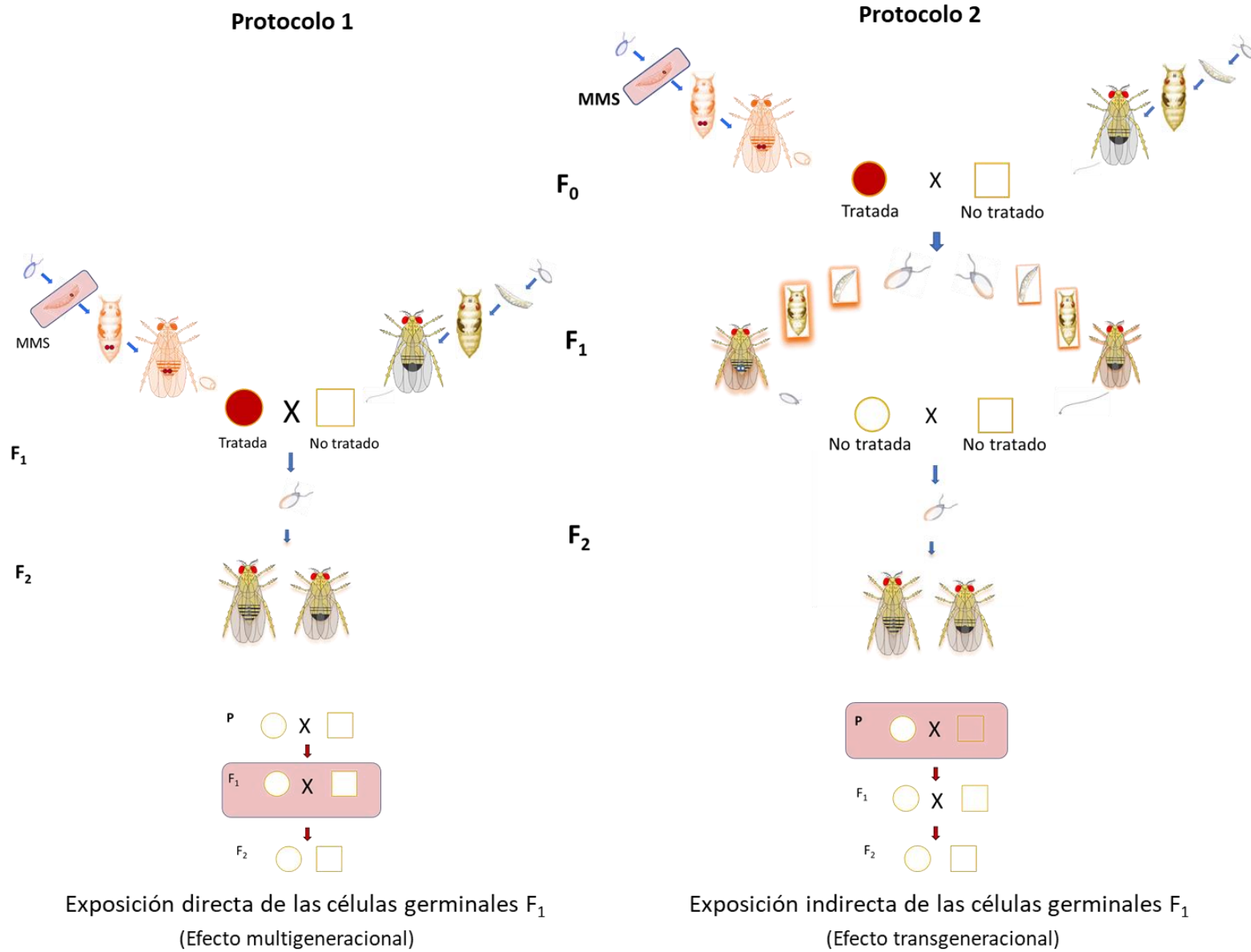


Fig. 3.4. Comparación del tratamiento en diferentes generaciones, en rosa se representa la generación expuesta a MMS. Del lado izquierdo se representa el esquema para el tratamiento de las moscas F₁, del lado derecho el esquema del protocolo 2.

3.5 Análisis estadístico

3.5.1 Toxicidad del MMS

Para establecer la toxicidad del tratamiento, tanto en la generación progenitora como en la primera generación (F₁) se calculó el promedio de los organismos adultos recuperados del tratamiento durante el estadio larvario:

$$\text{Sobrevivencia promedio} = \frac{\sum_{i=1}^n \text{total de moscas por pareja}}{\text{Total de parejas}}$$

También se calculó la proporción sexual para medir si el tratamiento afectó el número de hembras y machos recobrados:

$$\text{Proporción sexual} = \frac{\text{total de moscas} \text{ ♀ o ♂ por pareja}}{\text{Total de moscas por pareja}}$$

Para determinar diferencias significativas entre el promedio de la sobrevivencia del testigo y las [X] de MMS se utilizó una prueba de ANOVA de una vía. En el caso de la proporción sexual se realizó una ANOVA de dos vías para establecer diferencias entre hembras y machos de las [X] de MMS y el testigo. Cuando el ANOVA mostró diferencias significativas se utilizó la prueba posthoc de Dunnet, que compara los diferentes tratamientos respecto al testigo.

3.5.2. Efecto del MMS en las células germinales: fertilidad, cantidad de progenie y frecuencia de recombinación.

La fertilidad se estimó de la siguiente manera:

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

Para determinar diferencias significativas entre las [X] de MMS respecto al testigo, se utilizó una prueba de Z para proporciones.

La cantidad de progenie promedio se obtuvo de la siguiente manera:

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

Para determinar diferencias significativas en la cantidad de progenie en las diferentes [X] de MMS y el testigo se realizó una ANOVA de una vía y cuando el ANOVA mostró diferencias significativas se utilizó la prueba posthoc de Dunnet.

La frecuencia de recombinación entre los genes w y m se obtuvo para el testigo y cada [X] de MMS con el método propuesto por Sturtevant (1913) a partir del número total de moscas con fenotipo recombinante entre el total de moscas obtenidas en la F₂:

$$\text{Frecuencia de recombinación} = \frac{\sum_{i=1}^n \text{moscas recombinantes en la F}_2}{\text{Total de moscas de la F}_2}$$

La frecuencia de recombinación se estimó tanto para la F₂ proveniente de padres expuestos como de abuelos expuestos. Las diferencias significativas entre la frecuencia de recombinación de cada [X] respecto al testigo se obtuvieron mediante una prueba de z para proporciones.

3.5.3. Selección precigótica y postcigótica por exposición al MMS

La comparación del porcentaje de tubos con huevos y viabilidad entre las diferentes concentraciones y el testigo, así como las diferencias entre los tres esquemas de cruza se evaluaron mediante una prueba de Z para proporciones.

$$\% \text{ Tubos con huevos} = \frac{\# \text{ parejas con presencia huevos}}{\# \text{ total de parejas}}$$

$$\text{Viabilidad} = \frac{\# \text{ Total de adultos recobrados por pareja}}{\# \text{ Total de huevos por pareja}}$$

$$\text{pérdida de organismos} = \frac{\text{Total de organismos que no se desarrollaron}}{\# \text{ total de parejas sincronizadas}}$$

Para analizar el número de huevos promedio, la cantidad de progenie adulta y el número promedio de organismos que no completaron su desarrollo se realizó una prueba de ANOVA de dos vías, que evaluó si existían diferencias entre las medias de las concentraciones y el testigo, diferencias entre los esquemas de cruza y la interacción entre concentraciones y esquemas. En los casos que hubo diferencias significativas se realizó la prueba post hoc de Tukey o Sidak, la cual corrige el nivel de significancia para las comparaciones múltiples.

IV. Protocolo 1. Exposición directa.

4.1 Método del Protocolo 1

El tratamiento se administró a larvas de tercer estadio, las cuales, presentan activas la mayoría de las rutas metabólicas que se expresan en la mosca adulta (Hallstrom *et al.*, 1981a; Clark, 1982). Además, en esta etapa, la mayoría de las células germinales presentes son espermatogonias y ovogonias (Cooper, 1949). Por consiguiente, la exposición de larvas evalúa la exposición de células premeióticas, así como células en las primeras etapas de la meiosis.

4.1.1 Obtención de larvas para el tratamiento

Para obtener las larvas F₁ utilizadas en el tratamiento con una edad semejante, se hizo la cruce progenitora con hembras vírgenes silvestres *w+ m+ / w+ m+* y machos ojo blanco y alas reducidas *w m / Y*, a los tres días de realizada la cruce se transfirió a los progenitores a frascos con medio de cultivo fresco por un periodo de 8 hr, retirándolos posteriormente. A partir de los huevos colectados se obtuvieron larvas F₁ de 72 ± 4 horas que se extrajeron por el método de Nöthinger (1970) el cual consiste en separar las larvas del medio mediante un gradiente de densidad generado por una disolución de sacarosa al 20%. Posteriormente las larvas F₁ fueron asignadas al azar a las series testigo y experimentales del tratamiento.

4.1.2 Administración del tratamiento

El MMS se disolvió en agua destilada, la cual se utilizó como testigo negativo. Se probaron nueve concentraciones de MMS con un rango de 2.4 E-04 mM a 10 mM, las cuales se prepararon por diluciones sucesivas. Las concentraciones se seleccionaron con base en la actividad de toxicidad y genotoxicidad del MMS reportada en *Drosophila melanogaster* para la prueba de mutación y recombinación somática (Muñoz, 1995) y para la prueba de reparación de DNA (Rivas, 1999), las cuales se especifican en la Tabla I.

Tabla 1. Concentraciones de MMS

MMS [mM]
testigo
2.40E-04
3.90E-04
9.70E-04
1.56E-02
6.25E-02
1.25E-01
1
5
10

De las diluciones realizadas se tomaron 4.5ml por cada concentración y se mezclaron con 1g de medio instantáneo (Carolina Biological Supply) contenido en tubos homeopáticos, en cada tubo se colocaron aproximadamente 100 larvas de 72 horas de edad donde permanecieron hasta el periodo de pupación (donde no ingieren alimento), sometiéndose a un tratamiento subcrónico vía alimentación (72X48 h). Para cada concentración se realizaron tres réplicas.

Después de una semana se recobraron los adultos F_1 emergidos, los cuales se separaron y clasificaron por sexo, para obtener la sobrevivencia y la proporción sexual de las series testigo y experimentales.

4.1.3. Esquemas de cruce de las moscas F_1 expuestas

De las moscas F_1 emergidas del tratamiento se seleccionaron al azar 130 hembras heterocigas vírgenes y 130 machos hemicigos que fueron utilizados en tres esquemas de cruza (Fig. 4.1.1):

- ❖ Hembras F_1 tratadas X machos no tratados ($T_{F_1} \times NT$): permitió seguir el efecto en la progenie F_2 cuando las ovarias de las hembras F_1 maduran y forman óvulos en presencia del genotóxico.
- ❖ Hembras F_1 no tratadas X machos F_1 tratados ($NT_{F_1} \times T_{F_1}$): evaluó cuando las células germinales del macho que fecunda a la hembra son expuestas a genotóxicos durante su formación y maduración.
- ❖ Hembras F_1 tratadas X machos F_1 tratados ($T_{F_1} \times T_{F_1}$) las células germinales de la hembra y del macho que fecunda a la hembra son expuestas a genotóxicos durante su formación y maduración.

Para cada esquema de cruce se obtuvieron 65 parejas que se colocaron en tubos individuales, posteriormente, cuando emergió la F_2 se contó el número de parejas que tuvieron hijos para estimar la fertilidad, así como la cantidad de progenie que tuvo cada pareja, registrando sexo y fenotipo, con los que se calculó el tipo y cantidad de gametos producidos a través de la frecuencia de recombinación.

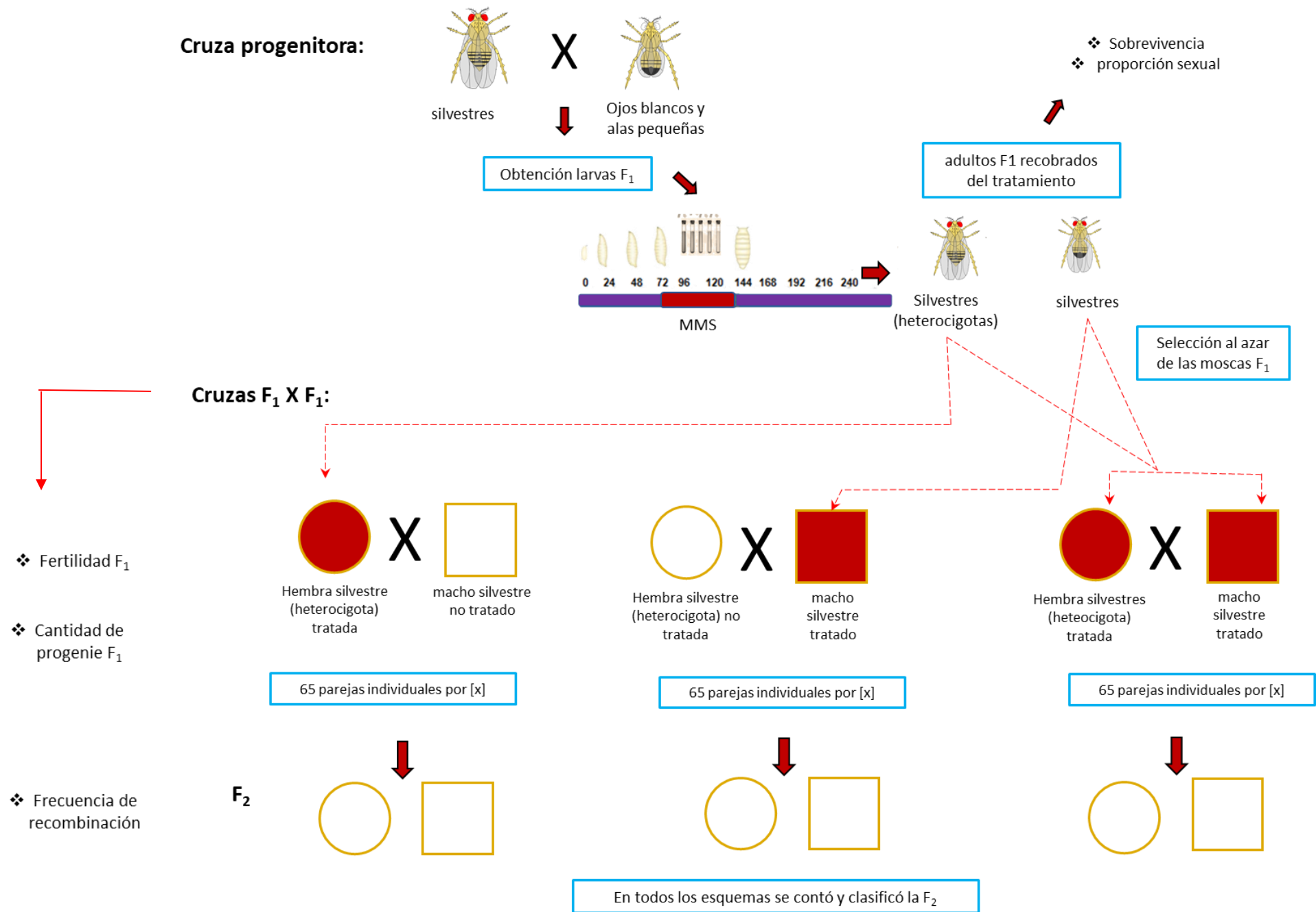


Fig.4.1.1 Protocolo1. Tratamiento y esquemas de cruce para la exposición directa de las células germinales F_1

4.1.4 Selección precigótica y postcigótica por exposición al MMS

Para determinar si la respuesta diferencial entre las células germinales de hembras y machos expuestas directamente a MMS durante su formación y maduración es consecuencia de que en las hembras expuestas podría ocurrir selección de las células germinales (previo a la formación del cigoto) o a la pérdida postcigótica, de manera que sólo se recobrarían individuos no afectados, se determinó el porcentaje de tubos con huevos, el número de huevos ovopositados, cantidad de progenie adulta y viabilidad de *Drosophila melanogaster*.

Con la finalidad de establecer si los biomarcadores antes mencionados de las moscas recobradas se modifican dependiendo del progenitor expuesto al mutágeno MMS se seleccionaron aleatoriamente 40 parejas (hembra x macho) para cada una de las cruzas realizadas en el punto 4.1.3:

- Hembras tratadas X machos no tratados (T X NT)
- Hembras no tratadas X machos tratados (NT X T)
- Hembras tratadas X machos tratados (TX T)

Al cuarto día, cada pareja de moscas se trasvasó a tubos homeopáticos con medio fresco por un periodo de ochos horas, con la finalidad de coleccionar la mayor cantidad de huevos de cada pareja, después de este tiempo las parejas se volvieron a trasvasar a otros tubos con medio fresco. Se obtuvo la frecuencia de hembras que ovopositaron, es decir, el número de tubos que tuvieron huevos (sin importar el número de huevos) respecto al número total de tubos sincronizados, también se contó el número de huevos que había en cada tubo durante las ocho horas de sincronización (Fig. 4.1.2).

Pasados 10 días, se contó la progenie adulta recobrada en cada uno de los tubos sincronizados, a partir de la cual se evaluó la cantidad de progenie adulta promedio de los organismos expuestos y la viabilidad de la descendencia de los individuos expuestos estimada como el porcentaje de huevos que completaron su desarrollo hasta adultos (Fig. 4.1.2).

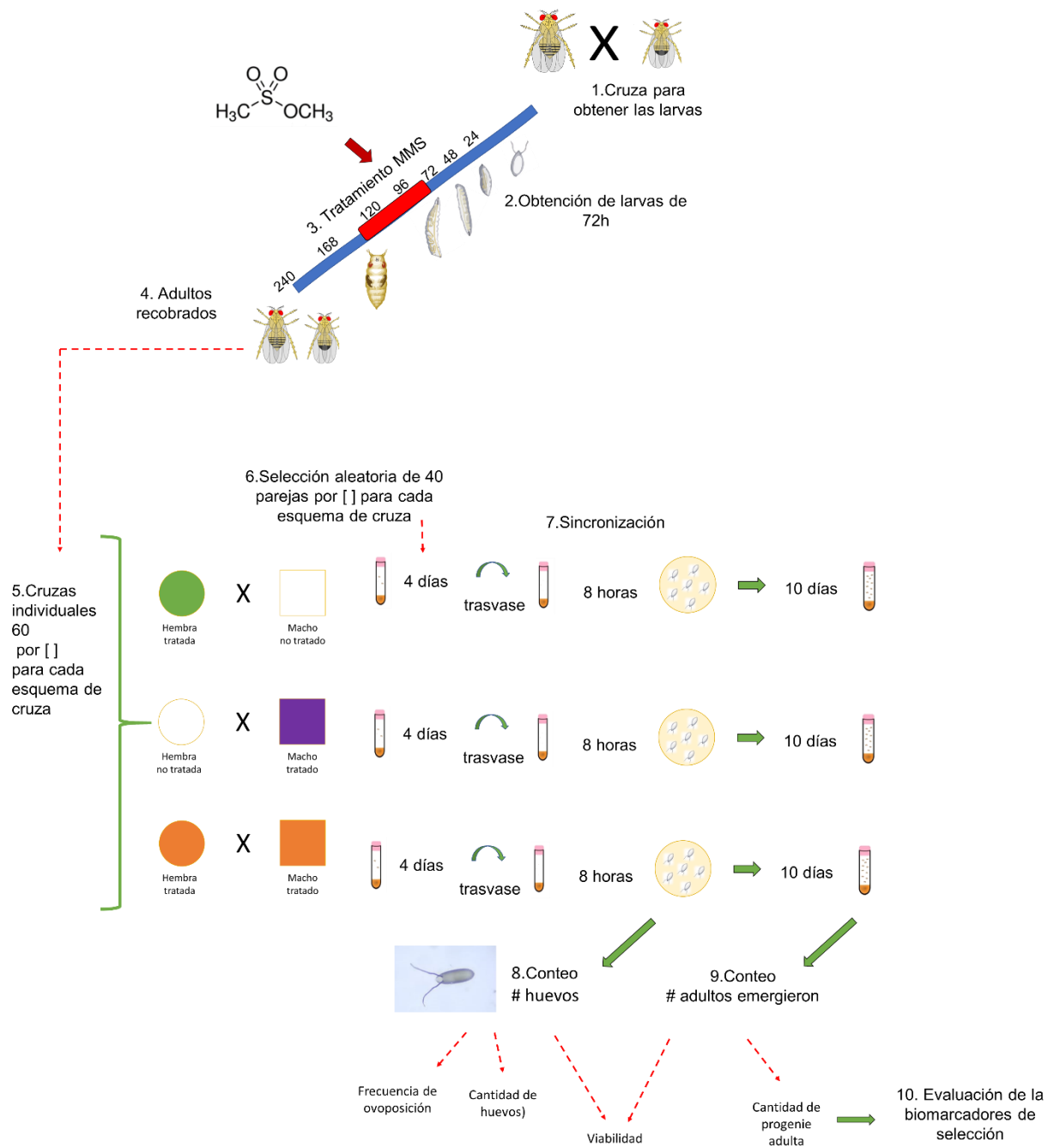


Fig.4.1.2 Esquema del procedimiento para evaluar los biomarcadores de selección precigótica y postscigótica.

4.2. Resultados del Protocolo 1.

En los resultados, primero se presenta si existe un efecto tóxico del tratamiento con MMS a partir de los biomarcadores de sobrevivencia (S) y la proporción sexual (Psx). Posteriormente, si la capacidad reproductiva de las moscas F₁ expuestas a MMS se modificó, utilizando los biomarcadores de toxicidad reproductiva de fertilidad (F) y cantidad de progenie por pareja (PP) y finalmente se muestra el efecto del MMS en la frecuencia de recombinación (Fr) de las células germinales.

4.2.1 Toxicidad de las moscas F₁ expuestas a MMS

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en la sobrevivencia y la proporción sexual de las moscas recobradas de la línea de referencia Cs y de las moscas F₁ heterocigóticas expuestas durante la tercera etapa larvaria a MMS. Las concentraciones 5 mM y 10 mM fueron letales tanto para la línea de referencia como para las moscas F₁, la concentración 1mM fue subletal en ambas líneas, pero únicamente se encontraron diferencias significativas respecto a su testigo (F_{7,40}=2.17; p=0.05; Dunnett =p<0.05) en la línea de referencia Cs (Fig. 4.2). La proporción sexual no mostró diferencias significativas en ninguna concentración de MMS respecto a su testigo en ninguna de las líneas empleadas, tampoco fueron diferentes entres las líneas como se muestra en la figura 4.2.

Tabla 2. Sobrevivencia y Proporción sexual de las moscas expuestas a MMS.

MMS [mM]	Total de moscas	silvestres Cs							F ₁ : ♀♀w ⁺ m ⁺ /wm y ♂♂ w ⁺ m ⁺ /Y						
		S ± ee	f	Psx ♀ ± ee	Psx ♂ ± ee	f	S ± ee	f	Psx ♀ ± ee	Psx ♂ ± ee	f				
testigo	480	80.00 ± 10.21	-	0.49 ± 0.01	0.51 ± 0.01	-	644	71.56 ± 8.22	-	0.51 ± 0.03	0.49 ± 0.03	-			
2.40E-04	392	65.33 ± 6.52	-	0.50 ± 0.02	0.50 ± 0.02	-	616	68.44 ± 9.46	-	0.53 ± 0.03	0.47 ± 0.03	-			
3.90E-04	443	73.83 ± 5.99	-	0.51 ± 0.01	0.49 ± 0.01	-	595	66.11 ± 11.48	-	0.53 ± 0.03	0.47 ± 0.03	-			
9.70E-04	418	69.67 ± 8.60	-	0.51 ± 0.03	0.49 ± 0.03	-	536	67.00 ± 10.39	-	0.48 ± 0.02	0.52 ± 0.02	-			
1.56E-02	494	82.33 ± 4.14	-	0.48 ± 0.02	0.52 ± 0.02	-	585	65.00 ± 9.05	-	0.51 ± 0.04	0.49 ± 0.04	-			
6.25E-02	403	67.17 ± 6.36	-	0.53 ± 0.04	0.47 ± 0.04	-	584	64.89 ± 10.76	-	0.45 ± 0.02	0.55 ± 0.02	-			
1.25E-01	475	79.17 ± 3.62	-	0.51 ± 0.02	0.49 ± 0.02	-	515	57.22 ± 8.11	-	0.48 ± 0.03	0.52 ± 0.03	-			
1.00E+00	307	51.17 ± 7.41	*	0.41 ± 0.03	0.59 ± 0.03	-	395	49.38 ± 10.04	-	0.54 ± 0.04	0.46 ± 0.04	-			
5.00E+00	0						0								
1.00E+01	0						0								

S, sobrevivencia; Psx ♀, proporción sexual de hembras recobradas; Psx ♂, proporción sexual de machos recobrados; ee, error estándar; f, prueba estadística de ANOVA 1 vía; *. indica diferencias significativas respecto al testigo. Para la línea de referencia se realizaron seis tratamientos; para las moscas F₁ nueve tratamientos.

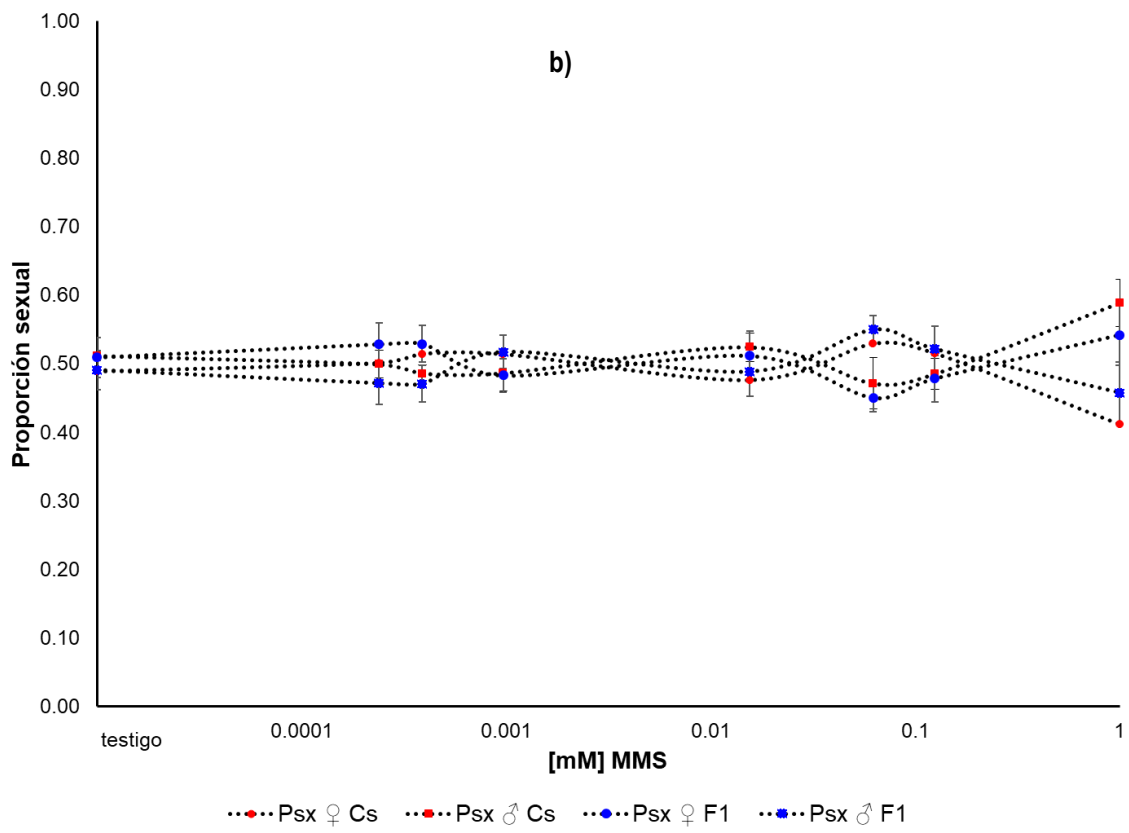
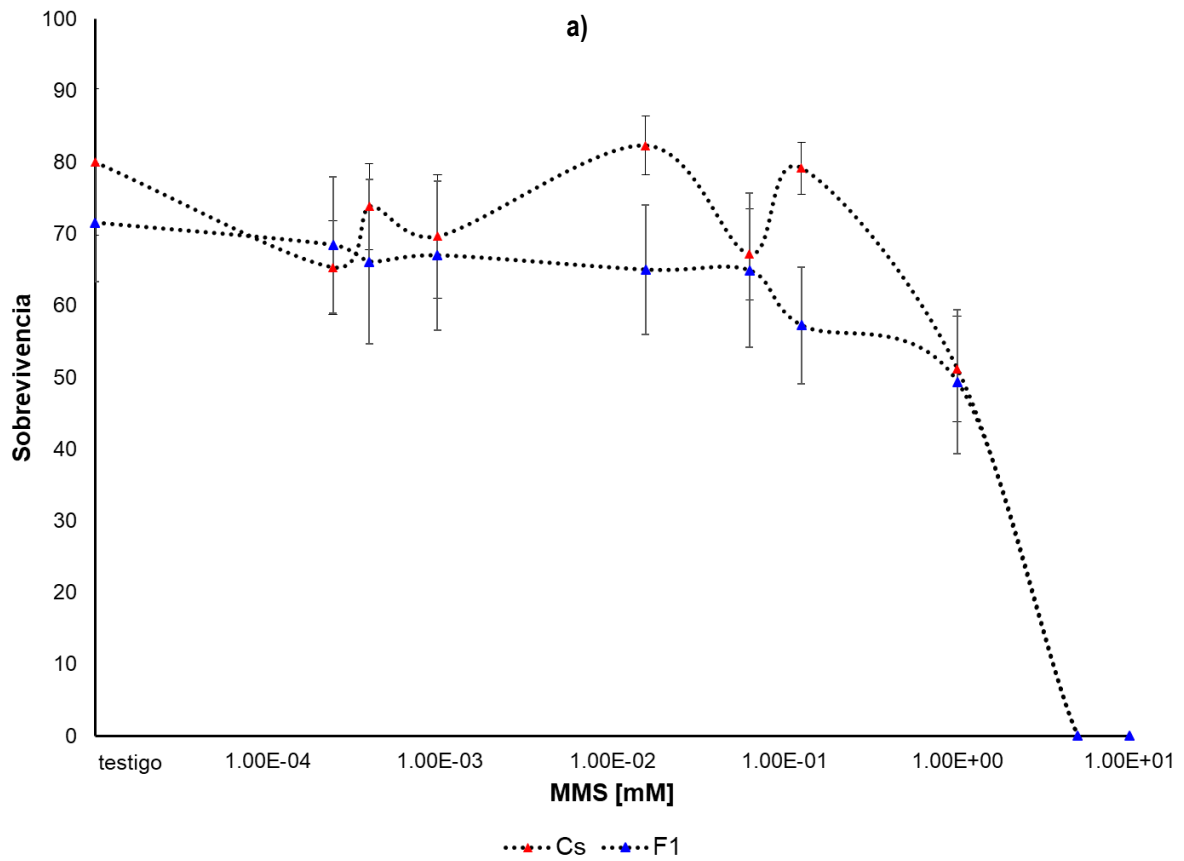


Fig. 4.2 a), sobrevivencia promedio de las moscas Cs y F₁ expuestas a MMS. b), proporción sexual de las moscas recobradas de la exposición a MMS. Ambas gráficas se representan en escala logarítmica.

4.1.2 Capacidad reproductiva de las moscas F₁ expuestas a MMS

Con la finalidad de evaluar cómo se afecta la capacidad reproductiva de las moscas F₁ recobradas del tratamiento con MMS se realizaron tres esquemas de cruza: solo hembras tratadas (T X NT), únicamente machos tratados (NT X T) y ambos progenitores tratados (T X T). En la tabla 3 se muestran los biomarcadores de fertilidad y cantidad de progenie promedio que estiman si la capacidad reproductiva de las moscas se afectó por la exposición a MMS.

Tabla 3. Capacidad reproductiva de las moscas F₁ expuestas a MMS.

Esquema de Cruza	MMS [mM]	n	F	d	Total de moscas	PP ± ee	f	Psx ♀ ± ee	f	Psx ♂ ± ee
♀ ♂ T x NT	testigo	63	1.00	-	5529	87.76 ± 4.33	-	0.51 ± 0.01	-	0.49 ± 0.01
	2.40E-04	63	0.98	-	5798	92.03 ± 5.00	-	0.51 ± 0.01	-	0.49 ± 0.01
	3.90E-04	58	0.97	-	4623	79.71 ± 4.62	-	0.51 ± 0.01	-	0.49 ± 0.01
	9.70E-04	57	0.97	-	4571	80.19 ± 3.95	-	0.51 ± 0.01	-	0.49 ± 0.01
	1.56E-02	61	0.97	-	5402	88.56 ± 3.83	-	0.50 ± 0.01	-	0.50 ± 0.01
	6.25E-02	52	0.93	*	5002	96.19 ± 5.73	-	0.53 ± 0.01	-	0.47 ± 0.01
	1.25E-01	63	0.98	-	5221	82.87 ± 4.19	-	0.51 ± 0.01	-	0.49 ± 0.01
	1.00E+00	44	0.96	-	3233	73.48 ± 5.78	-	0.53 ± 0.01	-	0.47 ± 0.01
♀ ♂ NT x T	testigo	60	0.92	-	4441	74.02 ± 4.22	-	0.50 ± 0.01	-	0.50 ± 0.01
	2.40E-04	64	0.98	-	5226	81.66 ± 4.34	-	0.51 ± 0.01	-	0.49 ± 0.01
	3.90E-04	48	0.92	-	3841	80.02 ± 4.85	*	0.50 ± 0.01	-	0.50 ± 0.01
	9.70E-04	49	0.96	-	4634	94.57 ± 5.16	*	0.52 ± 0.01	-	0.48 ± 0.01
	1.56E-02	58	0.91	-	4198	72.38 ± 4.23	-	0.50 ± 0.01	-	0.50 ± 0.01
	6.25E-02	47	0.75	*	1754	37.32 ± 3.41	*	0.49 ± 0.02	-	0.51 ± 0.02
	1.25E-01	29	0.48	*	1275	43.97 ± 4.32	*	0.48 ± 0.01	-	0.52 ± 0.01
	1.00E+00	20	0.51	*	786	39.30 ± 4.16	*	0.51 ± 0.02	-	0.49 ± 0.02
♀ ♂ T x T	testigo	64	1.00	-	4962	77.53 ± 4.24	-	0.50 ± 0.01	-	0.50 ± 0.01
	2.40E-04	64	0.98	-	4420	69.06 ± 4.23	-	0.51 ± 0.01	-	0.49 ± 0.01
	3.90E-04	52	1.00	-	3972	76.38 ± 4.89	-	0.50 ± 0.01	-	0.50 ± 0.01
	9.70E-04	48	0.98	-	2662	55.46 ± 4.38	*	0.48 ± 0.02	-	0.52 ± 0.02
	1.56E-02	59	0.92	*	3262	55.29 ± 3.46	*	0.49 ± 0.01	-	0.51 ± 0.01
	6.25E-02	25	0.51	*	902	34.69 ± 4.36	*	0.48 ± 0.03	-	0.52 ± 0.03
	1.25E-01	24	0.44	*	929	38.71 ± 4.66	*	0.51 ± 0.02	-	0.49 ± 0.02
	1.00E+00	24	0.48	*	829	34.54 ± 2.33	*	0.52 ± 0.02	-	0.48 ± 0.02

T x NT (♀ tratadas), NT x T (♂ tratados) y T x T (ambos progenitores tratados); n, número de parejas; F, fertilidad; Total de moscas recobradas, progenie de todas las parejas; PP, progenie promedio por pareja; Psx ♀, promedio de la proporción sexual de hembras en la progenie F₂; Psx ♂, promedio de la proporción sexual de machos en la progenie F₂; ee, error estándar; d, prueba de z para proporciones; f, prueba de ANOVA 1 vía; *, indica diferencias significativas respecto al testigo (p<0.05).

Como se muestra en la tabla 3, la fertilidad de la cruce T x NT disminuyó respecto su testigo en la concentración 6.25 E-02 mM ($p < 0.05$), sin embargo, la cantidad de progenie no mostró diferencias significativas en comparación a su testigo. En cambio, la fertilidad de la cruce NT x T disminuyó respecto a su testigo a partir de la concentración 6.25 E-02 mM ($p < 0.05$) y la cantidad de progenie mostró diferencias significativas con su testigo en las concentraciones 9.7E-04 mM y de 6.25E-02 mM en adelante ($F_{7,367}=19.34$; $p < 0.0001$; Dunnett = $p < 0.05$). Cuando ambos progenitores fueron expuestos, la fertilidad se redujo a partir de la concentración 1.56 E-02 mM en comparación con el testigo ($Z_{0.05}= 1.96$; $p < 0.05$), mientras que la cantidad de progenie recobrada fue menor a partir de la concentración 9.7 E-4 mM ($F_{7,353}=13.29$; $p < 0.0001$; Dunnett = $p < 0.05$).

En la figura 4.3 se compara la fertilidad de los tres esquemas de cruce, en la cual, la cruce T x NT presentó diferencias significativas respecto a las cruces NT x T y T x T a partir de la concentración 6.25E-02 mM ($p < 0.05$). La fertilidad de la cruce NT x T sólo mostró diferencias significativas en la concentración 6.25E-02 mM con la cruce T x T ($p < 0.05$).

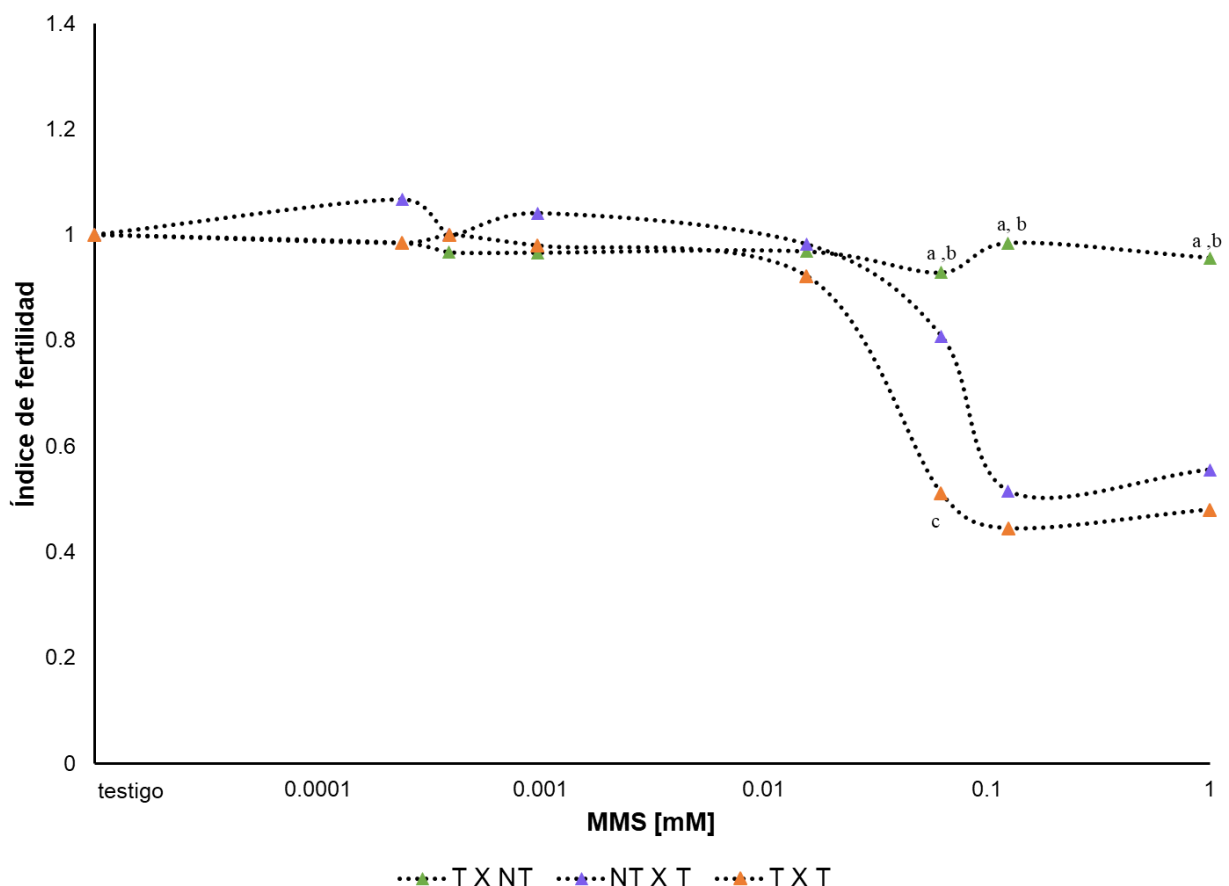


Fig. 4.3 Índice de fertilidad de las moscas F_1 expuestas a MMS de cada esquema de cruce: T x NT (♀ tratadas), NT x T (♂ tratados) y T x T (ambos progenitores tratados), [] en escala logarítmica. La letra a indica diferencias significativas entre las cruces T x NT y NT x T; b, diferencias significativas entre las cruces T x NT y T x T y la letra c, diferencias significativas entre las cruces NT x T y T x T.

En la gráfica 4.4 se muestra que la progenie promedio recobrada es diferente dependiendo del progenitor (hembra, macho o ambos) expuesto para las diferentes concentraciones de MMS. En las concentraciones menores de MMS no hubo diferencias significativas en la cantidad de progenie entre la cruza T x NT y NT x T, pero la cruza de ambos progenitores tratados presentó diferencias significativas respecto a los otras dos esquemas de cruza ($F=14,1172=8.35$; $p<0.0001$; Sidak= $p<0.05$). En cambio, a partir de la concentración 1.56 E-02 mM de MMS, las cruza NT x T y T x T dieron menos cantidad de progenie que la cruza T x NT ($F=7,353=13.29$; $p<0.0001$; Sidak = $p<0.05$).

Estos resultados muestran que existe una respuesta diferencial en la capacidad reproductiva de hembras o machos expuestos en las concentraciones más altas de MMS, ya que la fertilidad y la cantidad de progenie es menor cuando los progenitores expuestos son los machos, no así cuando las hembras son expuestas al compuesto, estos biomarcadores no se ven afectados.

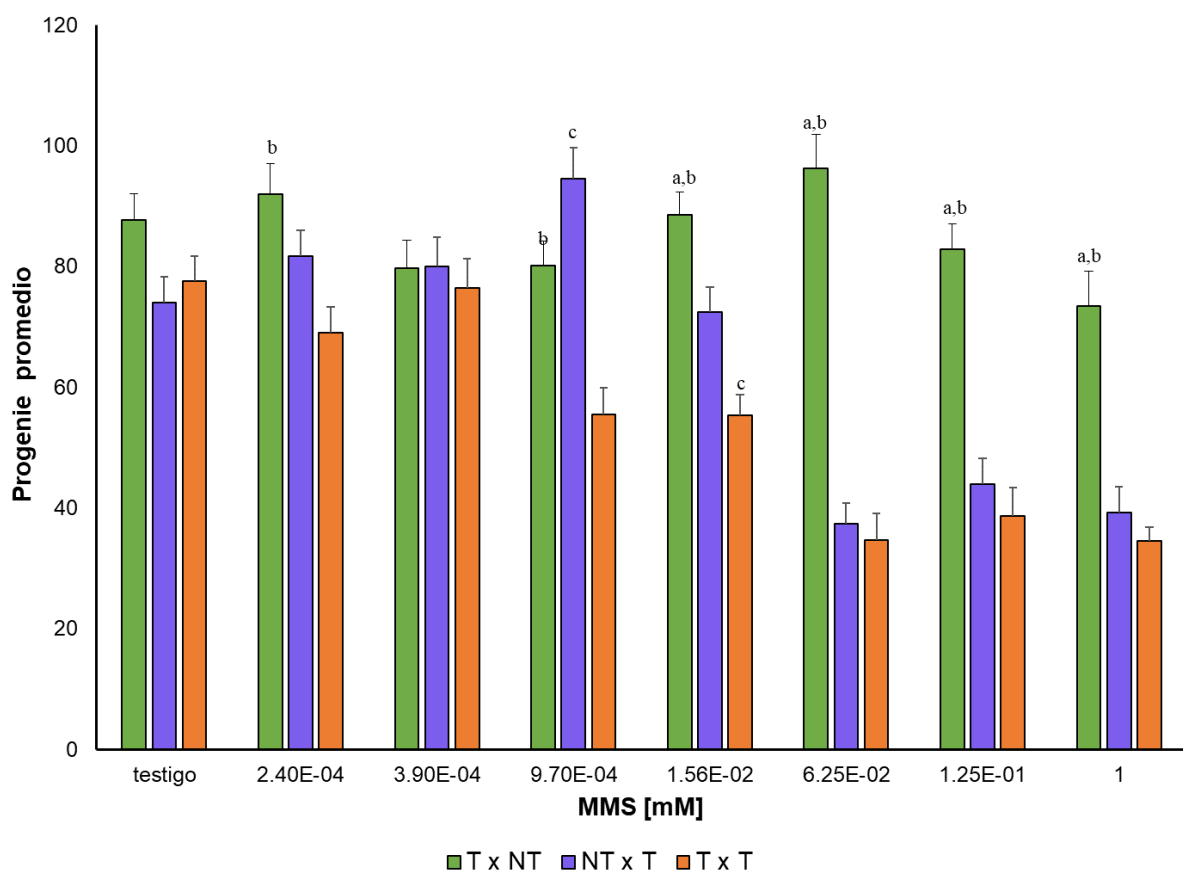


Fig. 4.4 Progenie promedio por pareja de las moscas F₁ expuestas a MMS para cada esquema de cruza: T x NT (♀ tratadas), NT x T (♂ tratados) y T x T (ambos progenitores tratados). La letra a indica diferencias significativas entre las cruza T x NT y NT x T; b, diferencias significativas entre las cruza T x NT y T x T y la letra c, diferencias significativas entre las cruza NT x T y T x T. Las diferencias significativas se obtuvieron de una prueba de ANOVA de dos vías.

4.1.3 Recombinación en las células germinales de las hembras F₁

La frecuencia de recombinación de las células germinales de las hembras F₁ (Fig. 3.3) obtenidas a partir de los fenotipos la descendencia F₂ para cada esquema de cruce se muestran en la tabla 4. En la cruce T x NT la frecuencia de recombinación entre los genes white-miniatura fue menor en la concentración 1 mM de MMS respecto a su testigo (p<0.05). En la cruce NT x T no se encontró diferencia significativa entre las concentraciones y su testigo. Para la cruce T x T en las concentraciones 3.9 E-04 mM y 1.56 E-02 mM se obtuvo menor frecuencia de recombinación que en el testigo (p<0.05).

Tabla 4. Frecuencia de recombinación germinal en las hembras F₁.

MMS [mM]	n	♀ ♂ T x NT		n	♀ ♂ NT x T		n	♀ ♂ T x T	
		Fr (w-m)	d		Fr (w-m)	d		Fr (w-m)	d
testigo	5529	0.36	-	4441	0.35	-	4962	0.37	-
2.40E-04	5798	0.34	-	5226	0.34	-	4420	0.37	-
3.90E-04	4623	0.35	-	3841	0.36	-	3972	0.33	*
9.70E-04	4571	0.35	-	4634	0.36	-	2662	0.35	-
1.56E-02	5402	0.35	-	4198	0.34	-	3262	0.33	*
6.25E-02	5002	0.36	-	1754	0.31	-	902	0.37	-
1.25E-01	5221	0.35	-	1275	0.33	-	929	0.40	-
1.00E+00	3233	0.31	*	786	0.32	-	829	0.32	-

T x NT (♀ tratadas), NT x T (♂ tratados) y T x T (ambos progenitores tratados); n, número total de moscas recobradas por concentración; Fr (w-m), frecuencia de recombinación entre los genes *white-miniatura*; d, prueba de z para proporciones; *, indica diferencias significativas respecto al testigo.

En la figura 4.5 se muestra que la frecuencia de recombinación obtenida en las cruces T X T y NT x T fluctúa en las diferentes concentraciones de MMS, en cambio, en la cruce T x NT la frecuencia de recombinación únicamente se afectó en la concentración más alta. Las comparaciones estadísticas entre los diferentes esquemas de cruce mostraron que la frecuencia de recombinación entre la cruce NT x T fue menor en comparación con los resultados de la cruce T x NT en la concentración 6.2E-02 mM (p<0.05), en la concentración 1.25E-1mM la frecuencia de recombinación fue menor en las cruces TxNT y NT xT en comparación con la cruce T x T (p<0.05). En cambio, en las concentraciones más bajas 3.9 E-04mM y 9.7 E-04mM la frecuencia de recombinación obtenida de la cruce T x T fue menor que la frecuencia de recombinación de la cruce NT x T (p<0.05).

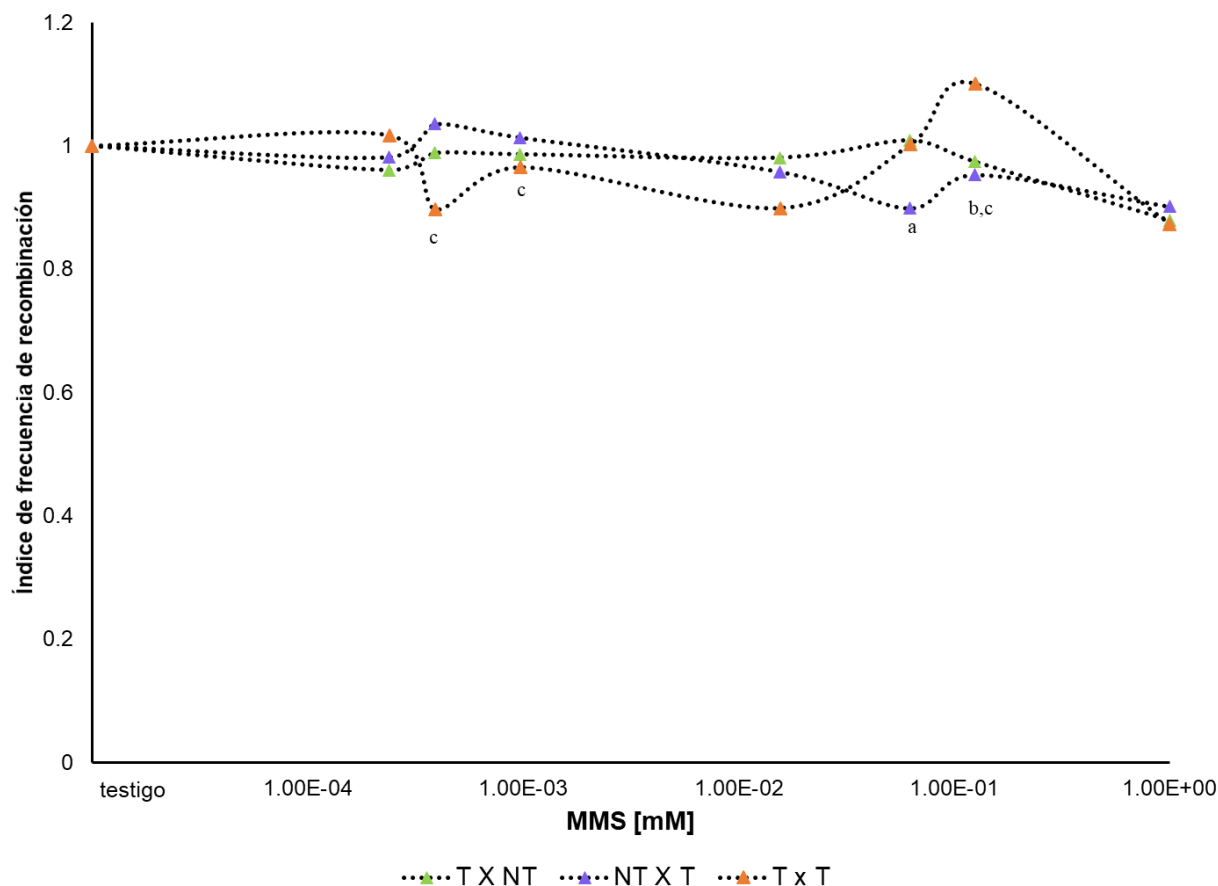


Fig. 4.5 Índice de la frecuencia de recombinación de las hembras F₁ de los tres esquemas de cruce: T x NT (♀ tratadas), NT x T (♂ tratados) y T x T (ambos progenitores tratados), [] en escala logarítmica. La letra a indica diferencias significativas entre las cruces T x NT y NT x T; b, diferencias significativas entre las cruces T x NT y T x T y la letra c, diferencias significativas entre las cruces NT x T y T x T. Las diferencias significativas se obtuvieron de una prueba de Z para proporciones.

4.2 Selección precigótica y postcigótica por la exposición directa a MMS.

Para determinar si la respuesta diferencial entre las células germinales de hembras y machos se debió a que en las hembras expuestas podría ocurrir selección de las células germinales precigótica (previo a la formación del cigoto) o postcigótica (posterior a la formación del cigoto), se midieron los siguientes biomarcadores de selección: el porcentaje de tubos con huevos, el número de huevos ovopositados, cantidad de progenie adulta recobrada, viabilidad y pérdida de individuos.

La selección precigótica se evaluó con el porcentaje de tubos con huevos y el número de huevos ovopositados, para medir la selección postcigótica los biomarcadores utilizados fueron la cantidad de progenie adulta recobrada, viabilidad y pérdida de individuos.

En la tabla 5 se muestra el resumen de los resultados obtenidos para los biomarcadores de selección antes mencionados en función del progenitor que recibió el tratamiento, que se representa en los tres esquemas de cruce: solo hembras tratadas (T X NT), únicamente machos tratados (NT X T) y ambos progenitores tratados (T X T).

Tabla 5. Biomarcadores de selección precigótica y postcigótica de las moscas expuestas a MMS

Esquema de Cruza	MMS [mM]	%Tubos con		Total de d	Total de			% de				
		n	huevos		PH ± ee	f	adultos	PA ± ee	f	Viabilidad	d	
♀ ♂ T x NT	testigo	40	67.50	-	267	9.89 ± 1.65	-	241	10.95 ± 1.69	-	90.26	-
	2.40E-04	40	60.00	-	188	7.83 ± 1.42	-	159	7.95 ± 1.44	-	84.57	-
	3.90E-04	35	31.43	*	89	8.09 ± 1.92	-	83	9.22 ± 1.96	-	93.26	-
	9.70E-04	34	47.06	-	103	6.44 ± 0.97	-	89	5.93 ± 0.87	-	86.41	-
	1.56E-02	39	53.85	-	169	8.05 ± 1.34	-	138	7.26 ± 1.39	-	81.66	*
	6.25E-02	31	64.52	-	205	10.25 ± 2.00	-	152	9.50 ± 2.09	-	74.15	*
	1.25E-01	40	65.00	-	204	7.85 ± 1.16	-	198	7.12 ± 1.00	-	97.06	*
	1.00E+00	32	46.88	-	129	8.60 ± 1.36	-	111	7.40 ± 1.33	-	86.05	-
♀ ♂ NT x T	testigo	40	67.50	-	152	5.63 ± 0.91	-	139	5.56 ± 0.97	-	91.45	-
	2.40E-04	25	28.00	*	195	7.50 ± 2.37	-	185	6.54 ± 0.90	-	94.87	-
	3.90E-04	27	62.96	-	109	6.41 ± 0.87	-	99	6.19 ± 0.83	-	90.83	-
	9.70E-04	26	38.46	*	56	5.60 ± 0.92	-	47	5.22 ± 0.78	-	83.93	-
	1.56E-02	40	55.00	-	149	6.77 ± 1.14	-	115	6.39 ± 1.20	-	77.18	*
	6.25E-02	40	40.00	*	172	10.75 ± 2.57	-	91	11.38 ± 2.84	-	52.91	*
	1.25E-01	39	33.33	*	126	9.69 ± 2.46	-	15	15.00	-	11.90	*
	1.00E+00	25	20.00	*	66	13.20 ± 6.92	-	28	28.00	-	42.42	*
♀ ♂ T x T	testigo	40	65.00	-	173	6.65 ± 0.71	-	149	5.96 ± 0.76	-	86.13	-
	2.40E-04	40	52.50	-	165	7.86 ± 1.21	-	155	7.38 ± 1.26	-	93.94	*
	3.90E-04	27	62.96	-	180	10.59 ± 2.68	-	166	10.38 ± 2.65	-	92.22	-
	9.70E-04	25	28.00	*	30	4.29 ± 1.04	-	23	4.60 ± 1.47	-	76.67	-
	1.56E-02	40	67.50	-	171	6.33 ± 1.38	-	141	6.41 ± 1.65	-	82.46	-
	6.25E-02	25	36.00	*	67	7.44 ± 2.22	-	53	7.57 ± 2.26	-	79.10	-
	1.25E-01	32	31.25	*	91	9.10 ± 2.09	-	68	9.71 ± 2.62	-	74.73	*
	1.00E+00	15	20.00	*	33	11.00 ± 2.00	-	0	0.00	-	0.00	-

T x NT (♀ tratadas), NT x T (♂ tratados) y T x T (ambos progenitores tratados); n, número de parejas; PH, promedio de huevos por pareja; PA, progenie promedio por pareja; % de viabilidad, total de adultos recobrados respecto al total de huevos ovopositados; ee, error estándar; d prueba de Z para proporciones; f, prueba de ANOVA. * indica diferencias significativas respecto al testigo correspondiente y - -, señala que en la concentración 1.25 E-1mM y 1 mM no se pudo obtener el promedio, sólo se recobró progenie adulta de una hembra.

En la cruce en la que únicamente las hembras fueron las expuestas a MMS, (T x NT) el porcentaje de hembras que ovopositaron fue menor en la concentración 3.9 E-04 mM en comparación con el testigo ($p < 0.05$). Mientras que en la cruce en la que machos expuestos se cruzaron con hembras no tratadas (NT x T), el porcentaje de tubos con huevos se afectó en la mayoría de las concentraciones: 2.4 E-04

mM, 9.7×10^{-4} mM y de 6.25×10^{-2} mM en adelante ($p < 0.05$). En la cruce donde ambos progenitores fueron expuestos, las concentraciones 9.7×10^{-4} mM y de 1.25×10^{-1} mM en adelante presentaron menor frecuencia de ovoposición que el testigo ($p < 0.05$).

En la figura 4.6, se compara el porcentaje de tubos con huevos de los tres sistemas de cruce, en las tres concentraciones más altas de MMS (6.25×10^{-2} mM, 1.25×10^{-1} mM y 1mM) la frecuencia de ovoposición de las cruza NT x T y T x T fue significativamente menor que en la cruce T x NT ($p < 0.05$). En la concentración 2.4×10^{-4} mM, la frecuencia de ovoposición sólo mostró diferencias significativas entre la cruce T x NT y NT x T. En cambio, en la concentración 3.9×10^{-4} mM la frecuencia de ovoposición de las cruza NT x T y T x T fue mayor que en la cruce T x NT. Estos resultados evidencian que existe una respuesta diferencial en la frecuencia de ovoposición dependiendo de cuál de los progenitores fue expuesto.

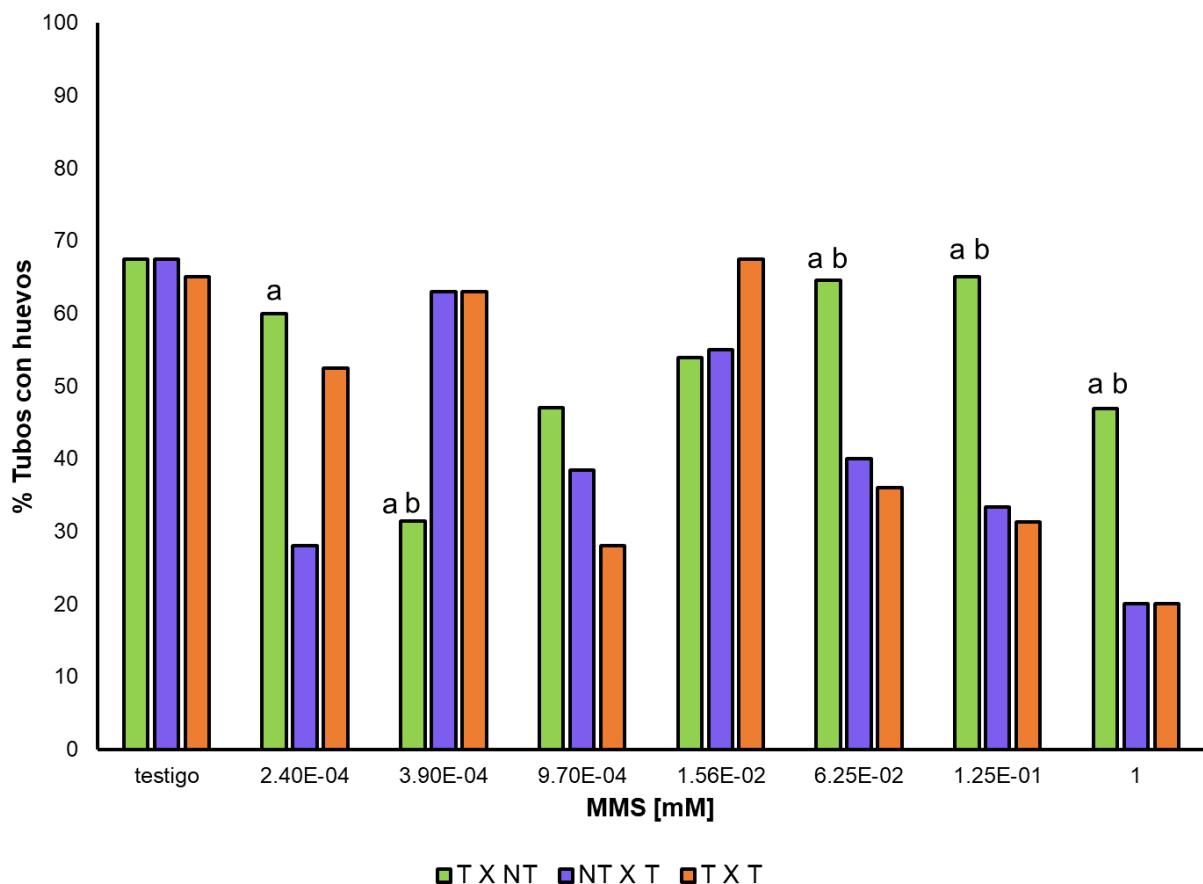


Fig. 4.6 Comparación del porcentaje de tubos con huevos para los diferentes esquemas de cruce. T x NT (♀ tratadas), NT x T (♂ tratadas) y T x T (ambos tratados). La letra a indica diferencias significativas entre la cruce T x NT y NT x T; b indica diferencias significativas entre la cruce T x NT y T x T; para la prueba de Z para proporciones, $P < 0.05$.

Para cada esquema de cruce, de las hembras que ovopositaron se contó la cantidad de huevos. El número de huevos promedio que ovopositaron las hembras tratadas cruzadas con machos no tratados mostró una tendencia a ser menor que el testigo en la mayoría de las concentraciones de MMS excepto en 6.25 E-02 mM (Fig.4.7).

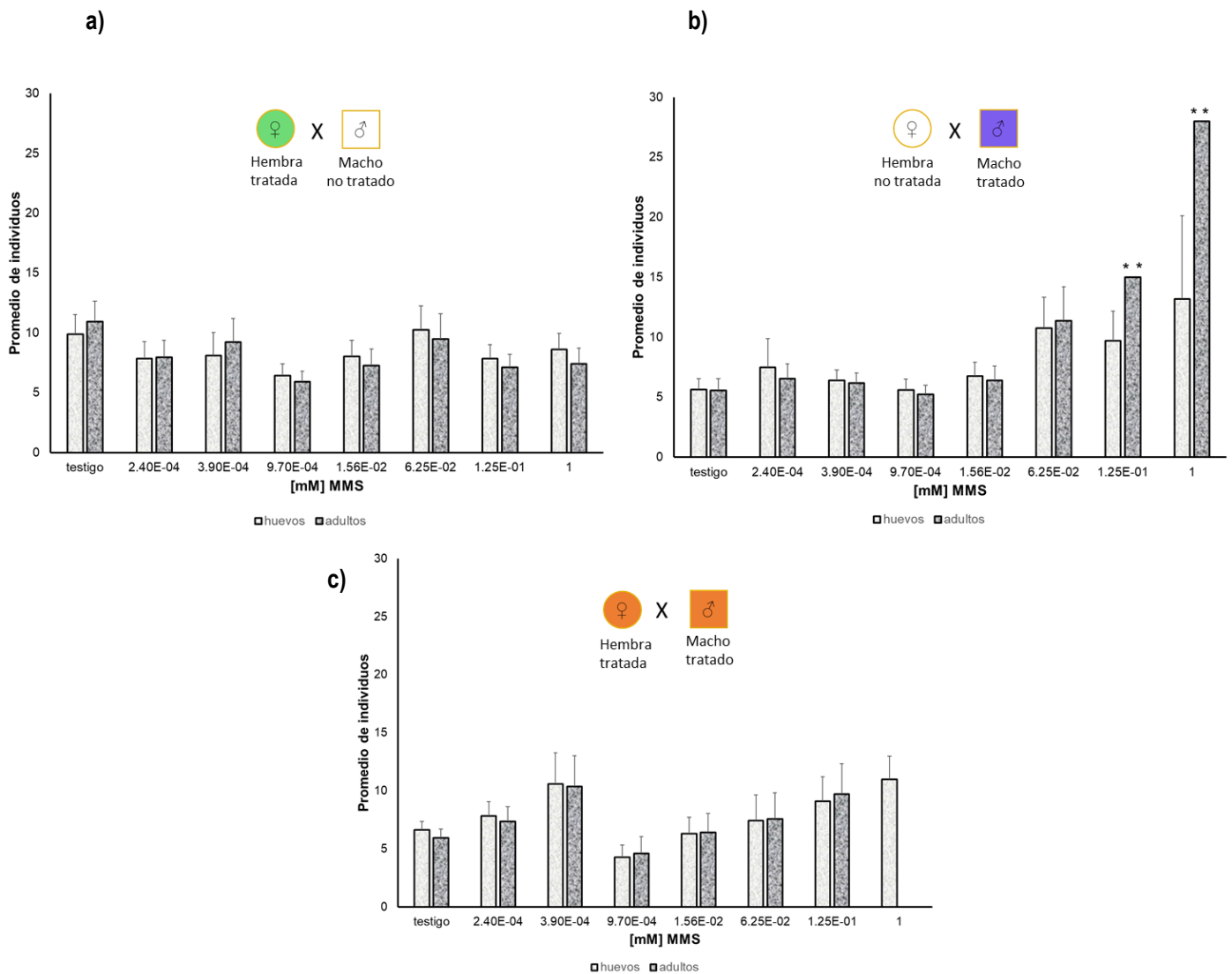


Fig. 4.7. Promedio del número de huevos y adultos recobrados de moscas expuestas a MMS para los diferentes esquemas de cruce. a), T x NT (♀ tratadas); b) NT x T (♂ tratadas) y c) T x T (ambos tratados). El ** indica que en las concentraciones 1.25 E-01 mM y 1 mM no se pudo obtener el promedio ya que sólo se recobró progenie adulta de una hembra.

En las cruza NT x T y T x T el número de huevos promedio presentó una tendencia a aumentar respecto a su testigo en la mayoría de las concentraciones de MMS, excepto en la concentración 9.7 E-04 mM de la cruz a NT x T y en las concentraciones 9.7 E-04mM y 1.56 E-02 mM de la cruz a T x T (Fig.4.6).

Al comparar la cantidad de huevos registrados mediante el índice promedio de huevos entre los diferentes esquemas de cruz a se encontró que en todas las concentraciones la cantidad de huevos en la cruz a donde sólo las hembras progenitoras fueron expuestas es menor que en las cruza donde los machos progenitores fueron expuestos (NT x T y T X T) como se muestra en la figura 4.8.

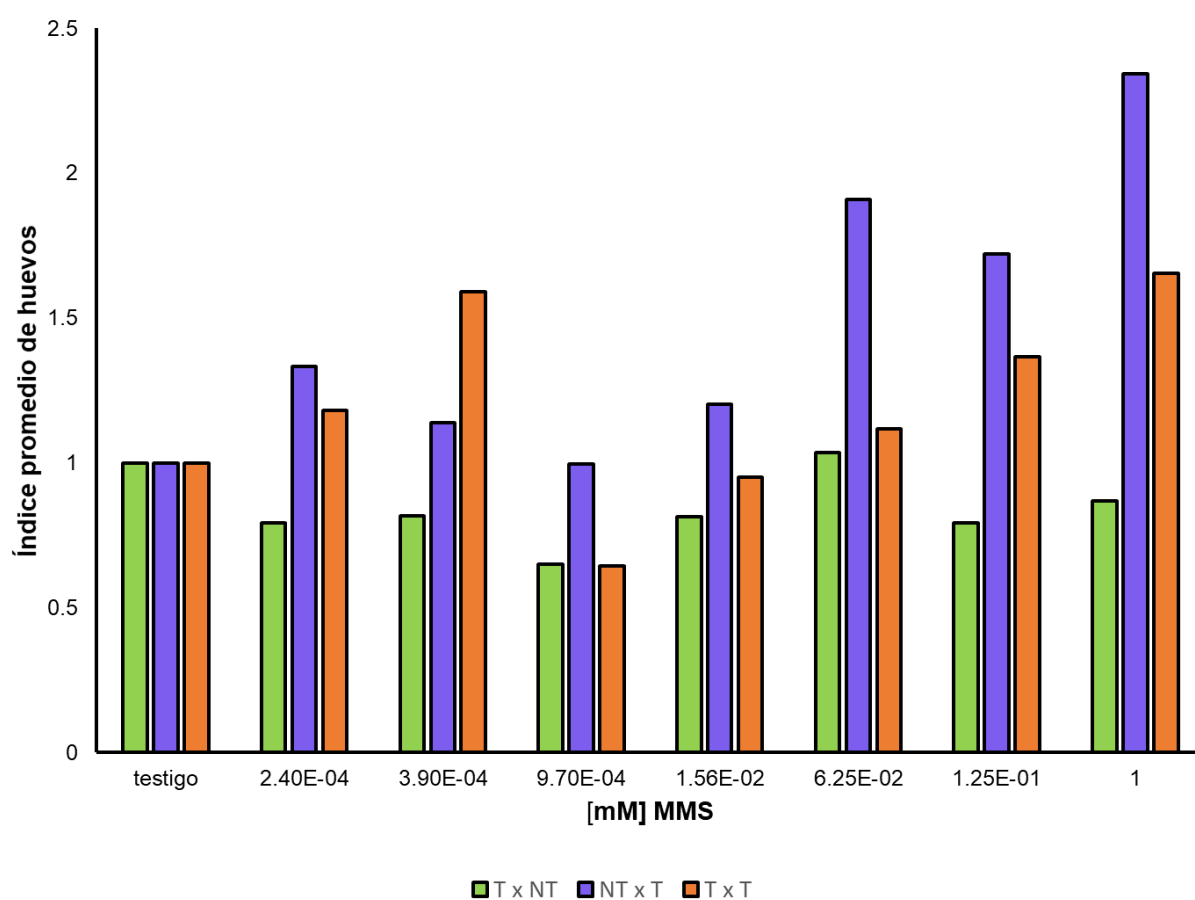


Figura 4.8. Comparación del índice de huevos de los diferentes esquemas de cruza. T x NT (♀ tratadas), NT x T (♂ tratadas) y T x T (ambos tratados).

Estos resultados sugieren que la cantidad de huevos ovopositados por las hembras es diferente dependiendo de si el progenitor expuesto fue la hembra, el macho con el que se cruzó o ambos progenitores. Posteriormente se evaluó la cantidad de progeñe adulta recobrada en los tubos en los que se contó el número de huevos. La progeñe adulta promedio no mostró diferencias significativas respecto a su testigo en la prueba de ANOVA de una vía en ninguno de los esquemas de cruz a (Tabla 5).

No obstante, en la figura 4.7 se muestra que la progenie adulta promedio recobrada en las diferentes concentraciones de la cruce T x NT presentó una tendencia a ser menor en todas las concentraciones de MMS respecto a su testigo. En la cruce NT x T, en la mayoría de las concentraciones se obtuvo mayor cantidad de progenie adulta promedio que en el testigo, excepto en la concentración 9.7 E-04mM. Las concentraciones 1.25 E-01 mM y 1 mM exclusivamente se recobró progenie adulta de una hembra.

Para la cruce T x T en las dos concentraciones más bajas 2.4 E-04 mM y 3.9 E-04 mM se incrementó la cantidad de progenie en comparación con su testigo. Mientras que en la concentración superior inmediata 9.7 E-04 mM la cantidad de progenie fue menor que la del testigo y a partir de esa concentración la cantidad de progenie fue mayor conforme aumentaba la concentración de MMS hasta la concentración más alta 1 mM, en la cual no se recobró progenie adulta (Fig.4.7).

En la figura 4.9 se compara la cantidad de progenie adulta de los tres sistemas de cruce, únicamente de las concentraciones en las que se recobró progenie de más de una hembra, mediante el índice de progenie adulta. En las concentraciones más bajas 2.4 E-04 mM, 3.9 E-04 mM y 1.56 E-02 mM la cantidad de progenie obtenida en la cruce donde las progenitoras hembras fueron tratadas fue menor que la cantidad de progenie adulta de las cruces donde el macho fue expuesto (NT x T y T x T).

Con la cantidad total de huevos y total de adultos recobrados en el testigo y en cada concentración se estimó la viabilidad huevo-adulto, la tabla 5 muestra el porcentaje de viabilidad de la progenie de los tres esquemas de cruce. Cuando las hembras fueron tratadas con MMS, la viabilidad disminuyó significativamente con respecto a su testigo en las concentraciones 1.56 E-02 mM y 6.25 E-02 mM ($p < 0.05$) mientras que en la concentración 1.25 E-01 mM la viabilidad fue mayor, respecto a su testigo ($p < 0.05$).

Para la cruce de NT x T, la viabilidad disminuyó significativamente en las concentraciones más altas, de 1.56 E-02 mM a 1 mM, en comparación con su testigo ($p < 0.05$). En la cruce en la que ambos progenitores fueron expuestos, la viabilidad fue del 0 % en la concentración más alta (1mM), es decir, de los huevos ovopositados ninguno completó su desarrollo a adulto y en las concentraciones 6.5 E-02 mM y 1.25 E-1 mM la viabilidad fue significativamente menor que la viabilidad del testigo ($p < 0.05$).

Al comparar la viabilidad de la progenie de los diferentes esquemas de cruce se encontró una respuesta diferencial dependiendo el progenitor que fue expuesto, esta diferencia fue más evidente y estadísticamente significativa en las concentraciones más altas, siendo las cruces en los que el progenitor macho fue expuesto a MMS las afectadas (Fig.4.10).

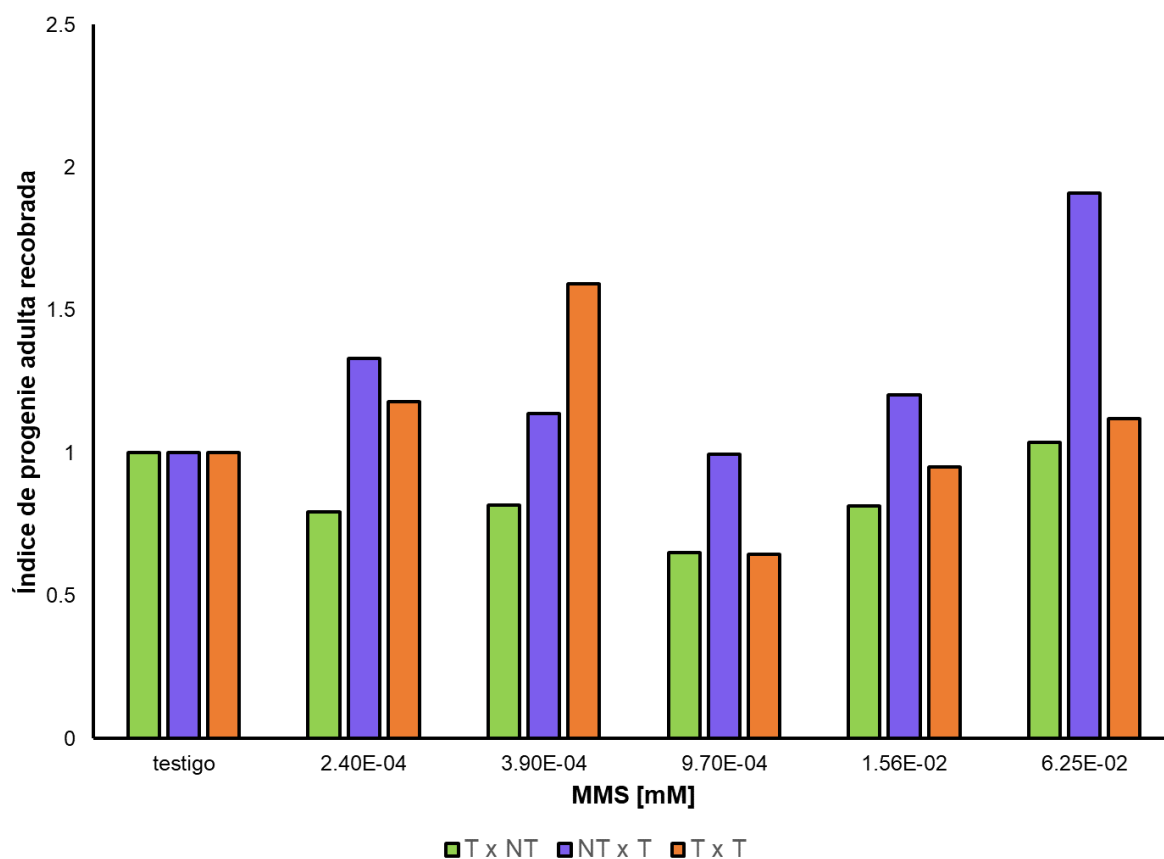


Fig. 4.9 Comparación del índice promedio de la cantidad de progenie adulta de los diferentes esquemas de cruza. T x NT (♀ tratadas), NT x T (♂ tratadas) y T x T (ambos tratados).

La reducción de la viabilidad implica la pérdida de individuos durante el desarrollo, por lo que se calculó el número de organismos que no completaron su desarrollo para las diferentes concentraciones de MMS. En la cruce T x NT no se encontraron diferencias significativas respecto a su testigo. En la cruce NT x T, la cantidad de individuos que no completaron su desarrollo se incrementó a partir de la concentración 9.7 E-04 mM en comparación con su testigo, pero únicamente fue estadísticamente significativa en la concentración 1.25 E-01 mM ($F_{7,165}=4.22$; $p=0.003$; Tukey=0.0052). Para la cruce T x T la pérdida de organismos fue estadísticamente mayor en la concentración 1 mM en comparación con su testigo ($F_{7,165}=4.22$, $p=0.003$; Tukey=0.0038).

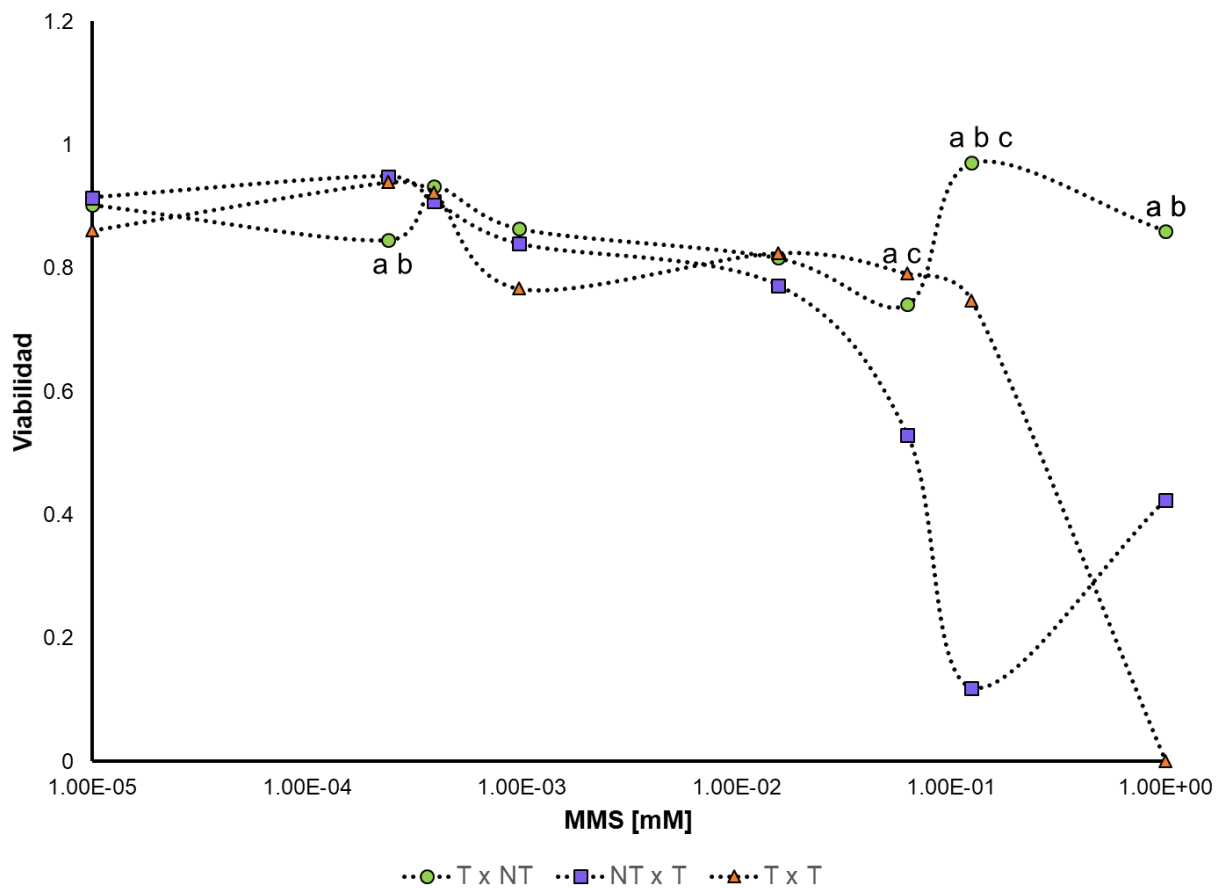


Fig. 4.10 Comparación del promedio de la viabilidad en los diferentes esquemas de cruza. T x NT (♀ tratadas), NT x T (♂ tratadas) y T x T (ambos tratados), □ en escala logarítmica. La letra a indica diferencias significativas entre la cruce T x NT y NT x T; b, indica diferencias significativas entre la cruce T x NT y T x T; c, indica diferencias significativas entre la cruce NT x T y T x T. En todos los casos se utilizó la prueba de Z para proporciones, $P < 0.05$.

En la figura 4.11 se compara el promedio del número de organismos no viables, en esta imagen se observa que la pérdida de organismos fue mayor en las concentraciones más altas de MMS cuando los individuos eran descendientes de las cruza en las que los machos fueron expuestos, que cuando los individuos provenían de la cruce en la que solo las hembras fueron expuestas.

Se encontraron diferencias significativas entre las cruza Tx NT y NT x T en las concentraciones más altas: 1.25 E-01 mM y 1 mM ($F_{14,165}=2.586$, $p=0.0021$; Tukey=0.0008; Tukey=0.0228). También se obtuvieron diferencias entre las cruza T x NT y T x T en la concentración más alta 1 mM ($F_{14,165}=2.586$, $p=0.0021$; $q=0.0013$). Entre las cruza NT x T y T x T hubo diferencias significativas en las concentraciones 6.25 E-02 mM y 1.25 E-01 mM ($F_{14,165}=2.586$, $p=0.0021$; Tukey=0.0102; Tukey=0.0327).

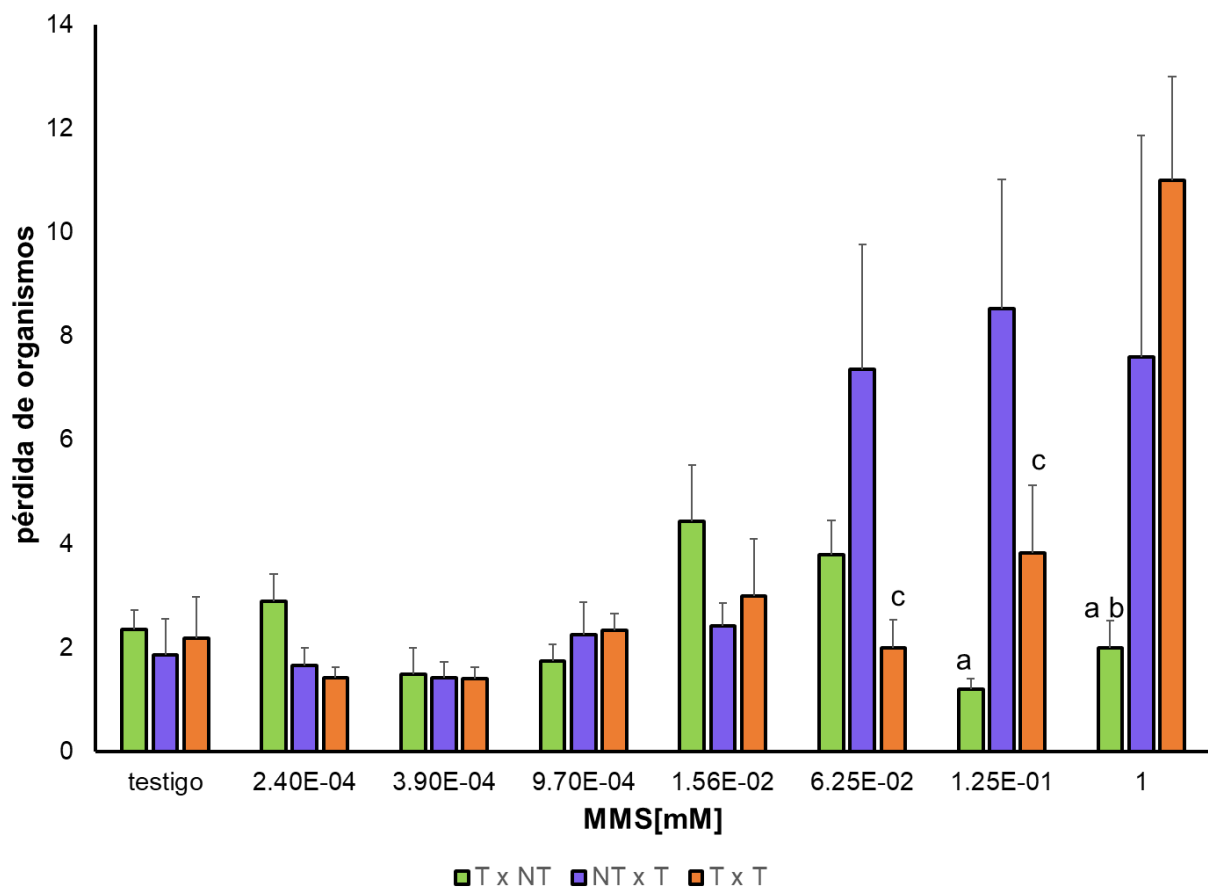


Fig. 4.11 Comparación de la pérdida de organismos durante el desarrollo huevo-adulto de los diferentes esquemas de cruce. del promedio de la viabilidad en los diferentes esquemas de cruces: T x NT (♀ tratadas), NT x T (♂ tratadas) y T x T (ambos tratados). La letra a indica diferencias significativas entre la cruce T x NT y NT x T; b, indica diferencias significativas entre la cruce T x NT y T x T; c, indica diferencias significativas entre la cruce NT x T y T x T. En todos los casos se utilizó la prueba de ANOVA de dos vías $p=0.0021$.

V. Protocolo 2. Exposición indirecta.

5.1. Método del Protocolo 2.

Para evaluar si la exposición indirecta, cuando las células germinales de las moscas F_1 no se forman ni maduran en presencia del compuesto, pero sí las células germinales de los progenitores que les dieron origen (hembras o machos), modifica la capacidad reproductiva y el proceso de la recombinación de las hembras F_1 , se realizó el segundo protocolo, en el que el tratamiento con MMS se dio a los progenitores de las moscas F_1 .

5.1.1 Administración del tratamiento

El tratamiento de los progenitores también se administró a larvas de tercer estadio. Para obtener las larvas progenitoras utilizadas en el tratamiento con una edad semejante, se hizo la cruce progenitora con hembras vírgenes silvestres $w^+ m^+ / w^+ m^+$ y machos silvestres $w^+ m^+ / Y$, a los tres días de realizada la cruce se transfirió a los progenitores a frascos con medio de cultivo fresco por un periodo de 8 hr, retirándolos posteriormente. A partir de los huevos colectados se obtuvieron larvas de 72 ± 4 horas que se extrajeron por el método de Nöthinger (1970). Posteriormente las larvas fueron asignadas al azar a las series testigo y experimentales del tratamiento.

Las concentraciones utilizadas de cada compuesto fueron las mismas que las empleadas en el protocolo 1. De las diluciones realizadas se tomaron 4.5ml por cada concentración que se mezclaron con 1g de medio instantáneo (Carolina Biological Supply) contenido en tubos homeopáticos, en cada tubo se colocaron aproximadamente 100 larvas de 72 horas de edad donde permanecieron hasta el periodo de pupación (donde no ingiere alimento), sometiéndose a un tratamiento subcrónico vía alimentación (72X48 h). Por cada concentración se realizaron tres réplicas.

5.1.2. Esquemas de cruce de las moscas progenitoras expuestas a MMS y de su progenie F_1 .

De las moscas silvestres emergidas del tratamiento se seleccionaron al azar 15 ♀♀ vírgenes y 15 ♂♂ que se cruzaron respectivamente con machos y hembras no tratados con ojos blancos y alas reducidas en una proporción 1:1. Para obtener dos esquemas de tratamiento (Fig.5.1):

- ❖ Hembras progenitoras silvestres tratadas X machos progenitores mutantes no tratados ($T_P \times NT_P$). Las células germinales de las moscas F_1 no son expuestas, pero si las células germinales de la línea materna que les dieron origen.
- ❖ Hembras progenitoras mutantes no tratadas X machos progenitores silvestres tratados ($T_P \times NT_P$). Las células germinales de las moscas F_1 no son expuestas, pero si las células germinales de la línea paterna que les dieron origen.

Para cada esquema de cruce se realizaron 15 cruces individuales para cada una de las concentraciones de MMS. De la progenie F_1 obtenida se cuantificó el número de parejas que tuvieron hijos (fertilidad), y la cantidad de progenie registrando de número de hembras y machos.

Para obtener la segunda generación (F_2), de cada F_1 se seleccionaron cinco familias aleatoriamente, por cada familia se sembraron individualmente cinco parejas de hermanos para tener 25 familias por concentración. Al obtener la F_2 , se contó el número de parejas que tuvieron hijos para estimar la fertilidad, y la cantidad de progenie que tuvo cada pareja, registrando sexo y fenotipo, con los que se calculó la proporción sexual y el tipo y cantidad de gametos producidos a través de la frecuencia de recombinación.

Con la finalidad de que en ambos esquemas de tratamiento los organismos expuestos fueran silvestres, cuando se cruzaron las hembras progenitoras se utilizó el sistema de cruce descrito en la figura 3.3, cuando machos progenitores fueron los expuestos se empleó la cruce recíproca (R) de la cruce progenitora descrita en la figura 5.2. En la cual se cruzan ♀♀ wm / wm y ♂♂ w^+m^+ / Y , que produce hembras dihíbridas w^+m^+ / wm y machos hemicigotos pero para los alelos mutantes wm / Y . Por lo tanto, en la progenie F_2 , se obtienen los cuatro fenotipos tanto en hembras como en machos (Fig. 5.2).

Con fines comparativos en ambos casos solo se utilizaron los machos para calcular la frecuencia de recombinación.

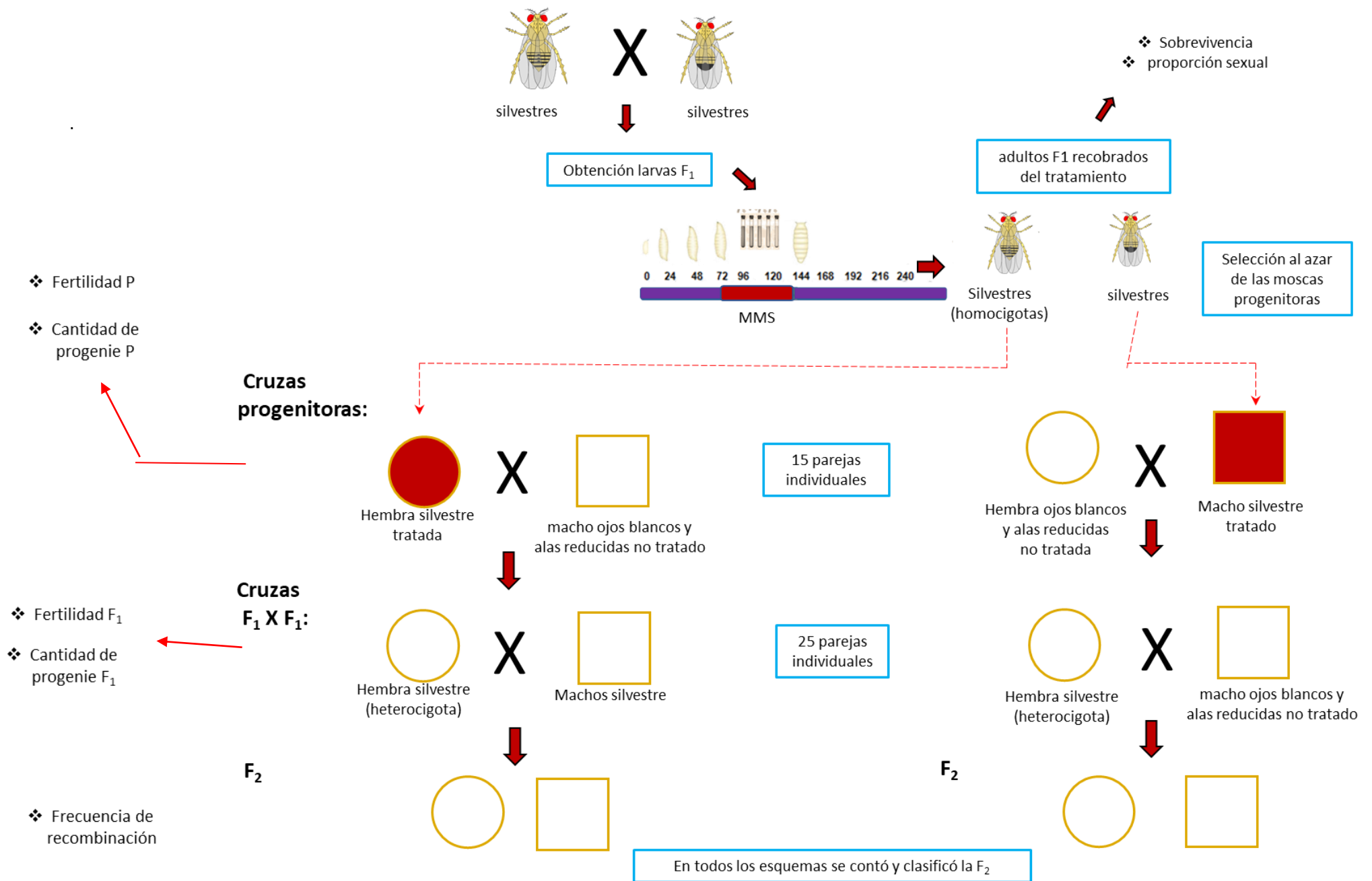


Fig.5.1 Protocolo 2. Tratamiento y esquemas de cruce para la exposición indirecta de las células germinales F₁.

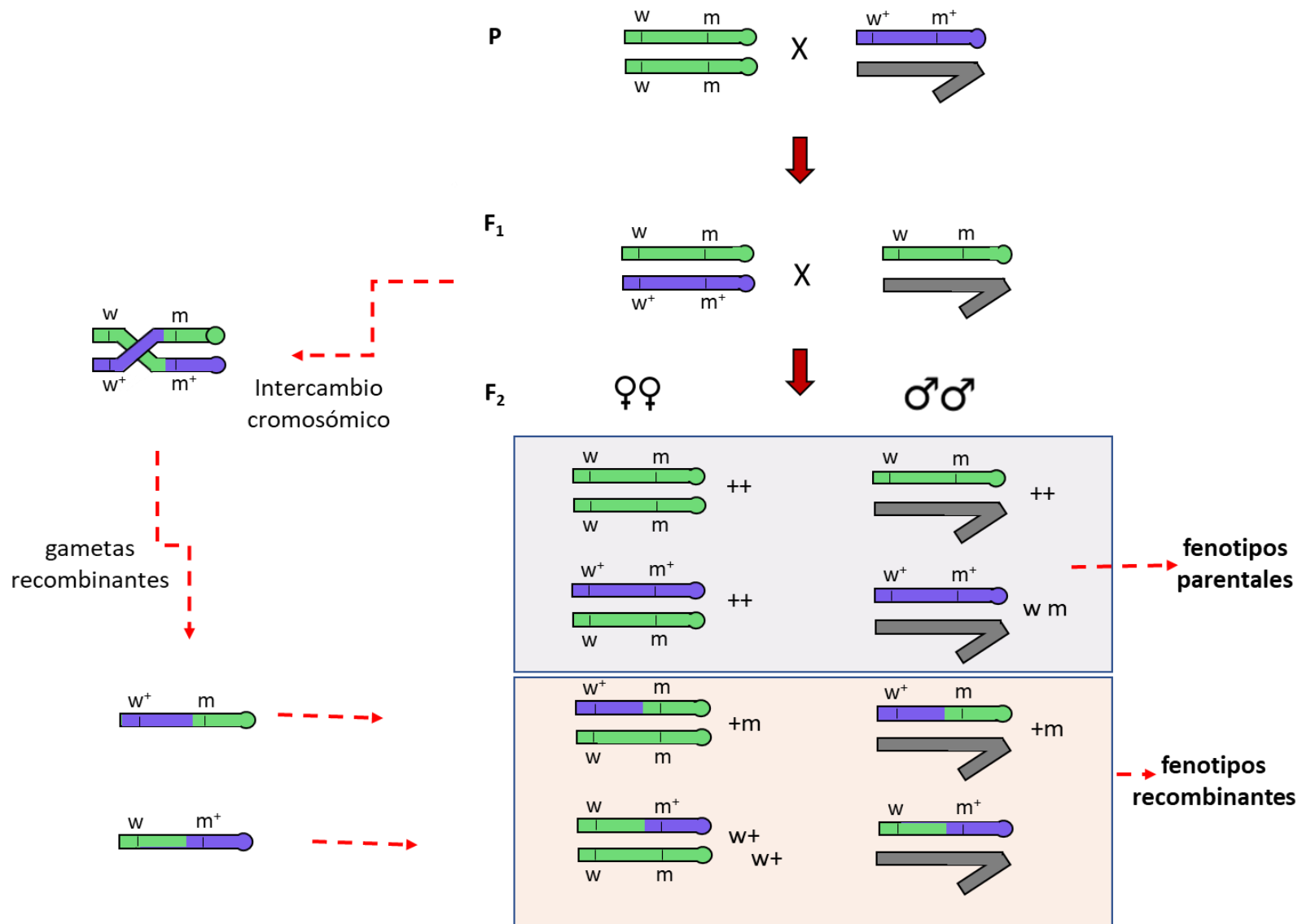


Fig. 5.2. Cruza progenitora recíproca.

5.2 Resultados del Protocolo 2.

En esta sección, en primer lugar, se presenta el efecto tóxico del MMS de los organismos progenitores expuestos obtenido a partir de los biomarcadores de sobrevivencia (S) y la proporción sexual (Psx), después se muestra si los organismos recobrados del tratamiento presentaron alguna alteración en su capacidad reproductiva utilizando biomarcadores de toxicidad reproductiva de fertilidad (F) y cantidad de progenie por pareja (PP). Posteriormente, se muestran los resultados de la capacidad reproductiva de la progenie F₁, cuyas células germinales no estuvieron en exposición directa a MMS, pero sí las células germinales de sus progenitores hembra o macho. Finalmente, se describen los resultados obtenidos de la frecuencia de recombinación (Fr) germinal estimada a partir de la descendencia F₂.

5.2.1 Toxicidad de las moscas progenitoras expuestas a MMS

Las concentraciones de 5 mM y 10 mM de MMS fueron letales. En las concentraciones en las que se recobraron adultos, la sobrevivencia no presentó diferencias significativas respecto a su testigo ($F_{7,40}=1.95$; $p=0.0865$), no obstante, en parte superior de la figura 5.3 se muestra que la sobrevivencia en todas las concentraciones de MMS mostró una tendencia a ser menor que el testigo. Respecto a la proporción sexual de las moscas recobradas tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($F_{7,40}=0.87$ $p=0.867$), aunque como se muestra en la parte inferior de la figura 5.3 en todas las concentraciones menores a 1mM se encontró una tendencia a recobrar más machos que hembras.

Tabla 6. Sobrevivencia y Proporción sexual de las moscas expuestas a MMS.

[mM]	n	moscas	S ± ee	f	Psx ♀ ± ee	Psx ♂ ± ee	f
testigo	6	358	59.67 ± 7.57	-	0.47 ± 0.03	0.53 ± 0.03	-
2.40E-04	6	235	39.17 ± 5.02	-	0.47 ± 0.05	0.53 ± 0.05	-
3.90E-04	6	230	38.33 ± 7.49	-	0.50 ± 0.03	0.50 ± 0.03	-
9.70E-04	6	336	56.00 ± 10.9	-	0.44 ± 0.01	0.56 ± 0.01	-
1.56E-02	6	245	40.83 ± 6.01	-	0.48 ± 0.03	0.52 ± 0.03	-
6.25E-02	6	226	37.67 ± 6.49	-	0.49 ± 0.03	0.51 ± 0.03	-
1.25E-01	6	279	46.50 ± 7.21	-	0.43 ± 0.03	0.57 ± 0.03	-
1.00E+00	6	177	29.50 ± 5.35	-	0.53 ± 0.05	0.47 ± 0.05	-
5.00E+00	6	0					
1.00E+01	6	0					

S, sobrevivencia; Psx ♀, proporción sexual de hembras recobradas; Psx ♂, proporción sexual de machos recobradas; ee, error estándar; f, prueba estadística de ANOVA 1 vía; *. indica diferencias significativas respecto al testigo.

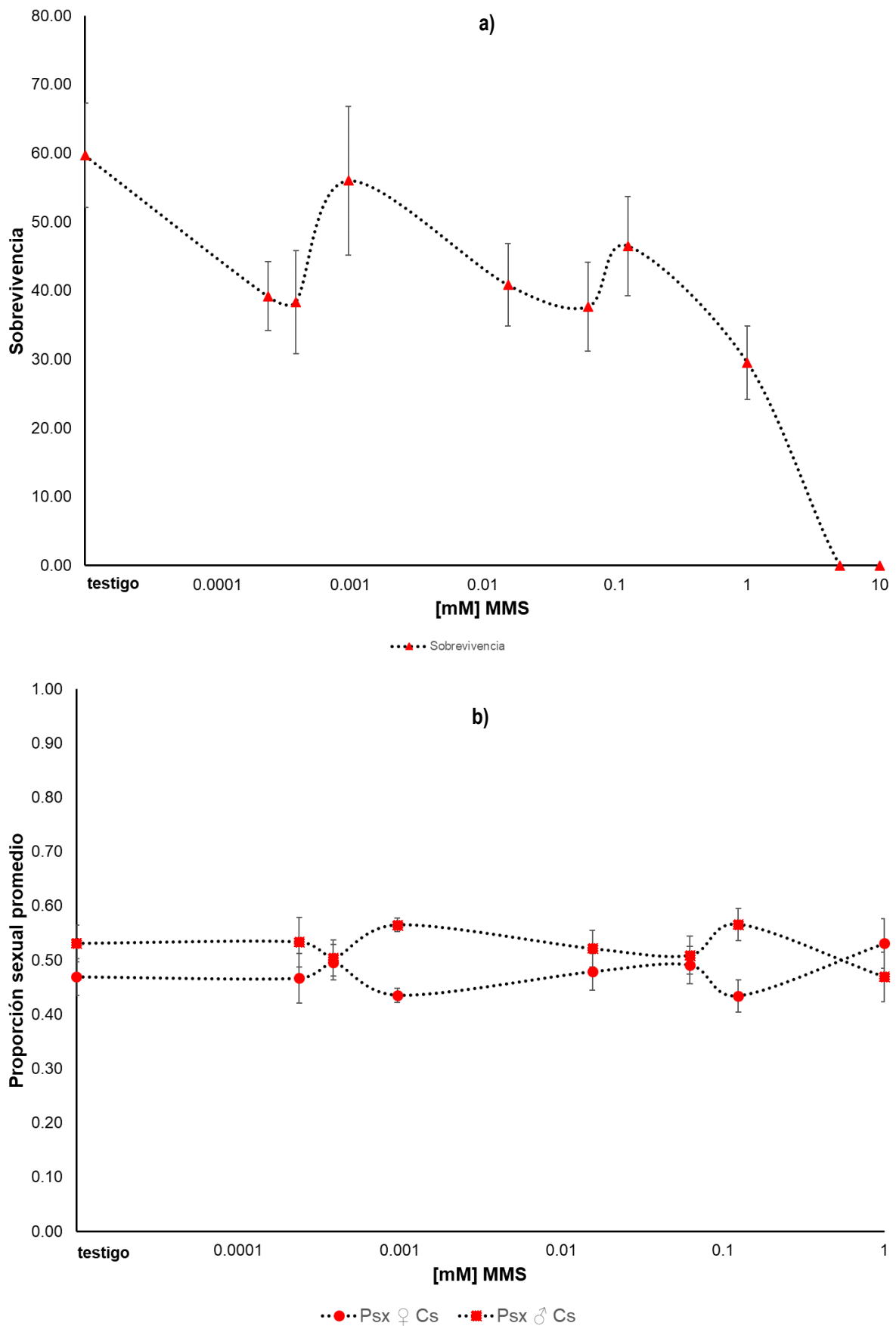


Fig. 5.3 a), sobrevivencia promedio de las moscas silvestres expuestas a MMS. b), proporción sexual de las moscas recobradas de la exposición a MMS. En ambas gráficas la [] está en escala logarítmica.

5.2.2 Capacidad reproductiva de las moscas progenitoras expuestas a MMS

La finalidad de evaluar cómo se afectó la capacidad reproductiva de las progenitoras recobradas del tratamiento con MMS se realizaron dos esquemas de cruza: solo hembras tratadas (T X NT), y únicamente machos tratados (NT X T). En la tabla 7 se muestran los biomarcadores de fertilidad y cantidad de progenie promedio que valoran si la capacidad reproductiva de las moscas fue afectada por el tratamiento.

Tabla 7. Capacidad reproductiva de las moscas F₀ expuestas a MMS.

Esquema de Cruza	MMS [mM]	n	F	d	Total de moscas	PP ± ee	f	Psx ♀ ± ee	f	Psx ♂ ± ee	f
♀ x ♂ T x NT	testigo	15	0.73	-	921	83.73 ± 4.99	-	0.49 ± 0.01		0.51 ± 0.01	
	2.40E-04	15	0.87	-	1053	81.00 ± 7.81	-	0.51 ± 0.01		0.49 ± 0.01	
	3.90E-04	15	0.87	-	1180	90.77 ± 6.91	-	0.55 ± 0.03		0.45 ± 0.03	
	9.70E-04	15	1.00	*	1075	71.67 ± 5.40	-	0.46 ± 0.02		0.54 ± 0.02	
	1.56E-02	15	0.80	-	1116	93.00 ± 6.52	-	0.50 ± 0.02		0.50 ± 0.02	
	6.25E-02	15	0.87	-	784	60.31 ± 10.52	-	0.57 ± 0.04		0.43 ± 0.04	
	1.25E-01	15	0.87	-	1148	88.31 ± 9.64	-	0.48 ± 0.05		0.52 ± 0.05	
	1.00E+00	7	0.86	-	444	74.00 ± 13.49	-	0.55 ± 0.04		0.45 ± 0.04	
♀ x ♂ NT x T	testigo	15	0.93	-	1429	102.07 ± 5.48	-	0.49 ± 0.01		0.51 ± 0.01	
	2.40E-04	15	0.93	-	1188	84.86 ± 4.27	-	0.51 ± 0.01		0.49 ± 0.01	
	3.90E-04	15	0.93	-	1077	76.93 ± 8.90	*	0.58 ± 0.04	*	0.42 ± 0.04	*
	9.70E-04	15	1.00	-	1204	80.27 ± 4.51	-	0.49 ± 0.02		0.51 ± 0.02	
	1.56E-02	15	0.87	-	1127	86.69 ± 4.56	-	0.49 ± 0.01		0.51 ± 0.01	
	6.25E-02	15	0.87	-	989	76.08 ± 8.72	*	0.50 ± 0.02		0.50 ± 0.02	
	1.25E-01	15	0.87	-	901	69.31 ± 6.84	*	0.52 ± 0.02		0.48 ± 0.02	
	1.00E+00	11	0.55	*	223	37.17 ± 11.65	*	0.49 ± 0.03		0.51 ± 0.03	

n, número de parejas; F, fertilidad; PP, progenie promedio por pareja; Psx ♀, promedio de la proporción sexual de hembras en la progenie F₁; Psx ♂, promedio de la proporción sexual de machos en la progenie F₁; ee, error estándar; d, prueba de Z para proporciones; d, prueba de ANOVA de una vía. El * indica diferencias significativas respecto a su testigo.

En la cruce T x NT, la concentración 9.7 E-04 mM mostró diferencias significativas en la fertilidad con respecto a su testigo (p<0.05). Sin embargo, la cantidad de progenie promedio por pareja no mostró diferencias significativas en ninguna concentración (F=7,88=1.99; p=0.0649); así como la proporción sexual de la progenie F₁ (F=7,88=1.734; p=0.111).

Para la cruce NT x T, la fertilidad disminuyó en la concentración de 1mM (p<0.05) y en el caso de la cantidad de progenie por pareja mostró una tendencia a ser menor en todas las concentraciones, pero únicamente las concentraciones 3.9 E-04 mM, 6.2 E-02 mM, 1.25 E-01 mM y 1 mM presentaron diferencias significativas en comparación a su testigo (F=7,94=5.116; p<0.0001; Tukey, p<0.05). La

proporción sexual de la progenie F_1 se afectó en la concentración $3.9E-4mM$ de MMS ($F=_{7,88}=2.284$; $p=0.0341$) y favoreció a las hembras.

En la figura 5.4 se muestra la comparación entre el índice de fertilidad de las moscas expuestas a MMS, la fertilidad de la cruce en la que la hembra fue expuesta presenta una tendencia a ser mayor en todas las concentraciones de MMS que la fertilidad de la cruce en la que únicamente los machos fueron expuestos.

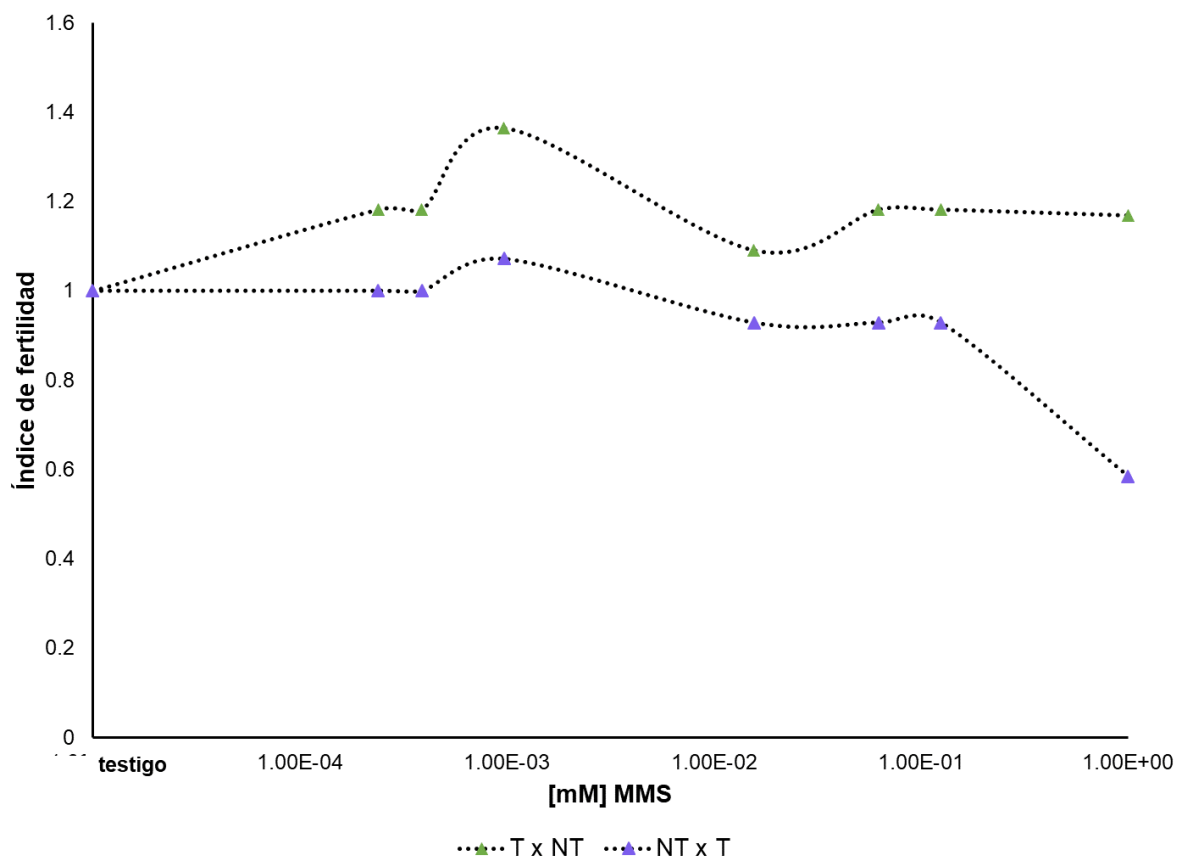


Fig. 5.4 Índice de fertilidad de las moscas P expuestas a MMS de cada esquema de cruce: T x NT (♀ tratadas) y NT x T (♂ tratadas), [] en escala logarítmica.

Para comparar la cantidad de progenie promedio de los dos esquemas de cruce se utilizó la diferencia de la progenie promedio de cada concentración y su testigo. En la figura 5.5 se muestra que la diferencia de la progenie promedio obtenida cuando las hembras progenitores fueron expuestas a MMS presenta fluctuaciones, en algunas concentraciones de MMS la diferencia es positiva porque se recobró mayor cantidad de progenie que en el testigo y en otras concentraciones es negativa.

En cambio, cuando los machos progenitores se trataron con MMS, la diferencia de la cantidad de progenie fue negativa en todas las concentraciones de MMS, es decir, que en todas las concentraciones se recobró menos progenie que en el testigo, esta diferencia fue más evidente en las dos concentraciones más altas, como se representa en la figura 4.13. Así mismo estas dos concentraciones exhiben una respuesta diferencial dependiendo si el progenitor expuesto son las hembras o son los machos, ya que en la cruce NT x T la cantidad de progenie se aleja más de el promedio de su testigo, mientras que la cruce T x NT se mantiene alrededor del promedio.

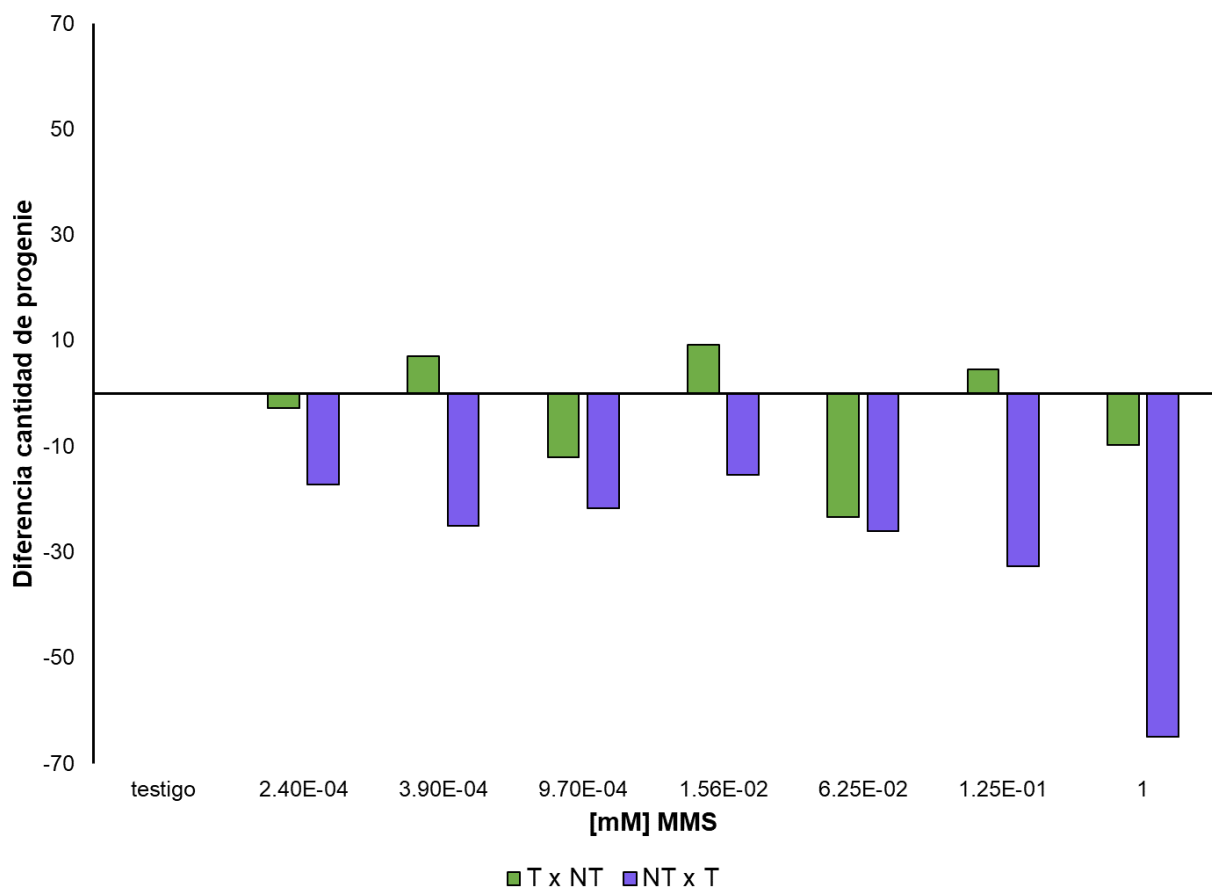


Fig. 5.5 Diferencia de la cantidad de progenie promedio por pareja de las moscas progenitoras expuestas a MMS para cada esquema de cruce: T x NT (♀ tratadas), NT x T (♂ tratadas).

5.2.3 Capacidad reproductiva de las moscas F₁ no expuestas provenientes de hembras o machos expuestos a MMS

Con el objetivo de evaluar cómo se afectó la capacidad reproductiva de las moscas F₁ no expuestas a MMS, pero cuyos progenitores hembras o machos fueron expuestos durante la etapa larvaria a MMS, se cruzó la F₁ proveniente de cada esquema de cruce: solo hembras tratadas (T X NT), y solo machos tratados (NT X T). En la tabla 8 se muestran los biomarcadores de fertilidad y cantidad de progenie promedio.

Tabla 8. Capacidad reproductiva de las moscas F₁ provenientes de progenitores expuestos a MMS.

Esquema de Cruza	MMS [mM]	n	F	d	Total de moscas	PPF ± ee	f	Psx ♀ ± ee	α	Psx ♂ ± ee	f
♀ ♂ T X NT	testigo	20	1.00	-	2051	102.55 ± 4.77	-	0.47 ± 0.01	-	0.53 ± 0.01	-
	2.40E-04	25	0.76	*	1801	94.79 ± 9.84	-	0.48 ± 0.02	-	0.52 ± 0.02	-
	3.90E-04	25	1.00	-	2291	91.64 ± 5.34	-	0.51 ± 0.02	-	0.49 ± 0.02	-
	9.70E-04	25	1.00	-	1710	68.40 ± 4.13	*	0.53 ± 0.01	*	0.47 ± 0.01	*
	1.56E-02	25	1.00	-	2604	104.16 ± 6.18	-	0.50 ± 0.01	-	0.50 ± 0.01	-
	6.25E-02	22	1.00	-	1909	86.77 ± 5.51	-	0.50 ± 0.01	-	0.50 ± 0.01	-
	1.25E-01	25	1.00	-	2326	93.04 ± 5.07	-	0.48 ± 0.01	-	0.52 ± 0.01	-
	1.00E+00	25	1.00	-	2664	106.56 ± 5.80	-	0.51 ± 0.01	-	0.49 ± 0.01	-
♀ ♂ NT X T	testigo	25	1.00	-	2007	80.28 ± 4.73	-	0.51 ± 0.01	-	0.49 ± 0.01	-
	2.40E-04	25	1.00	-	1894	75.76 ± 3.29	-	0.52 ± 0.01	-	0.48 ± 0.01	-
	3.90E-04	25	1.00	-	2145	85.80 ± 6.98	-	0.54 ± 0.02	-	0.46 ± 0.02	-
	9.70E-04	25	1.00	-	2269	90.76 ± 5.87	-	0.52 ± 0.01	-	0.48 ± 0.01	-
	1.56E-02	25	1.00	-	2462	98.48 ± 6.07	-	0.50 ± 0.01	-	0.50 ± 0.01	-
	6.25E-02	19	0.95	-	1543	85.72 ± 5.02	-	0.49 ± 0.01	-	0.51 ± 0.01	-
	1.25E-01	25	0.96	-	2337	97.38 ± 4.86	-	0.48 ± 0.01	-	0.52 ± 0.01	-
	1.00E+00	10	0.70	*	409	58.43 ± 11.91	-	0.50 ± 0.02	-	0.50 ± 0.02	-

n, número de pareja; F, fertilidad; PP, progenie promedio por pareja; Psx ♀, promedio de la proporción sexual de hembras en la progenie F₁; Psx ♂, promedio de la proporción sexual de machos en la progenie F₁; ee, error estándar; d, prueba de Z para proporciones; d, prueba de ANOVA de una vía. El * indica diferencias significativas respecto a su testigo.

La fertilidad de las moscas F₁ descendientes de hembras tratadas con MMS (T x NT) disminuyó en la concentración más baja 2.4 E-04 mM de MMS respecto a su testigo (p<0.05), mientras que en la concentración 9.7 E-04 mM se recobró menor cantidad de progenie promedio por pareja en comparación del testigo (F=7,178=4.596; p<0.0001; Tukey, p<0.05). Además, de la poca progenie recobrada en esta concentración la proporción de hembras recuperada fue mayor que la proporción de machos (K=8,156=14.93; p=0.0369; Dunnet= p<0.05).

En el caso de la progenie F_1 de la craza progenitora NT x T, en la cual, el macho progenitor fue expuesto, únicamente la fertilidad de la concentración más alta de MMS disminuyó significativamente respecto a su testigo ($p < 0.05$), la cantidad de progenie promedio por pareja y la proporción sexual de la progenie F_2 no mostraron cambios.

En la figura 5.6 se muestra que en la concentración más baja 2.4 E-04 mM y más alta 1 mM de MMS la fertilidad presentó diferencias dependiendo del sexo del progenitor expuesto. En la concentración 2.4 E-04 mM la fertilidad de las moscas F_1 cuya hembra progenitora fue expuesta fue menor que la fertilidad de las moscas F_1 provenientes de la craza en la que el progenitor macho fue expuesto. En cambio, en la concentración 1mM la fertilidad de las moscas F_1 descendientes de la craza NT x T se redujo significativamente respecto a la fertilidad de la progenie F_1 de la craza progenitora T x NT.

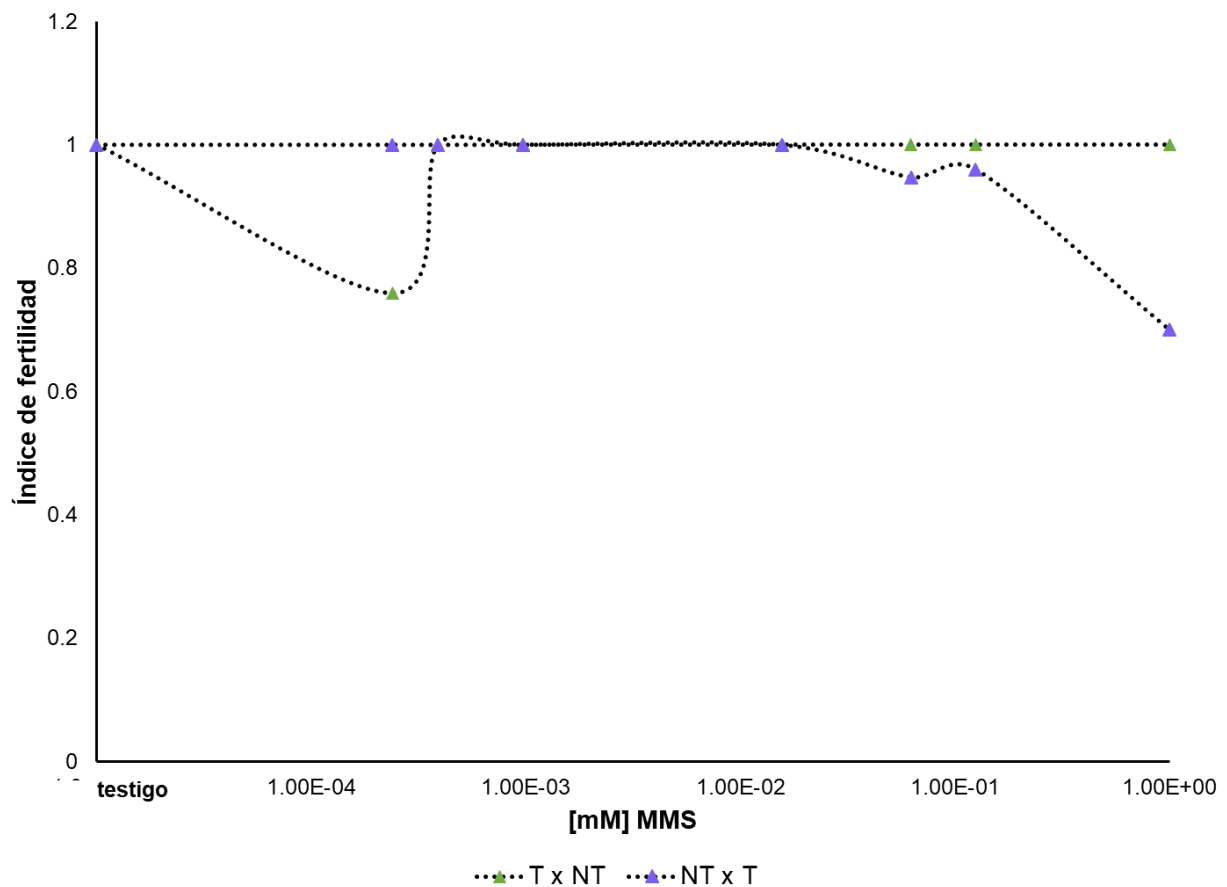


Fig. 5.6 Índice de fertilidad de las moscas F_1 no expuestas a MMS provenientes de la craza: T x NT (♀ progenitoras tratadas) y NT x T (♂ progenitores tratados). [] en escala logarítmica.

La descendencia promedio de la progenie F_1 no expuesta mostró una tendencia diferente dependiendo del progenitor que fue expuesto a MMS. En las moscas F_1 descendientes de hembras tratadas con MMS, el promedio de la progenie mostró fluctuaciones negativas en la mayoría de las concentraciones de MMS. En cambio, la cantidad de progenie de la progenie F_1 de machos expuesto a MMS presentó una tendencia a ser positiva en la mayoría de las concentraciones, como se puede apreciar en la figura 5.7.

En las figuras 5.8 y 5.9 se comparan los biomarcadores de la capacidad reproductiva de las moscas progenitoras expuestas al MMS y de la capacidad reproductiva de su progenie F_1 no expuesta directamente. Cuando la hembra progenitora fue tratada la fertilidad mostró una tendencia diferente que la fertilidad de su generación inmediata, la cual mostró una tendencia muy homogénea en la mayoría de las concentraciones y muy similar al testigo (Fig. 5.8 a). En cambio, en las moscas F_1 se recobró una menor cantidad de progenie en comparación con la progenie recobrada de las moscas progenitoras expuestas (Fig. 5.8 b).

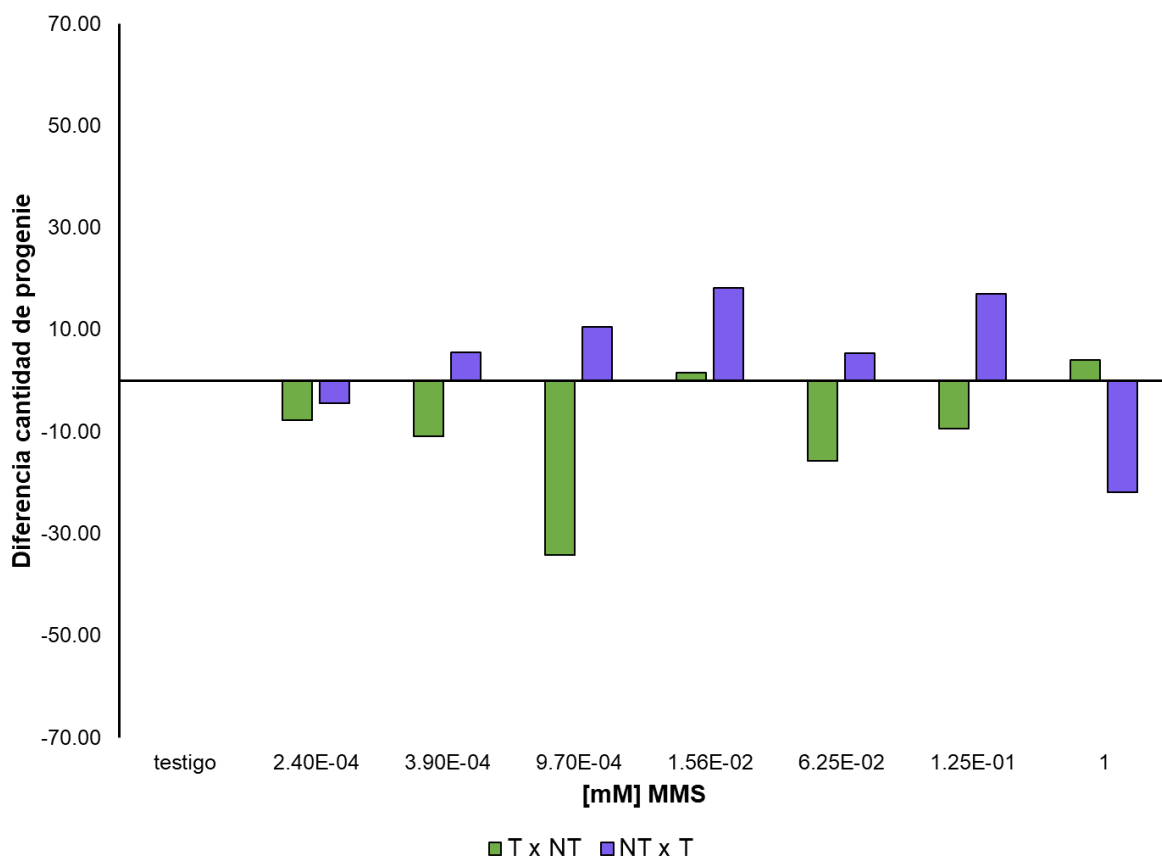


Fig. 5.7 Diferencia de la cantidad de progenie promedio por pareja de las moscas F_1 para cada esquema de cruce: T x NT (♀ tratadas), NT x T (♂ tratadas).

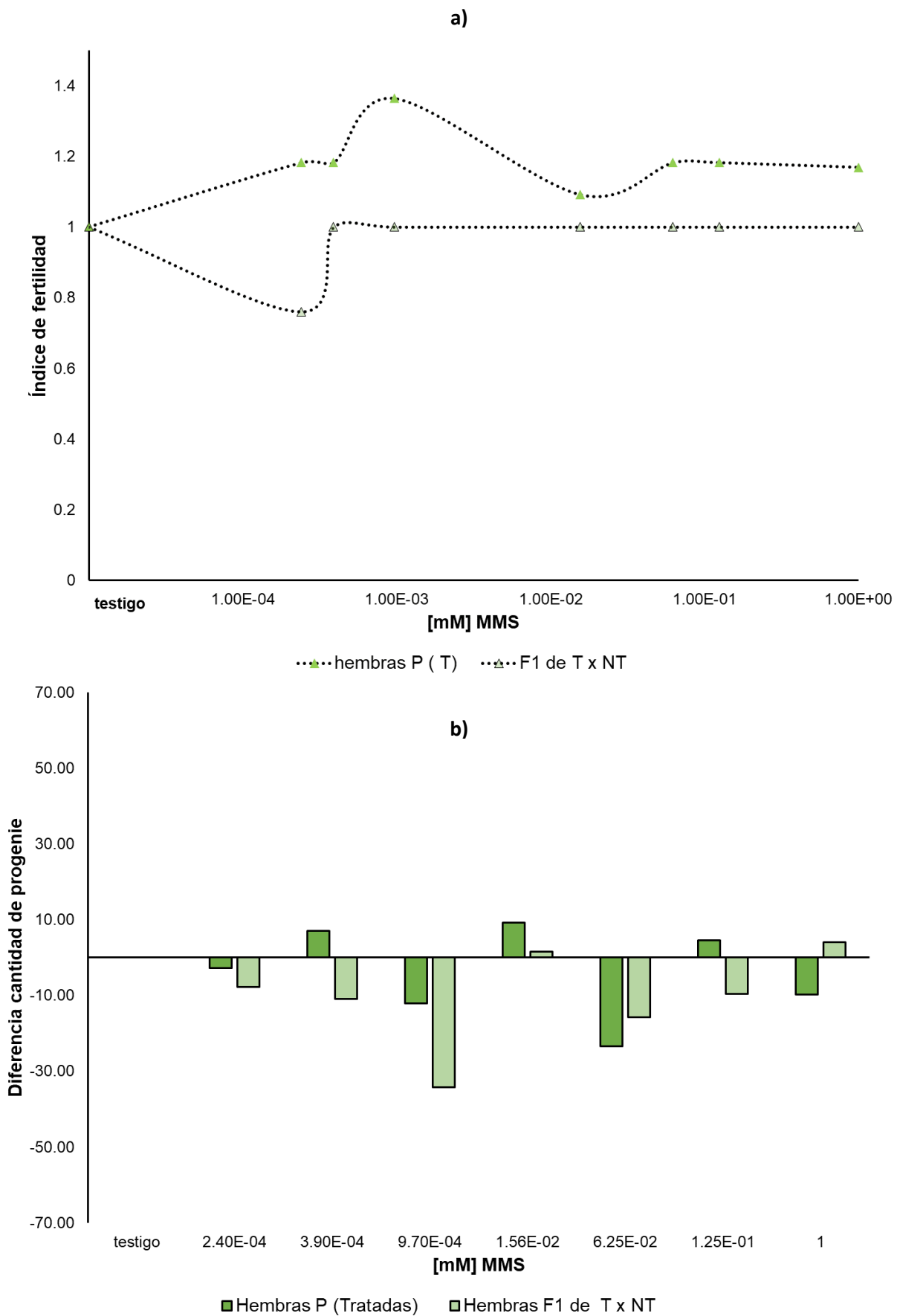


Fig. 5.8 Comparación de los biomarcadores de capacidad reproductiva de las hembras progenitoras expuestas a MMS y su progenie F₁. a) Fertilidad de las hembras tratadas con MMS y su progenie F₁, [] en escala logarítmica; b) Diferencia de la cantidad de progenie promedio de las hembras tratadas con MMS y

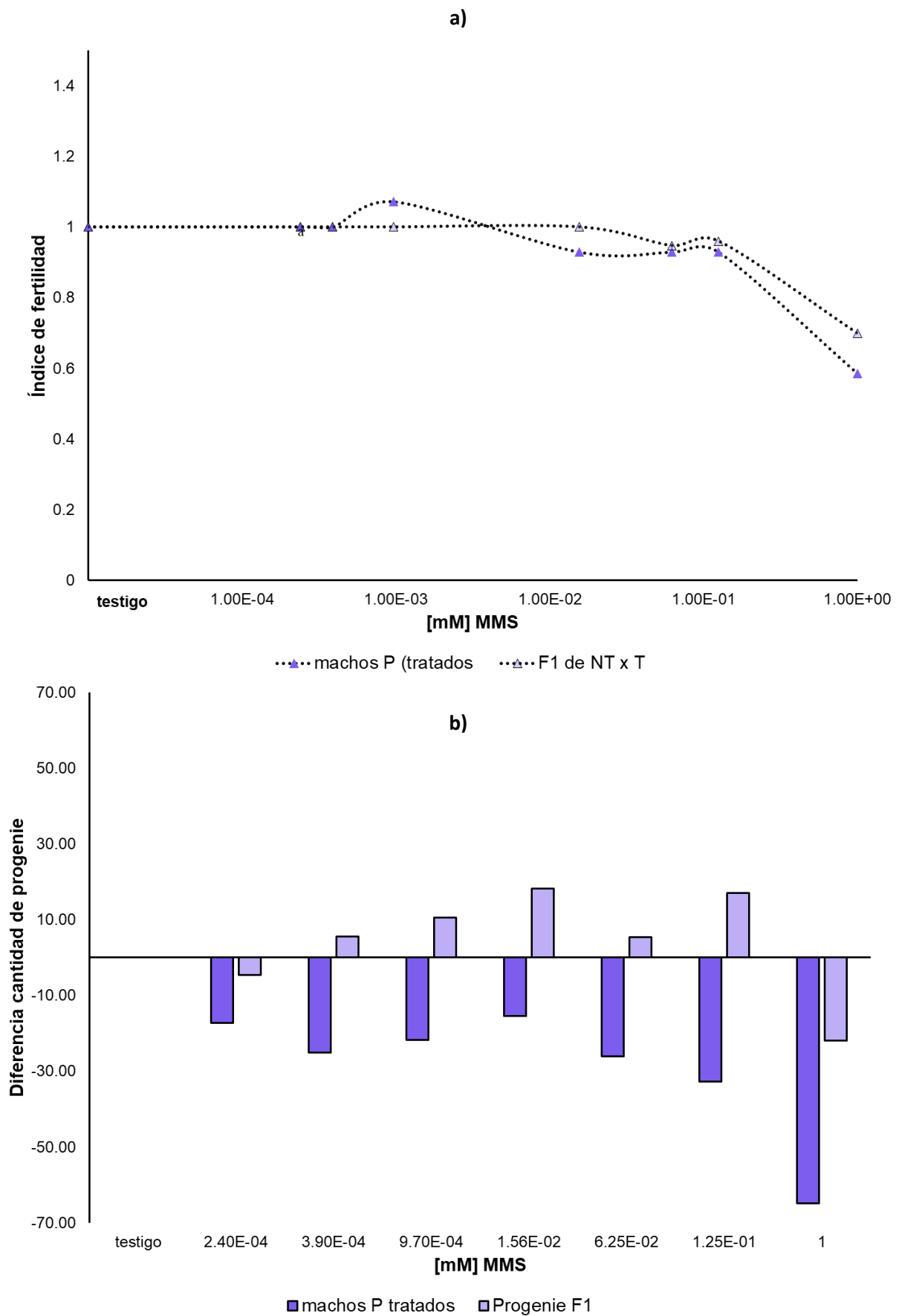


Fig. 5.9 Comparación de los biomarcadores de capacidad reproductiva de los machos progenitores expuestos a MMS y su progenie F₁. a) Fertilidad de los machos tratados con MMS y su progenie F₁, [] en escala logarítmica; b) Diferencia de la cantidad de progenie promedio de los machos tratados con MMS y su

Para el caso de los machos progenitores tratados y de su progenie F₁, la fertilidad fue similar y disminuyó en la concentración más alta en ambas generaciones, como se muestra en la figura 5.9 a. La cantidad de progenie de los progenitores expuestos y de su progenie F₁ mostró un comportamiento muy diferente entre las generaciones, cuando los machos fueron expuestos al compuesto la cantidad de progenie disminuyó en todas las concentraciones. Mientras que, en la siguiente generación, la cantidad de progenie se incrementó (Fig. 5.9 b).

5.2.4 Frecuencia de recombinación en las células germinales de las hembras F₁ hijas de hembras o machos tratados.

La frecuencia de recombinación de las células germinales de las hembras de la progenie F₁ de progenitores hembra o macho expuestos a MMS obtenidas a partir de la generación F₂ se muestran en la tabla 9. En la cruce T x NT la frecuencia de recombinación entre los genes *white-miniatura* fue menor en todas las concentraciones de MMS, esta diferencia fue estadísticamente significativa en el rango de concentraciones 3.9 E-04 mM, a 1.25E-01 mM de MMS (p<0.05).

En cambio, la cruce NT x T mostró más eventos de recombinación que el testigo en la mayoría de las concentraciones, estadísticamente significativas en las concentraciones 9.7 E-04 mM y 1.56 E-02 mM (p<0.05). En la concentración 1.25 E-01 mM se recobraron menos eventos de recombinación respecto al testigo (p<0.05).

Tabla 9. Frecuencia de recombinación germinal en las hembras de la progenie F₁ de parentales hembra o machos expuesto a MMS

MMS [mM]	♀ ♂ T x NT			♀ ♂ NT x T		
	n	Fr (w-m)	d	n	Fr (w-m)	d
testigo	1078	0.35	-	1004	0.22	-
2.40E-04	943	0.31	-	900	0.25	-
3.90E-04	1148	0.29	*	1036	0.26	-
9.70E-04	794	0.28	*	1095	0.29	*
1.56E-02	1308	0.30	*	1233	0.32	*
6.25E-02	959	0.29	*	789	0.22	-
1.25E-01	1198	0.31	*	1205	0.17	*
1.00E+00	1316	0.32	-	206	0.24	-

T x NT (♀ tratadas) y NT x T (♂ tratadas) Fr (w-m), frecuencia de recombinación entre los genes *white-miniatura*; d, prueba de z para proporciones; *, indica diferencias significativas respecto al testigo.

En la figura 5.10 se muestra que la frecuencia de recombinación de la cruce T x NT fue menor en comparación con la frecuencia de recombinación obtenida en la cruce NT x N, y que en esta cruce se tuvieron más eventos de recombinación que el testigo.

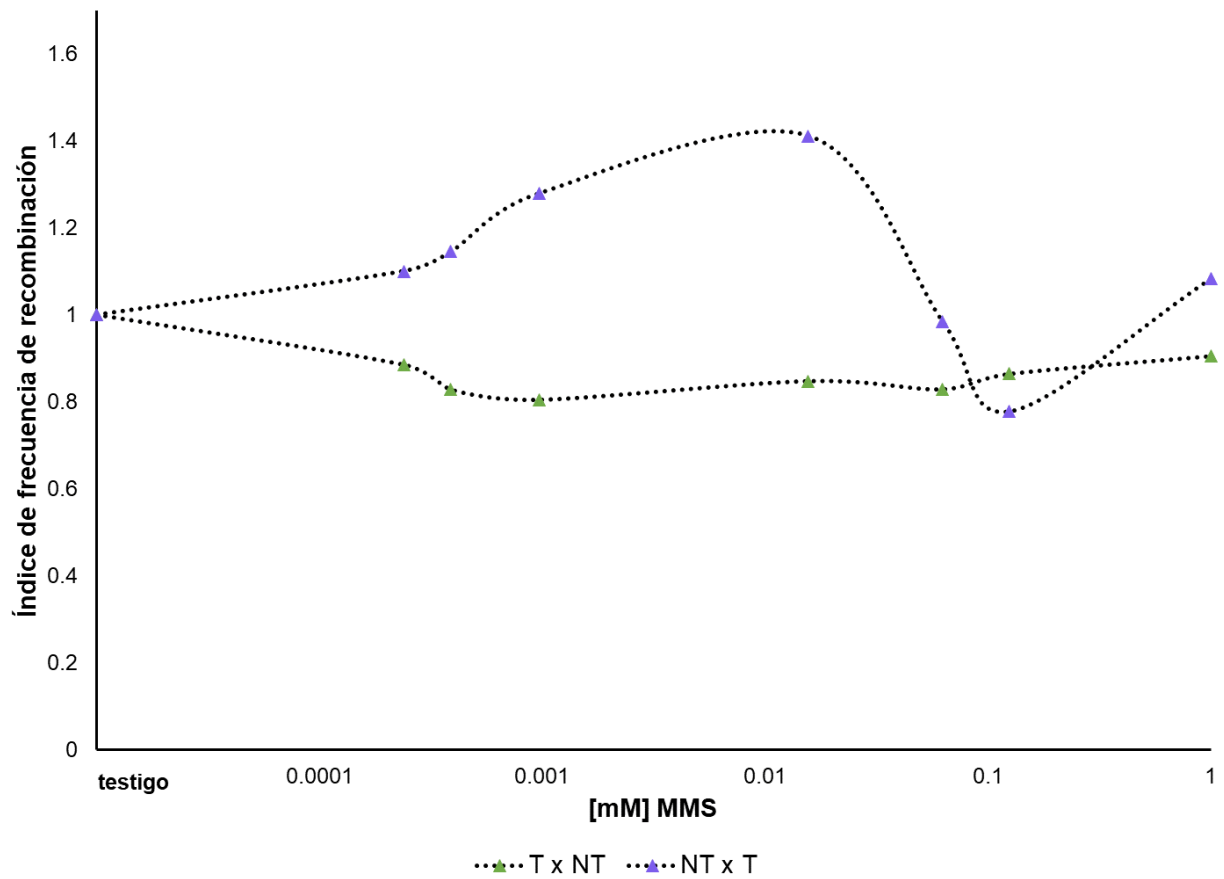


Figura 5.10. Frecuencia de recombinación de las hembras F_1 de cada esquema de cruce: T x NT (♀ tratadas) y NT x T (♂ tratados), [] en escala logarítmica.

5.3 Comparación de la exposición directa e indirecta de las células germinales de la línea materna y paterna.

Con la finalidad de comparar el efecto de la exposición directa, cuando la formación y maduración de las células germinales se lleva a cabo en presencia del compuesto y la exposición indirecta, en la que las células germinales no maduran en presencia del compuesto pero sí las células germinales que le dieron origen, se presentan en la figura 5.11 los resultados obtenidos de los biomarcadores de fertilidad, cantidad de progenie y frecuencia de recombinación de la exposición a MMS de la línea germinal femenina y de la línea germinal masculina.

La línea germinal femenina mostró menor fertilidad en la concentración más baja cuando las células germinales fueron expuestas de manera indirecta que cuando la exposición fue de manera directa ($P < 0.05$). Para la cantidad de progenie, en la mayoría de las concentraciones de MMS no hubo diferencias significativas entre la exposición directa e indirecta, excepto en la concentración más alta de MMS 1mM en la cual se obtuvo menor promedio de progenie cuando la exposición fue directa ($F_{1,631}=8.243$; $P < 0.0042$; Sidak, $P=0.007$).

En cambio en la línea germinal masculina, las moscas de las concentraciones más altas de MMS mostraron mayor daño cuando la exposición fue directa que cuando fue indirecta. La fertilidad de las tres concentraciones más altas fue menor en la exposición directa que en la indirecta y estadísticamente significativa en las concentraciones 6.25 E-02 mM y 1.25 E-01 mM ($Z_{0.05}= 1.96$; $P < 0.05$). La cantidad de progenie también disminuyó a partir de la concentración 1.56 E-02 mM como se representa en la figura 5.12, las concentraciones 1.56 E-02 mM, 6.25 E-02 mM y 1.25 E-01 mM fueron estadísticamente diferentes ($F_{1,532}=37.8$; $P < 0.0001$ Sidak, $P < 0.05$).

Se encontraron diferencias en la frecuencia de recombinación entre los dos protocolos de exposición tanto en el tratamiento de la línea germinal materna como la línea germinal paterna. Para el caso de la exposición indirecta de línea materna, la frecuencia de recombinación disminuyó entre las concentraciones 3.9 E-04 mM y 1.25 E-01 mM en comparación con la frecuencia de recombinación obtenida con la exposición directa de la línea materna ($P < 0.05$). En el caso de la exposición indirecta de la línea germinal paterna, la frecuencia de recombinación se incrementó desde la concentración más baja de MMS 2.4 E-04 mM hasta la concentración de 1 mM, excepto en la concentración 6.25 E-02 mM en la cual en lugar de incrementarse, disminuyó.

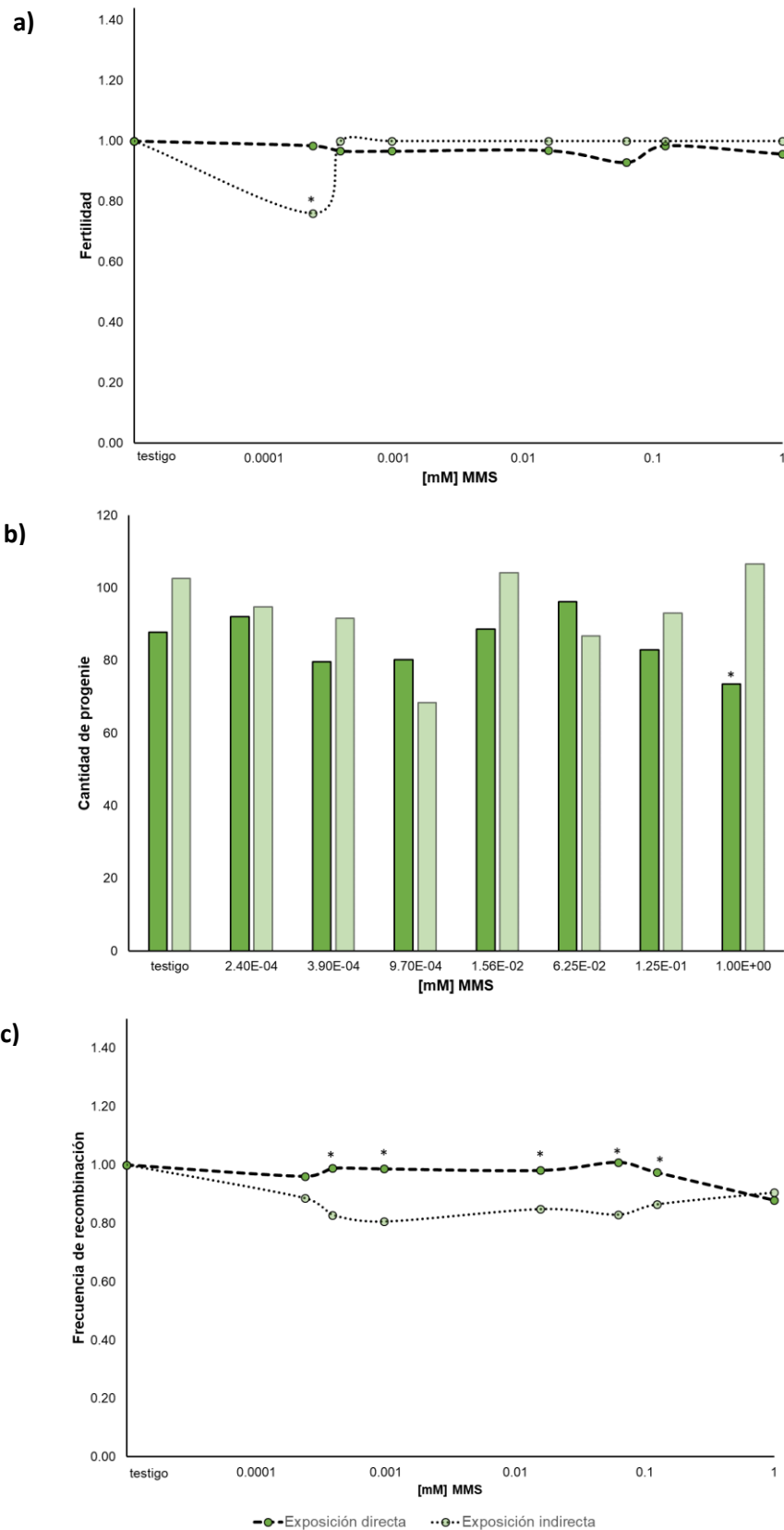


Fig. 5.11 Comparación de la exposición directa y la exposición indirecta de las células germinales de la línea materna a MMS para los biomarcadores de: a), fertilidad; b), cantidad de progenie y c) la frecuencia de recombinación. El * representa diferencias estadísticamente significativas entre la exposición directa e indirecta. Para la fertilidad y la frecuencia de recombinación se utilizó una prueba de Z para proporciones y para la cantidad de progenie una ANOVA de dos vías.

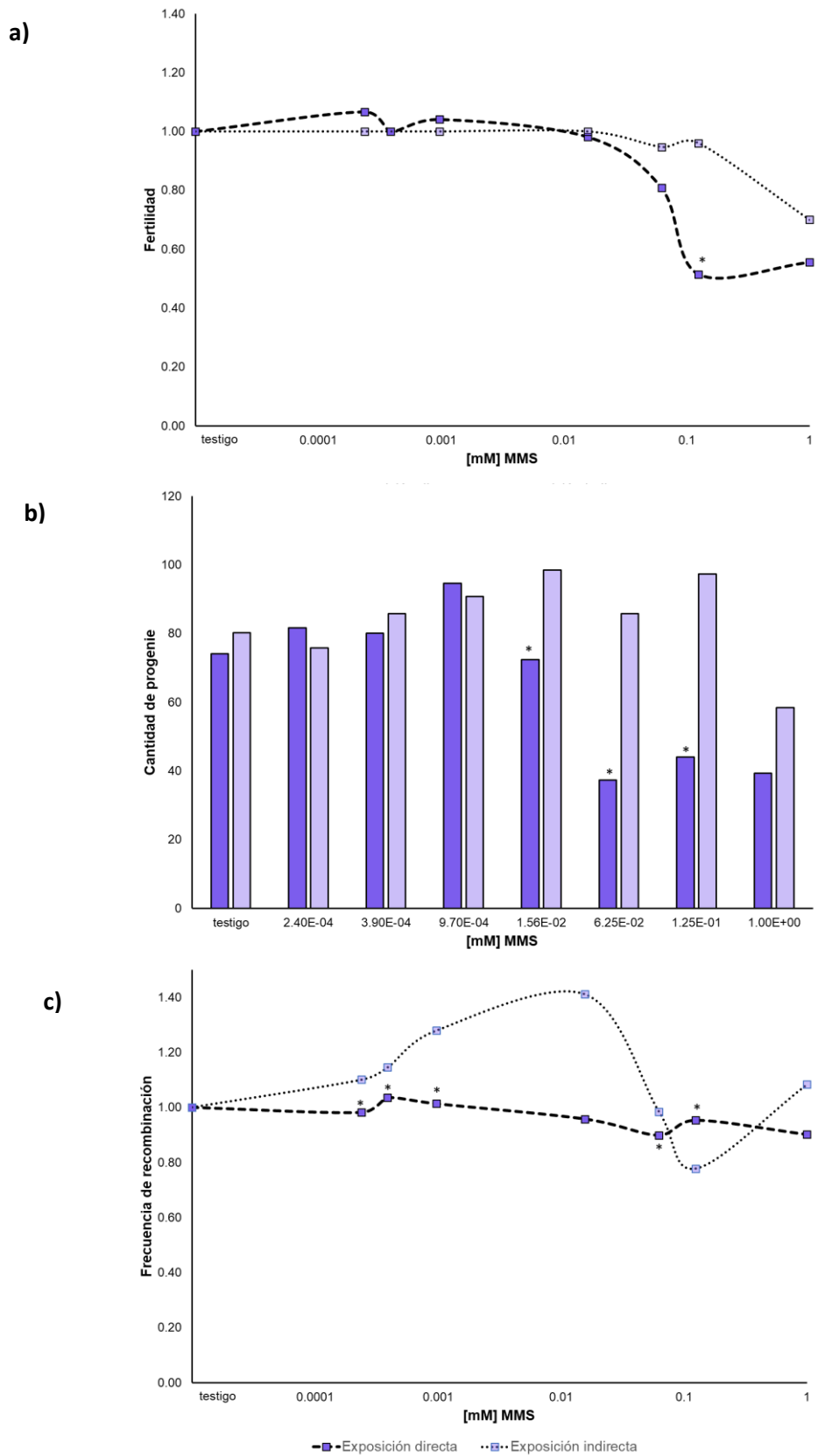


Fig. 5.12 Comparación de la exposición directa y la exposición indirecta de las células germinales de la línea paterna a MMS para los biomarcadores de: a), fertilidad; b), cantidad de progenie y c) la frecuencia de recombinación. El * representa diferencias estadísticamente significativas entre la exposición directa e indirecta. Para la fertilidad y la frecuencia de recombinación se utilizó una prueba de Z para proporciones y para la cantidad de progenie una ANOVA de dos vías.

VI. DISCUSIÓN

6.1 Toxicidad del MMS

Para evaluar el efecto tóxico del MMS se utilizaron los biomarcadores de sobrevivencia y proporción sexual tanto para el protocolo uno como para el protocolo dos, la única diferencia entre las larvas expuestas de los dos protocolos fue la constitución genética de las hembras. En el primer protocolo, las hembras eran silvestres heterocigotas w^+m^+ / wm mientras que en el segundo protocolo las hembras eran silvestres homocigotas w^+m^+ / w^+m^+ .

La respuesta de toxicidad depende de diferentes factores como las características propias del compuesto y las del modelo biológico utilizado (Repetto y Repetto, 2009), en ambos protocolos la respuesta de toxicidad fue similar, esto significa que las moscas en etapa larvaria independientemente de su composición genética fueron sensibles al MMS, por lo que, la sobrevivencia presentó una respuesta positiva o negativa en las diferentes concentraciones. La letalidad de las concentraciones 5mM y 10mM de MMS fue la respuesta más contundente en ambos casos.

A partir de la concentración 9.7 E-04 mM en el protocolo 1 y la concentración 1.25 E-01 mM del protocolo 2, la sobrevivencia mostró un comportamiento lineal, siguiendo el modelo clásico de dosis -respuesta, que asume que en las concentraciones mayores hay mayor efecto (Klaassen y Watkins III, 2005), pues conforme se incrementó la concentración de MMS, el número promedio de adultos recobrados después del tratamiento en la etapa larvaria disminuyó entre un 20% a 50 % en comparación con el testigo.

La reducción de la cantidad de organismos recobrados por la exposición a MMS afectó de la misma manera a hembras y machos, ya que la proporción sexual de los organismos recobrados se mantuvo en una proporción aproximada de 0.5, la cual corresponde a la probabilidad de tener un macho o una hembra de acuerdo con los mecanismos de determinación del sexo en *Drosophila* (Salz y Erickson, 2010).

Por lo tanto, el MMS es un compuesto que compromete la sobrevivencia de los individuos expuestos indistintamente del sexo que tenga, es decir, la toxicidad de dicho compuesto afecta de manera similar a hembras y machos. Este efecto puede atribuirse a que el MMS tienen un mecanismo de acción directa sobre el DNA (Wyatt y Pittman, 2006). Además de que la organización morfológica y metabólica de las hembras y machos de *D. melanogaster* durante la etapa de exposición al MMS es muy similar (Clark, 1982), por lo que la respuesta en ambos sexos no es diferente para la toxicidad.

6.2 ¿La capacidad reproductiva de los organismos expuestos a MMS en etapas tempranas fue afectada?

Una de las características esenciales de los seres vivos es su capacidad de dejar descendencia; para una reproducción exitosa, es fundamental la integridad biológica de los organismos (Williamson y Lehmann, 1996). Existe evidencia de que los contaminantes ambientales pueden afectar los procesos reproductivos regulares (Parodi *et al.*, 2015) ocasionando trastornos de la reproducción que se han convertido en un problema de salud humana y ambiental, poniendo en riesgo también la preservación de algunas especies (EPA, 1996; VanDerOost *et al.*, 2005).

Las agentes químicos o físicos, pueden afectar los sistemas reproductores femenino y masculino en cualquier momento del ciclo de vida, la exposición a tóxicos durante las primeras etapas del desarrollo puede provocar alteraciones que modifican la capacidad reproductiva posterior al momento de la exposición e incluso en las generaciones siguientes (EPA, 1996; Ferreira y Allard, 2015). En este trabajo se evaluó la capacidad reproductiva de organismos hembras y machos expuestos a MMS durante etapas tempranas de su desarrollo, así como la de su progenie F₁ no expuesta.

A diferencia de la respuesta lineal en la toxicidad del MMS observada en el protocolo 2, en los diferentes biomarcadores utilizados para evaluar la capacidad reproductora, no se encontró dicho comportamiento, esto coincide con que la respuesta del efecto reprotóxico no es lineal (EPA, 1996) y con la respuesta no lineal observada en radiaciones y algunos compuestos mutagénicos en concentraciones bajas, en donde la respuesta puede incluso ser opuesta a la obtenida en dosis altas (Calabrese y Baldwin, 2003; Ramos *et al.*, 2001).

El efecto no lineal está basado en mecanismos homeostáticos, compensatorios o adaptativos que deben superarse antes de que un punto crítico se manifieste en una respuesta tóxica evidente, en este caso en las células y órganos del sistema reproductor (Lovell, 2000; Calabrese y Baldwin, 2001). Incluso algunos autores han descrito efectos positivos, en los que el estrés ambiental confiere resistencia en la descendencia, aunque también se ha encontrado afectación en la cantidad, rendimiento y capacidad de supervivencia de estos (Marshall, 2010).

Estos efectos no lineales se observaron en la fertilidad y en la cantidad de progenie, biomarcadores utilizados para evaluar el efecto directo del MMS en las células germinales de las moscas expuestas en tres posibles contextos ambientales, representados en los tres sistemas de cruce. La cruce en donde ambos progenitores fueron tratados (T x T) implica que las células germinales de hembras y machos estuvieron expuestas con MMS durante su formación y maduración. Hembras tratadas con machos no

tratados (T x NT) en la que únicamente las células germinales de las hembras se formaron y maduraron en presencia de MMS y finalmente la cruce hembras no tratadas con machos tratados (NT x T) en el cual, las células germinales de las hembras no fueron expuestas a MMS, pero sí las células germinales de los machos que las fecundaron.

El efecto más drástico se esperaba en la cruce en la que ambos progenitores fueron expuestos a MMS, seguidos de la cruce en la que únicamente las hembras fueron tratadas con MMS y en la cruce en la que los machos fueron los expuestos se esperaba el efecto más leve. Como se esperaba, los efectos más contundentes se obtuvieron cuando ambos parentales fueron expuestos; sin embargo, el segundo tipo de cruce más afectado fue el de los machos expuestos y no la cruce en la que las hembras fueron las expuestas como se esperaba.

6.2.1. ¿La capacidad reproductiva de hembras y machos expuestos a MMS fue similar?

Actualmente se sabe que en los organismos con reproducción sexual existe una contribución diferencial entre las aportaciones de ambos progenitores, debido a que las células germinales de las hembras aportan proteínas, RNAs y organelos que en los gametos masculinos están ausentes (Greiner *et al.*, 2015; Despica *et al.*, 2017).

A pesar de estas diferencias, en las consideraciones del foro de riesgo de la EPA, se indica que los efectos de los genotóxicos en los procesos reproductores de hembras y machos son similares y que en primera instancia se asume que un agente que afecte la función reproductiva en un sexo afectará al otro sexo, hasta que se demuestre lo contrario (EPA, 1996).

En este trabajo se obtuvieron resultados que evidencian que existe una respuesta diferencial en la capacidad reproductiva dependiendo de cuál de los progenitores fue expuesto. El efecto más drástico se evidenció en la disminución de la fertilidad y cantidad de prole en las concentraciones altas de MMS de las cruces en las cuales los machos fueron tratados con MMS, en cambio, cuando la hembra estuvo expuesta aparentemente no hubo ningún efecto del MMS en la capacidad reproductiva.

Si bien estos resultados muestran una respuesta diferencial en la capacidad reproductiva en función del sexo del parental tratado, esta diferencia fue opuesta a la hipótesis planteada, en la que se esperaba mayor daño en la cruce en la que las hembras fueron las expuestas a MMS, debido a que la maduración de las ovariolas y la formación del ovocito en presencia del compuesto tendría mayor impacto directo en su capacidad reproductiva por la contribución adicional al material genético indispensable para el desarrollo del nuevo individuo.

Si ambos parentales fueron expuestos a MMS durante la etapa larvaria, cuando la organización tanto de los tejidos somáticos como germinales presentan una estructura similar en ambos sexos (Williamson y Lehmann, 1996; Huynh, 2006), además de que el MMS es un agente alquilante de acción directa (Mishina *et al.*, 2006) ¿cómo es posible que el impacto en su capacidad reproductiva sea tan diferente entre ambos sexos?

La comparación entre el efecto de la exposición a MMS de células germinales de machos y hembras evidenció que las células germinales de machos F₁ expuestos al genotóxico son más afectadas que las células germinales de hembras F₁ expuestas. Se planteó que esta respuesta diferencial entre las células germinales de hembras y machos expuestos podía deberse a que en las hembras expuestas podría ocurrir selección de las células germinales (previo a la formación del cigoto) o a la pérdida postcigótica, de manera que sólo se recobrarían individuos no afectados. En cambio, cuando las hembras no estuvieron expuestas dicha selección no se realizaba.

6.2.3 ¿La respuesta diferencial entre la capacidad reproductiva de hembras y machos se debe a mecanismos de selección?

El estrés ambiental, como temperaturas extremas, la desecación, el hacinamiento, exposición a agentes genotóxicos pueden tener importantes consecuencias durante el desarrollo de los organismos (Singh *et al.*, 2015). Insectos holometábolos como *D. melanogaster*, que presentan un periodo de embriogénesis dentro del huevo y una sucesión de estadios larvales que culminan con una metamorfosis completa de la que finalmente surge un imago o adulto (Demereck, 1994), pueden experimentar diferentes tipos de estrés en cada uno de los estadios. La capacidad de resistir el estrés ambiental en las diferentes etapas de vida es un componente importante que afecta la longevidad, la sobrevivencia, fertilidad y fecundidad de los organismos (Bubily y Loeschcke, 2002; Schmidt y Paaby, 2008).

Por lo tanto, para explorar si existe un mecanismo de selección de la progenie de hembras expuestas a MMS se evaluó la frecuencia de ovoposición, número de huevos ovopositados, la cantidad de progenie adulta, si existía pérdida de individuos durante el desarrollo de huevos a adultos, mediante la estimación de la viabilidad. Estos biomarcadores se vieron altamente afectados en las cruzas que involucraban a los progenitores machos (NT x T y T x T) mientras que al igual que en la capacidad reproductiva los efectos aparentemente más leves se observaron en la craza T X NT.

El porcentaje de ovoposición implica la relación entre los tubos en los que las hembras ovopositaron al menos un huevo, con respecto al total de tubos sembrados. En las concentraciones más altas, las cruzas

que involucraban la exposición del progenitor macho (NT x T y T x T) mostraron disminución significativa en este marcador, es decir, muy pocas hembras pusieron huevos. Esto involucra que independientemente de que las hembras sean expuestas o no, hay un factor proveniente de los machos tratados con MMS que contribuye a inhibir la puesta de huevos de las hembras.

En cambio, cuando las hembras fueron expuestas a MMS y los machos no, la frecuencia de ovoposición no disminuyó significativamente en las concentraciones más altas en las cuales sí hubo efecto cuando el macho fue el tratado, estos resultados no corresponden con nuestra hipótesis de que el mayor daño se esperaría observar cuando la hembra es tratada debido al aporte citoplasmático (Dworkin y Dworkin-Rastl, 1990; Mousseau y Fox, 1998). Sin embargo, en las concentraciones intermedias de MMS, la frecuencia de ovoposición de las hembras fue menor, lo cual indica que en estas concentraciones puede existir un mecanismo de selección.

Aunque el número de huevos ovopositados no mostró diferencias en ningún caso, se observaron tendencias diferentes entre los esquemas de cruce. Como se discutió anteriormente, las cruces NT x T y T x T tuvieron menor frecuencia de ovoposición, sin embargo, las pocas hembras que ovopositaron, mostraron una tendencia a poner una mayor cantidad de huevos. Esto significa que el tratamiento de los machos no sólo inhibió que algunas hembras pusieron huevos, sino que al mismo tiempo estimuló a algunas hembras a que liberaran una mayor cantidad de huevos.

En cambio, en la cruce T X NT hubo una mayor proporción de hembras que ovopositaron pero el número de huevos que pusieron fue menor en todas las concentraciones. Esta tendencia puede ser un indicador de que existe un mecanismo en el que las hembras seleccionan los huevos que se encuentran en mejores condiciones, dado que esta tendencia no se encontró en las otras cruces podría sugerirse que dicha selección ocurre en etapas muy tempranas durante la ovogénesis, previas al cigoto.

La cantidad de adultos promedio no mostró diferencias significativas en ninguno de los esquemas de cruce. En la concentración más alta de MMS de la cruce T x T no se recobró ningún adulto y en las dos concentraciones más altas de la cruce NT x T, la progenie recobrada proviene exclusivamente de una pareja. Estos resultados indican que el MMS afectó el desarrollo de las células germinales de los machos, por lo tanto, al fertilizar al huevo, estos no completan su desarrollo.

Además, que en la cruce NT x T se haya recobrado adultos provenientes de una sola pareja sugiere que existen otros procesos de selección a nivel poblacional, en los cuales se favorece la supervivencia y reproducción de los individuos que se encuentran en mejores condiciones, produciendo una progenie numerosa para compensar a los individuos que no pudieron reproducirse. Este efecto de “equilibrio” se

observa de manera regular en las poblaciones naturales expuesta ante algún agente genotóxico (Einun y Fleming, 2000)..

La cantidad de adultos promedio no refleja que estén perdiéndose organismos en la población por el efecto del MMS, pero al evaluar la viabilidad se evidencia que el número de individuos que completa su desarrollo es muy reducido en las concentraciones más altas de MMS principalmente en la progenie proveniente de las cruza en que el progenitor macho fue expuesto. Este efecto también se mostró en la cantidad de individuos que se pierden en la población, la cual, presentó mayor pérdida postcigótica en la cruza NT x T. Dicha pérdida de organismos no se observó en la cruza T x T.

De manera general, los biomarcadores utilizados para evaluar si existe algún mecanismo de selección indicaron que cuando las hembras son tratadas no existe evidencia de selección postcigótica ya que la viabilidad no se afectó, lo que implica que no hubo pérdida de individuos durante el desarrollo huevo-larva, pero la disminución de la frecuencia de ovoposición sugiere que existen mecanismos de selección que actúan antes de la formación del cigoto.

Por el contrario, cuando los machos fueron los expuestos, la baja viabilidad indica que existe pérdida de la progenie durante el desarrollo huevo-adulto, por lo que muestra que existe selección postcigótica. Además, al igual que en las hembras tratadas, la reducción significativa en la frecuencia de ovoposición indica que existen mecanismos de selección que actúan antes de la formación del cigoto.

Lo anterior evidencia que hay un mayor impacto en la capacidad reproductiva de las hembras cuando la maduración de las ovariolas y formación del ovocito ocurre en ausencia del compuesto, pero las células del macho que la fecunda se formaron en presencia del compuesto. Esto indica que tanto en los mecanismos de selección precigótica y postcigótica, la contribución de los machos participa en estos procesos a través de la regulación y modulación de la capacidad reproductiva de las hembras.

6.2.4. ¿Cómo la capacidad reproductiva de las hembras puede ser modulada por los machos?

Si bien estos resultados muestran una respuesta diferencial entre hembras y machos se contraponen con lo esperado, se esperaría que la capacidad reproductora de las hembras expuestas se afectara más que la de los machos debido a que las hembras invierten más recursos citoplasmáticos, transcripcionales y proteicos en la producción de progenie (Mousseau y Fox, 1998).

Esta aparente contradicción pone en evidencia que la visión clásica en la que los machos solo son un vehículo para entregar la mitad del componente genético que formará al nuevo individuo es limitada (Crean y Bonduriansky, 2014). En los últimos años se ha mostrado que los machos también aportan

proteínas y RNA que desempeñan un papel esencial en la formación de los nuevos individuos de manera indirecta pues ejercen sus efectos en todas las fases de la biología reproductiva de la hembra apareada (Gillott, 2003; Hosken y Hodgson, 2014).

La presencia de estos componentes masculinos puede modular diferentes procesos desde el momento en que el esperma se deposita en el tracto reproductivo hasta la deposición de huevos que incluyen protección de esperma, almacenamiento y activación, competición espermática, inducción de la refractariedad, la fecundidad, ovulación, oviposición y protección de huevos puestos por la hembra (Gillott, 2003; Adams y Wolfner, 2007).

En *Drosophila melanogaster* se han descrito tres componentes proteicos: ovulina (ACP26Aa), péptido sexual (SP) y DUPQ9B que se producen en la glándula accesoria y que se transmiten en el líquido seminal durante el apareamiento, los cuales están involucrados en la ovulación, ovoposición y viabilidad de los huevos (Kubli, 2003; Adams y Wolfner, 2007).

La inhibición de la ovoposición podría deberse a algunos de los componentes del líquido seminal, entre ellos podrían estar involucrados los péptidos ACP26A, SP y DUPQ9B, que de manera regular promueven la ovulación, ovoposición e incluso la viabilidad de los huevos (Heifetz *et al.*, 2000; Kubli, 2003), la exposición a MMS podría modificar la estructura de estos péptidos o disminuir su cantidad alterando su función.

En el caso en el que las hembras son las expuestas y aparentemente no hay cambios en comparación al testigo podría implicar algún mecanismo de autorregulación de las hembras, como selección precigótica o a que el aporte del esperma y del líquido seminal de los machos no tratados es suficiente para estimular de manera regular la ovoposición.

6.3¿La exposición directa a MMS no afectó a las células germinales de la línea materna?

EL ovocito además de contribuir con la mitad de la información genética para la formación del nuevo individuo aporta la totalidad del citoplasma con todos los organelos requeridos, los factores proteicos y diversos RNAs (Laver *et al.*, 2015). Estos componentes específicos que aporta la línea germinal femenina son indispensables como factores de transcripción para la expresión genética del cigoto, para la formación y determinación de los ejes corporales y la preservación y desarrollo del nuevo embrión (Schupbach y Wieschaus, 1986; Yamamoto *et al.*, 2006; Mtango *et al.*, 2008; Marcello and Singson, 2010).

A pesar de dichas contribuciones, ninguno de los diferentes biomarcadores empleados para caracterizar la respuesta de las hembras a la exposición del MMS evidenció un cambio significativo, entonces ¿cómo es posible que aparentemente en las hembras no exista un efecto, si el ovocito además de contribuir con la mitad del material genético aporta el citoplasma, organelos celulares, proteínas y RNAs esenciales para el desarrollo del nuevo individuo?

La respuesta inmediata podría establecer que el MMS no perjudicó a las células somáticas ni germinales de la línea materna. Sin embargo, la letalidad en las concentraciones 5 mM y 10 mM de MMS, así como la disminución de la sobrevivencia de igual manera para machos y hembras, demuestra que el MMS afectó a las células de los organismos expuestos tanto a hembras como a machos, porque si no hubiese daño en las células de las hembras, la sobrevivencia de las hembras no se hubiese afectado en las concentraciones letales ni en las concentraciones subletales.

Por lo anterior, se propone que deben existir algunos elementos que contribuyan a que se amortigüe el efecto de la exposición a MMS en la capacidad reproductiva de las hembras. Uno de estos mecanismos podría ser la selección a nivel celular, previamente a la formación del cigoto; en la cual pueden existir tres mecanismos: las células toleran la lesión y continúan sus funciones, las células dañadas se reparan o las células afectadas se eliminan por apoptosis.

Se ha mostrado que, en el caso de llevarse a cabo el primer mecanismo, hay una afectación en la viabilidad de las células que toleran la lesión que se manifiesta en la disminución de la progenie (Singh *et al.*, 2015), lo cual no ocurrió en los resultados de viabilidad cuando las hembras fueron las expuestas. De ahí que se descarte que este mecanismo sea el que amortigua el efecto del MMS en las células germinales de las hembras.

El segundo mecanismo de reparación celular es una opción posible, ya que se sabe, que los ovocitos maduros de *Drosophila*, anfibios y mamíferos contienen la maquinaria enzimática necesaria para inducir mecanismos de reparación del daño en el DNA de los espermatozoides (Ashwood-Smith y Edwards, 1996; Sekelsky, 2017); además, se ha demostrado que el ovocito es capaz de activar la maquinaria de reparación después de la fertilización (Brandriff y Pedersen, 1981; Derijick *et al.*, 2008). Sin embargo, cuando la formación y maduración del ovocito ocurre en presencia de un mutágeno como MMS, no solo puede afectarse el DNA de éste sino también puede modificarse la constitución de los RNA y de las proteínas, entre ellos, aquellos que participan en el proceso de reparación (Tuncel and Kalkan, 2019).

La reparación del DNA es esencial para prevenir efectos citotóxicos o efectos mutagénicos por diferentes tipos de lesiones en el DNA (Brickner *et al.*, 2017). No obstante, el exceso de alteraciones en el DNA, por deficiencia en los mecanismos de reparación o por acumulación del daño, promueve la muerte

celular por apoptosis (Jaklevic y Su 2004), La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que fue descrita inicialmente como una serie de cambios morfológicos que resultan en la fragmentación celular en cuerpos apoptóticos y su posterior eliminación por fagocitosis (Kerr *et al.*, 1972) y que, además, implica fragmentación del DNA, reducción citoplásmico y activación de las caspasas de la vía apoptótica que culminan en la liberación del citocromo C (Kroemer *et al.*, 2009; Elmore, 2007).

Se ha descrito que la muerte celular programada, principalmente la apoptosis, existe en el ovario de las hembras de *Drosophila* tanto en respuesta al desarrollo como a diferentes estímulos del ambiente (Waddington y Okada, 1960; McCall y Steller, 1998). En etapas muy tempranas se ha detectado que el 70% de las moscas alimentadas con una dieta reducida presenta degeneración de los cystocitos de la región 2 del germario, en comparación al 2% de las moscas alimentadas con una dieta regular (Drummond-Barbosa y Spradling, 2001).

La apoptosis ocasionada por la exposición de las hembras a MMS durante la etapa larvaria podría permitir una selección de las células germinales con menor daño y mayor estabilidad que permita continuar su proceso de diferenciación. Recientemente se ha encontrado que algunas células pueden sobrevivir después de la iniciación de apoptosis y continuar con su función de manera regular (Tang *et al.*, 2018). Cualquiera de los escenarios que conlleva la apoptosis podría amortiguar el efecto de la exposición a MMS en las células germinales de las hembras.

6.3.1 Evidencias de daño en las células germinales de la línea materna por MMS

Tanto en el protocolo 1 como en el protocolo 2, la exposición directa a MMS, es decir cuando la formación y maduración de las células germinales se llevan a cabo en presencia del compuesto, no cambió los diferentes biomarcadores empleados para caracterizar la respuesta de las hembras a la exposición del MMS.

Sin embargo, en la segunda parte de este trabajo, que corresponde al protocolo 2, se buscó valorar si el posible daño ocasionado en los gametos por la exposición al MMS tiene un impacto en la siguiente generación y si dicho impacto es diferente en función del progenitor expuesto (macho o hembra). Al cruzar la progenie F₁ de las moscas expuestas con la finalidad de obtener la siguiente generación (F₂) se obtuvo un cambio en los biomarcadores de capacidad reproductiva de las moscas F₁ respecto al de sus progenitores expuestos, como se muestra en la figura 4.16.

En el caso cuando el progenitor macho fue el expuesto a MMS, el mayor efecto se observó en la generación de los progenitores y en las moscas F₁ ese daño se redujo. Mientras que cuando el progenitor

expuesto fue la hembra, el mayor impacto en la capacidad reproductiva fue en las moscas F_1 no expuestas y no en la capacidad reproductora de las hembras progenitoras que estuvieron en contacto con el MMS. Esto significa, que la exposición a MMS de las células germinales de los progenitores alteró la capacidad reproductiva de la generación F_1 , por lo que, aunque en la exposición directa de las hembras no es evidente algún daño en sus descendientes, si hay modificaciones asociadas a las células germinales de su progenie reflejadas en la fertilidad y cantidad de progenie.

También en esta parte del trabajo se evidenció que no todas las parejas contribuyen en la misma magnitud, unas parejas producen pocos hijos mientras que otras parejas producen muchos hijos. Esta proporción fue alterada por la exposición de MMS a través de las generaciones y cambió dependiendo del progenitor que fue expuesto.

Cuando el macho progenitor fue expuesto, la proporción de hembras que tuvieron una mayor cantidad de progenie fue mínima; sin embargo, en la siguiente generación la proporción de hembras que tuvieron una mayor cantidad de progenie aumentó considerablemente en todas las concentraciones (Fig. 4.17). En cambio, cuando las hembras progenitoras fueron expuestas la proporción de hembras con una cantidad de progenie mayor al promedio fue mayor, pero en la siguiente generación el número de hembras con progenie mayor al promedio disminuyó.

Lo anterior apoya que la respuesta ante la exposición a agentes genotóxicos puede manifestarse en diferentes niveles de la organización biológica (Sgró y Hoffmann, 2004). Es decir, la respuesta de los organismos ante factores de estrés como cambios en la temperatura, escases de alimentos o exposición a genotóxicos también puede modificarse a nivel poblacional (Pérez, 2008).

Otro biomarcador que evidenció si las células germinales de la línea materna fueron afectadas por el MMS fue el cambio en las frecuencias de recombinación de las hembras F_1 heterocigotas no expuestas por la exposición de sus progenitores (hembra o macho). La recombinación homóloga, es uno de los procesos celulares más importantes que ocurre durante la formación de los gametos, consiste en el intercambio de un segmento de un cromosoma homólogo con un segmento equivalente del otro cromosoma homólogo (Morgan, 1915; Morgan, 1919; Morgan *et al.*, 1922). En *D. melanogaster*, este proceso ocurre únicamente en las hembras (Cooper, 1949; Cooper, 1950).

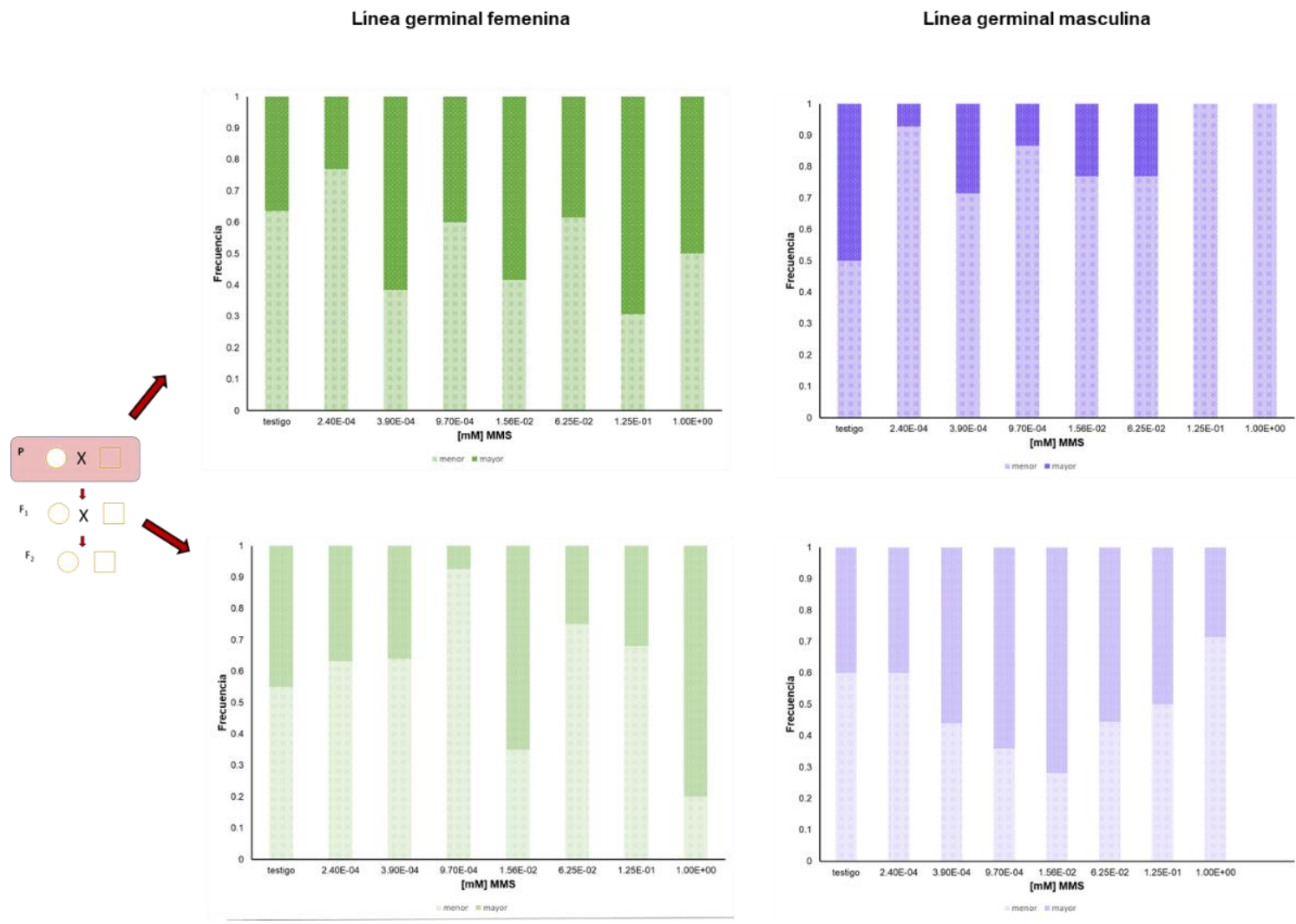


Fig. 4.17 Comparación de la proporción de hembras que tuvieron una cantidad de progenie menor al promedio del testigo y de la proporción de hembras con una cantidad de progenie mayor al promedio del testigo de las moscas expuestas a MMS y de su progenie F₁ no expuesta.

6.3.2 Modificaciones en la frecuencia de recombinación

En ninguna de las cruzas en las que se expusieron de manera directa a las células germinales de las moscas F_1 se encontraron modificaciones a la frecuencia de recombinación de las hembras F_1 heterocigotas. Este resultado era esperado en la craza NT x T, en el cual las células germinales de las hembras no están expuestas a MMS, pero si las células germinales de los machos que las fecundan, por lo tanto, el proceso de intercambio cromosómico en las células germinales de las hembras F_1 se lleva a cabo de manera regular ya que no existe ninguna condición ambiental externa que induzca su aumento o su disminución.

No obstante, este resultado no era esperado en las cruzas en las que las células germinales de las hembras F_1 se forman y maduran en presencia del MMS (T x NT y T x T), ya que al ser la recombinación homóloga en las células germinales de la hembras un proceso que puede alterarse por factores externos como condiciones ambientales desfavorables (Bridges, 1915; Bridges, 1927; Plough, 1917; Plough, 1921; Stern, 1926; Mavor 1923; Mavor y Svenson, 1924; Müller, 1925; Whittinghill, 1951; Würigler, 1991; Arroyo, 2014) se esperaba obtener cambios en dicho biomarcador.

La ausencia de cambios en la frecuencia de recombinación germinal durante la formación del ovocito y maduración de las ovarias en presencia del MMS, no significa que la frecuencia no se altere por agentes genotóxicos, sino que apoya que el proceso de recombinación debe ocurrir en etapas muy tempranas durante la formación de las células germinales incluso antes del tercer estadio larvario.

En cambio, se encontró que la frecuencia de recombinación se alteró en las células germinales de las hembras F_1 , tanto en las hembras provenientes de hembras progenitoras tratadas como de machos expuestos, ¿cómo es posible que la frecuencia de recombinación en las células germinales de las hembras F_1 que no estuvieron expuestas pueda modificarse por la exposición de los progenitores?

Las lesiones en el ADN ocasionadas por fuentes endógenas o exógenas ponen en riesgo la supervivencia de las células (Sekelsky, 2017; Brickner *et al.*, 2017). Por lo tanto, las células tienen distintas vías bioquímicas para reparar las diferentes lesiones, la vía que utilice dependerá del tipo y la intensidad del daño lesiones (Ouyang *et al.*, 2008). La recombinación homóloga es un mecanismo que repara rompimientos de doble cadena de DNA (Krejci *et al.*, 2012). En *Saccharomyces cerevisiae* se demostró que los rompimientos de doble cadena son una señal eficiente para iniciar la recombinación meiótica (Wyatt y Pittman, 2006), en estudios recientes se pone en evidencia que el rompimiento de doble cadena de DNA también es una señal para iniciar la recombinación meiótica en *D. melanogaster* (Hughes *et al.*, 2018).

El MMS induce intercambios de cromátidas hermanas y recombinación homóloga durante la fase S en *S. cerevisiae* (Kaina, B.,2004). En machos adultos de *D. melanogaster* expuestos a MMS por inhalación se indujo la frecuencia de recombinación en células germinales (Burychenko, 1972). En este trabajo se encontró que el MMS modificó las frecuencias de recombinación en las hembras heterocigotas de la F₁ no expuestas directamente al compuesto.

La recombinación homóloga también repara daños persistentes en una molécula hija del material genético después de la replicación obteniendo otra copia de la secuencia a partir de una fuente no dañada (Krejci et al., 2012). En consecuencia, el incremento o la disminución en las frecuencias de recombinación estimadas a nivel poblacional en la progenie de las hembras heterocigotas de la F₁, pone en evidencia que, aunque éstas no hayan recibido el daño directo pueden detectar el daño ocasionado en las células germinales de sus progenitores ya sean hembras o machos expuestos.

Los resultados en la frecuencia de recombinación, así como los obtenidos en la capacidad reproductiva de la progenie F₁ no expuesta indican que el compuesto no solo tiene la posibilidad de alterar la sobrevivencia de los organismos tratados con MMS y su capacidad reproductiva, sino que también lo hace en los organismos de las siguientes generaciones, es decir, el MMS tiene un efecto transgeneracional.

VII. CONCLUSIONES

- ❖ El efecto *in vivo* del genotóxico MMS en las células germinales tempranas de la línea femenina de *Drosophila melanogaster* mostró modificaciones en la capacidad reproductiva dependiendo del contexto ambiental en el que se formaron:
 - Cuando únicamente la maduración de las ovarias y la formación del ovocito se realizó en presencia del MMS no se modificó su capacidad reproductiva.
 - Cuando la maduración de las ovarias y la formación del ovocito no se realizó en presencia del MMS,
 - Si las células germinales de los machos que las fecundaron se formaron en presencia del MMS se modificó su capacidad reproductiva.
 - El mayor impacto en la capacidad reproductiva se obtuvo cuando la formación y maduración de ambas células germinales ocurrió en presencia del MMS.

- ❖ Existe una respuesta diferencial en la capacidad reproductora estimada con la fertilidad y cantidad de prole dependiendo del progenitor sometido al tratamiento con MMS.

- ❖ La respuesta diferencial en la capacidad reproductiva es más evidente en las concentraciones más altas, los resultados para los biomarcadores estudiados señalan que existen al menos tres mecanismos que podrían explicar parcialmente las diferencias entre la respuesta de hembras tratadas, machos tratados o ambos progenitores:
 - Selección precigótica a nivel de individuo (hembras): evidenciado en la disminución del porcentaje de tubos con huevos.
 - Selección precigótica a nivel celular: disminución de la cantidad de huevos.
 - Selección postcigótica; baja viabilidad e incremento de la pérdida de organismos durante el desarrollo.

La selección de hembras, la selección precigótica y postcigótica podría estar regulada por los componentes del esperma y el líquido seminal de los machos aportados a la hembra durante el apareamiento.

- ❖ La exposición a MMS de las células germinales de los progenitores alteran la capacidad reproductiva de la generación F₁, y la frecuencia de recombinación de las células germinales de

las hembras F_1 . El mayor impacto en la progenie F_2 ocurre en los descendientes provenientes de las hembras progenitoras tratadas.

VIII. LITERATURA CITADA

- Adams, E. M. y Wolfner, M. (2007). Seminal proteins but not sperm induce morphological changes in the *Drosophila melanogaster* female reproductive tract during sperm storage, *Journal of Insect Physiology*, 53,319–331.
- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides. P.G., Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YH, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor GL, Abril JF, Agbayani A, An HJ, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, de Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei MH, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke Z, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai Z, Lasko P, Lei Y, Levitsky AA, Li J, Li Z, Liang Y, Lin X, Liu X, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina NV, Mobarry C, Morris J, Moshrefi A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon K, Nusskern DR, Pacleb JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J, Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RD, Scheeler F, Shen H, Shue BC, Sidén-Kiamos I, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirskas R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AH, Wang X, Wang ZY, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissenbach J, Williams SM, WoodageT, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA, Ye J, Yeh RF, Zaveri JS, Zhan M, Zhang G, Zhao Q, Zheng L, Zheng XH, Zhong FN, Zhong W, Zhou X, Zhu S, Zhu X, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM, VenterJC.(2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461), 2185-2195.
- Adler, I.D. (1996). Future research directions to study genetic damage in germ cells and estimate genetic risk. *Environmental Health Perspect*, 104 (3),619–624.
- Allard, P. (2015). Emerging toxicity models from emerging scientists. *Toxicology Research*, 4:545-547.
- Arroyo, E. (2014). Efecto recombinogénico de la azida de sodio en células germinales de *Drosophila melanogaster* (Tesis de Licenciatura). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Ashburner, M., Golic, K.G. y Hawley, R.S. (2005). *Drosophila a Laboratory Handbook*. 2a Edition. New York: Editorial Cold Spring harbor.
- Ashwood-Smith, M.J. y Edwards, R.G. (1996). DNA repair by oocytes. *Molecular Human Reproduction*, 2(1),46-51.
- Avanesian, A., Semmani, S., Jafari, M. (2009). Can *Drosophila melanogaster* represent a model system for the detection of reproductive adverse drug reactions? *Drug Discovery Today*,14(15-16),761-766.

- Baars, A.J., Blijleven, G.H., Mohn, A.T, Natarajan, A.T. y Brüner D.D. (1980). Preliminary studies on the ability of *Drosophila melanogaster* preparations to active mutagens and carcinogens. *Mutation Research*, 72(2),257-264.
- Bastock, R. y D. St Johnston. (2008). *Drosophila* oogenesis. *Current Biology*, 18(23),R1084.
- Beckingham, K. M., Armstrong, J. D., Texada, M. J., Munjaal, R. y Baker, D.A. (2005). *Drosophila melanogaster* the model organism of choice for the complex biology of multi-cellular organisms. *Gravit Space Biol Bull*, 18(2),17-29.
- Beranek, D. (1990). Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 231(1),11–30.
- Bock, I.R. y Wheeler, M.R. (1972). The *Drosophila melanogaster* species group studies in Genetics VII. Texas, U.S.A.: Univ. Texas Publ.
- Bopp, D., Horabin, J.I., Lersch, R.A., Cline, T.W. y Schedl, P. (1993). Expression of the Sex-lethal gene is controlled at multiple levels during *Drosophila* oogenesis. *Development*, 118(3),797-812.
- Botas, J. (2007). *Drosophila* researchers focus on human disease. *Nature Genetics*, 39(5),589-591.
- Brandriff, B. y Pedersen, R.A. (1981). Repair of the ultraviolet-irradiated male genome in fertilized mouse eggs. *Science*, 211(4489),1431-1433.
- Brickner, J.R., Soll, J.M., Lombardi, P.M., Vågbø, C.B., Mudge, M.C., Oyeniran, C., Rabe, R., Jackson, J., Sullender, M.E., Blazosky, E., Byrum, A.K., Zhao, Y., Corbett, M.A., Gécz, J., Field, M., Vindigni, A., Slupphaug, G., Wolberger, C. y Mosammapparast, N.,(2017). A ubiquitin-dependent signalling axis specific for ALKBH-mediated DNA dealkylation repair. *Nature*, 6;551(7680),389-393.
- Bridges, C.B. (1915). A linkage variation in *Drosophila*. *Jour.Exp. Zoöl.*, 19(1),1-21.
- Bridges, C.B. (1927). The relation of the age of the female to crossing over in the third chromosome of *drosophila melanogaster*. *The Journal of General Physiology*, 8(6),689-700.
- Brower, D.L., Smith, R.J., Wilcox, M. (1981). Differentiation within the gonads of *Drosophila* revealed by immunofluorescence. *Journal of embryology and experimental morphology*, 63,233-242.
- Bubly, O.A. y Loeschcke, V. (2002). Effect of low stressful temperature on genetic variation of five quantitative traits in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 89(1),70-75.
- Budavari, S. (1996). The Merck Index. Chapman & Hall.
- Burychenko, G.M. (1972). Genetic sensitivity of the stages of spermatogenesis of *Drosophila melanogaster* to methyl-methanesulfonate. I. Crossing over, deletions, fertility. *Sov. Genetic*, 4,1337-1343.
- Cabernard, C. (2012). Cytokinesis in *Drosophila melanogaster*. *Cytoskeleton*, 69(10),791-809.
- Calabrese, E.J. y L.A. Baldwin. (2001). Hormesis: U-shaped dose response and their centrality in toxicology. *Trends in Pharmacological Science*, 22(8),285-291.
- Calabrese, E. J. y Baldwin, L. A. (2003). The hormetic dose-response model is more common than the threshold model in toxicology. *Toxicological Sciences*, 71(2), 246–250.

- Carpenter, A. T. (1975). Electron microscopy of meiosis of *Drosophila melanogaster* females. I. Structure, arrangement and temporal change of the synaptonemal complex in wild type. *Chromosome*, 51,157-182.
- Chandley, A. C. y Bateman, A.J. (1962). Timing of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster* using tritiated thymidine. *Nature*. 193,299-300.
- Chapman, T. y Davis, S. (2004). Functions and analysis of the seminal fluid proteins of male *Drosophila melanogaster* fruit flies. *Peptides*, 25(9),1477-1490.
- Chinnici, J.P. (1974). The effect of monosodium glutamate on crossing over in the distal portion of the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Va.J.Sci.*, 25,177-181.
- Chinnici, J.P., Booker, M.A. y Llewellyn, G.C. (1976). Effect of aflatoxin B₁ on viability, growth, fertility and crossing over in *Drosophila melanogaster* (Diptera). *Journal of Invertebrate Pathology*, 27,255-258.
- Clark, A. M. (1982). The use of larval stages of *Drosophila* in screening for some naturally occurring mutagens. *Mutation Research*, 92(1-2), 89-97.
- Cooper, K.W. (1949). The cytogenetics of meiosis in *Drosophila*. Mitotic and meiotic autosomal chiasmata without crossing over in the male. *Journal of Morphology*, 84(1),81-121.
- Cooper, K.W. (1950). Normal spermatogenesis in *Drosophila*. En: Demerec, M. (Ed.). *Biology of Drosophila* (pp. 1-61). New York: Wiley and Sons New York.
- Crean, A. J. y Bonduriansky, R. (2014). What is a paternal effect? *Trends in Ecology and Evolution*, 29(10),554–559.
- Decotto, E. y Spradling, A.C. (2005). The *Drosophila* ovarian and testis stem cell niches: similar somatic stem cells and signals. *Development Cell*, 9(4),501-510.
- De Cuevas, M. y Spradling, A.C. (1998). Morphogenesis of the *Drosophila* fusome and its implications for oocyte specification. *Development*, 125,2781-2789.
- De Cuevas, M. (2015). *Drosophila* Oogenesis. En: eLs John Wiley & Sons. Ltd:Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001502.pub2
- DeLuca, S. Z. y O'Farrell, P. H. (2012). Barriers to male transmission of mitochondrial DNA in sperm development. *Dev. Cell*, 22(3),660–66
- Demarco, R.S., Eikenes, A.H., Haglund, K. y Jones, D.L. (2014). Investigating spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Methods*, 68(1),218-227.
- DeMarini, David. (2012). Declaring the existence of human germ cell mutagens. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 53,166-172.
- Demerec, M. (Ed.) (1994). *Biology of Drosophila*. New York: Wiley and Sons New York.
- Derijck, A., van der Heijden, G., Giele, M., Philippens, M. y de Boer, P. (2008). DNA double-strand break repair in parental chromatin of mouse zygotes, the first cell cycle as an origin of de novo mutation. *Hum Mol Genet.*, 17(13),1922-37.
- Despic, V., Dejung, M., Gu, M., Krishnan, J., Zhang, J., Herzel, L., Straube, K., Gerstein, M.B., Butter, F., Neugebauer, K.M. (2017). Dynamic RNA-protein interactions underlie the zebrafish maternal-to-zygotic transition. *Genome Research*, 27(7),1184–1194.

- Dezzani, W., Harris, P.V. y Boyd, J.B. (1982). Repair of double-strand DNA breaks in *Drosophila*. *Mutation research*, 92,151-160.
- Drummond-Barbosa, D. y Spradling, A.C. (2001). Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during *Drosophila* oogenesis. *Development Biology*, 231(1),265-78.
- Dworkin, M. B. y Dworkin-Rastl, E. (1990). Functions of maternal mRNA in early development. *Molecular Reproduction and Development*, 26(3), 261–297.
- Einum, S. y Fleming, I. (2000). Highly fecund mothers sacrifice offspring survival to maximize effects. *Nature*, 405,565-567.
- Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol*, 35(4):495-516.
- EPA. (1996). Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency, 61(October), pp. 56274–56322.
- Farmer, J.L. (1974). [New mutants report.] *Dros. Inf. Serv.* 51,20 (<http://flybase.org/>)
- Ferreira, D. y Allard, P. (2015). Models of germ cell development and their application for toxicity studies. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 56,637-649.
- Fuller, M.T. (1993). Spermatogenesis. En: Martínez-Arias, MBaA. (Ed.). The development of *Drosophila melanogaster* (pp.71-147). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Fuller, M. y Spradling, A. (2007). Male and female *Drosophila* germline stem cells: two versions of immortality. *Science*, 316(5823),402-404.
- Gates, J. (2012). *Drosophila* egg chamber elongation: insights into how tissues and organs are shaped. *Fly (Austin)*, 6(4),213-27.
- Gerton, J.L. y Hawley, R.S. (2005). Homologous chromosome interactions in meiosis: diversity amidst conservation. *Nat Rev Genet.*, 6(6),477-487.
- Giansanti, M. G. y Fuller, M.T. (2012). What *Drosophila* spermatocytes tell us about mechanisms underlying cytokinesis. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 68(11),869-881.
- Giansanti, M., Sechi, S., Frappaolo, A., Belloni, G. y Piergentili, R. (2012). Cytokinesis in *Drosophila* male meiosis. *Spermatogenesis*, 2(3),185-196.
- Gillott, C. (2003). Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. *Annual Review of Entomology*, 48(1),163–184.
- Greiner, S., Sobanski, J. y Bock, R. (2015). Why are most organelle genomes transmitted maternally? *Bioessays*, 37(1), 80–94.
- Gulati, D.K., Hope, E., Teague, J. y Chapin, R.E. (1991). Reproductive toxicity assessment by continuous breeding in Sprague-Dawley rats: a comparison of two study designs. *Toxicological Sciences*, 17(2),270-279.
- Gupta, S.C., Siddique, H.R., Mathur, N., Mishra, R.K., Mitra, K., Saxena, D.K. y Chowdhuri, D.K. (2007). Adverse effect of organophosphate compounds, dichlorvos and chlorpyrifos in the reproductive tissues of transgenic *Drosophila melanogaster*: 70 kDa heat shock protein as a marker of cellular damage. *Toxicology*, 238(1),1–14.

- Hälmström, I., Sundvall, A., Rannug, U., Grafström, R. y Ramel, C. (1981a). The metabolism of drugs and carcinogens in isolated subcellular fractions of *Drosophila melanogaster*. 1. Activation of vinyl chloride, 2-aminoanthracene and benzo [a] pyrene as measured by mutagenic effects in *Salmonella thymimurium*. *Chem. Biol. Interactions*, 34(2),129-143.
- Hälmström I., y Grafstrom, R. (1981b). The metabolism of drugs and carcinogens in isolated subcellular fractions of *drosophila melanogaster*. Enzyme induction and metabolism of benzo a pyrene. *Chem.-Biol. Interactions*, 34(2),145-159.
- Hecht, N.B. (1986). Regulation of gene expression during mammalian spermatogenesis. En: Rossant, J. y Pederson, R.A.(Eds.). *Experimental Approaches to Mammalian Embryonic Development*. (pp.151-193). New York: Cambridge University Pres.
- Hecht, N.B. (1987). Gene expresión during sprmatogenesis. *Ann.NY Acad.Sci.*, 513,90-101.
- Heifetz, Y., Lung, O., Frongillo, E.A.Jr. y Wolfner, M.F. (2000). The *Drosophila* seminal fluid protein Acp26Aa stimulates release of oocytes by the ovary, *Current Biology*, 10(2),99–102.
- Heifetz, Y., Yu, J. y Wolfner, M.F. (2001). Ovulation triggers activation of *Drosophila* Oocytes. *Developmental Biology*, 234(2),416-424.
- Henning, W. (1986). Heterochromatin and germ-line restricted DNA. En: Henning, W. (Ed.). *Germ line-soma differentiation. Results and problems in cell differentiation* (Vol.13 pp.17-192) Berlin: Springer.
- Henning, W. y Kremer, H. (1991). Spermatogenesis of *Drosophila hydei*. *Int. Rev. cytol.* 123,129-176.
- Hosken, D. J. y Hodgson, D. J. (2014). Why do sperm carry RNA? Relatedness, conflict, and control', *Trends in Ecology and Evolution*, 29(8),451–455.
- Hunter, C.M. y Singh, N. (2014). Do males matter? Testing the effects of male genetic background on female meiotic crossover rates in *Drosophila*. *Evolution*, 68(9),2718- 2726.
- Huynh, J.R. (2006). Fusome as a cell-cell communication channel of *Drosophila* ovarian cyts. En: *Cell-Cell Channels* (pp.217-235). New York: Springer.
- Huynh, J.R. y St Johnston, D. (2004). The origin of asymmetry: early polarisation of the *Drosophila* germline cyst and oocyte. *Current Biology*, 14(11),R438-R449.
- Hughes, S.E., Miller, D.E., Miller, A.L. y Hawley, R.S. (2018). Female meiosis Synapsis, recombination, and segregation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 208(3),875-908.
- Hryciw, T., Tang, M., Fontanie, T. y Xiao, W. (2002). *MMS1* protects against replication-dependent DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics*, 266(5),848-857).
- IARC. (1990). IARC Monographs, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals.
- IPCS (2001). International Programme on Chemical Safety.Principles for evaluating health risks to reproduction associated with exposure to chemicals. World Health Organization.
- Islas, G.M. (2006). Aislamiento de organismos sensibles y resistentes a xenobióticos en cepas de *Drosophila melanogaster* (Tesis de maestría). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Jaglarz, M.K. y Howard, K. R. (1994). Primordial germ cell migration in *Drosophila melanogaster* is controlled by somatic tissue. *Development* ,120,83–89.

- Jaklevic, B.R. y Su, T.T. (2004). Relative contribution of DNA repair, cell cycle checkpoints, and cell death to survival after DNA damage in *Drosophila* larvae. *Current Biology*, 14(1),23-32.
- Jayaramaiah, S. y Renkawitz-Pohl, R. (2005). Replacement by *Drosophila melanogaster* protamines and Mst77F of histones during chromatin condensation in late spermatids and role of sesame in the removal of these proteins from the male pronucleus. *Molecular and Cellular Biology*, 25(14),6165-6177.
- Jeffer, P.S., Holmes, E.C. y Ashburner. M. (1994). The molecular evolution of the alcohol dehydrogenase and alcohol dehydrogenase-related genes in the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Mol.Biol.Evol*, 11(2),287-304.
- Kaina, B. (2004). Mechanisms and consequences of methylating agent-induced SCEs and chromosomal aberrations: a long road traveled and still a far way to go. *Cytogenet Genome Research*, 104(1-4),77-86.
- Kaufman, B.P., Gay, H. y McElderry, M.J. (1957). Effect of ribonuclease on crossing over in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 42(3),255-261.
- Kaufman, T.C. (1969). [New mutants report.] *Dros. Inf. Serv.* 44,44 (<http://flybase.org/>)
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H y Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26(4),239-57.
- King, R. C. y Burnett, R.G. (1959). Autoradiographic study of uptake of tritiated glycine, thymidine, and uridine by fruit fly ovaries. *Science*, 129(3364),1674–1675.
- King, R.C. (1970). *Ovarian Development in Drosophila melanogaster*. New York: Academic Press.
- Klaassen, C. D. y Watkins. (2005) Casarett y Doull: Fundamentos de Toxicología. España: McGraw-Hill Companies.
- Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M. y Zhao, X. (2012). Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Research*, 40(13),5795-818.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B. y Melino, G.(2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.*, 6(1),3-11.
- Kubli, E. (2003). Sex-peptides: seminal peptides of the *Drosophila* male. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(8),1689–1704.
- Lasko, P.F. y Ashburner, M. (1990). Posterior localization of *vasa* protein correlates with, but is not sufficient for, pole cell development. *Genes Dev.*, 4(6),905-921.
- Laver, J.D., Li, X., Ray, D., Cook, K.B., Hahn, N.A, Nabeel-Shah, S., Kekis, M., Luo, H., Marsolais, A.J., Fung, K.Y., Hughes, T.R., Westwood, J.T., Sidhu, S.S., Morris, Q., Lipshitz, H.D. y Smibert, C. (2015). Brain tumor is a sequence-specific RNA-binding protein that directs maternal mRNA clearance during the *Drosophila* maternal-to-zygotic transition. *Genome Biol*, 12,19-94.
- Lee, W.R., Abrahamson, S., Valencia, R., von Halle, E.S., Würigler, F.E. y Zimmering, S. (1983). The sex-linked recessive lethal test for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*: A report of the U.S. environmental protection agency Gene-Tox program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 123(2),183-279.

- Lehmann, R. (1995). Establishment of embryonic polarity during *Drosophila* oogenesis. *Sem. Dev.Biol.* 6:25-38.
- Lehmann, R. (2012). Germline Stem Cells: Origin and Destiny. *Cell Stem Cell*, 10(6),729-739.
- Lesch, B. J. y Page, D. (2012). Genetics of germ cell development. *Nature Reviews Genetic*,13(11), 781-794.
- Levine, R.P. y Levine, E.E. (1955). Variable crossing over arising in different strains of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 40(3),399-405.
- Lindsley, D.L., Sander, L., Nicoletti, B. y Trippa, G. (1967). Genetic control of recombination in *Drosophila*. En: Peacock, W.J. y Brock, R.D. (Eds.) *Replication and recombination of genetic material* (pp.253-259). Australia: Australian Academy of Science.
- Lindsley, D.L., y Tokuyasu, K.T. (1980). Spermatogenesis. En: Ashburner, M. y Wright, T.R.F. (Eds.) *The Genetics and Biology of Drosophila* (Vol.2 d pp.225-294). London: Academic Press.
- Lindsley, D.L. y Zimm, G. (1992). *The genome of Drosophila melanogaster*. U.S.A.: Academic, Press, Inc.
- Lundby, Z., Camacho, J. y Allard, P. (2016). Fast Functional germline and epigenetic assays in the nematode *Caenorhabditis elegans*. En: Hao Zhu y Manghang Xia (eds) *High-Throughput Screening Assays in Toxicology. Methods in Molecular Biology*, vol. 1473. New York, NY. Human Press.
- Lynch, D.W., Schuler, R.L., Hood, R.D., Davies, D.G. (1991) Evaluation of *Drosophila* for Screening Developmental Toxicants: Test Results with Eighteen Chemicals as Presentation of a New *Drosophila* Bioassay. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* 11,147-173.
- Lovell, D. P. (2000). Dose-response and threshold-mediated mechanisms in mutagenesis: Statistical models and study design. *Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 464(1),87–95.
- Mahajan-Miklos, S. y Cooley, L. (1994). Intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Development Biology*, 165(2),336-351.
- Marcello, M. y Singson, A. (2010). Fertilization and the oocyte-to-embryo transition in *C. elegans*. *BMB Rep*, 43(6),389-399.
- Margolis, J. y Spradling, A. Identification and behavior of epithelial stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development*, 121(11),3797-3807.
- Markow, T. (2015). *Drosophila* reproduction; Molecules meet morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 112(27),8168–8169.
- Marshall, K.E. y Sinclair, B. (2010). Repeated stress exposure results in a survival-reproduction trade-off in *Drosophila melanogaster*. *Proc Biol Sci.*, 277(1683),963-969.
- Mavor, J.W. (1923). An effect of X rays on the linkage of Mendelian characters in the first chromosome of *Drosophila*. *Genetics*, 8(4),355-366.
- Mavor, J. W. y Svenson, H.K. (1924). An effect of X rays on the linkage of mendelian characters in the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 9(1),70-87.

- McCall, K. y Steller, H. (1998). 230-234. Requirement for DCP-1 caspase during *Drosophila* oogenesis. *Science*, 279(5348),230-234
- Mtango, N.R., Potireddy, S. y Latham, K.E., (2008). Oocyte quality and maternal control of development. *Int Rev Cell Mol Biol*, 268,223–290.
- Meza, N. (2015). Caracterización de la fecundidad como un marcador de resistencia en la respuesta genotóxica inducida por el uretano en *Drosophila melanogaster* (Tesis de Licenciatura). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Michell, G. y Combes, R.D. (1984). Mutation Test with the fruit fly *Drosophila melanogaster*. En: Venitt, S. y Parry, J.M. (eds), *Mutagenicity Testing: A practical approach* (pp.146-185). Oxford: IRL Press.
- Mickey, G.H. (1963). [New mutants report.] *Dros. Inf. Serv.* 38,28—30 (<http://flybase.org/>)
- Morgan, T.H. (1915). Localization of the heredity material in the germ cells. *Proc.Natl. Acad.Sci. USA*, 1(7),420-429.
- Morgan, T. H. (1919). *The Physical Basis of Heredity*. Philadelphia: J. B. Lippincott Company
- Morgan, T.H., Bridges, C.B., Muller, H.J. y Sturtevant, A.H. (1922). *The Mechanism of Mendelian Heredity*. Ed. Henry Holt and Company New York .
- Mousseau, T. A. y Fox, C. W. (1998). The adaptative significance of maternal effects., *Trends in Ecology & Evolution*, 13(10), 403–407.
- Müller, H.J. (1925). The regionally differential effect of X rays on crossing over in autosomes of *Drosophila*. *Genetics*, 10(5),470-507.
- Müller, H. J. (1930). The frequency of translocations produced by X-ray in *Drosophila*. *Genetics*, 15(4),283-311.
- Muñoz, A. (1995). Relación entre el tiempo de acción de dos mutágenos y el tamaño de mancha inducidos en células somáticas de las alas de *Drosophila melanogaster*. (Tesis de licenciatura). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Notinger, R. (1970). Sucrose density separation: a method for collecting large numbers of *Drosophila* larvae. *Dros. Inf. Serv*, 45,177.
- Nöthinger, R., Jonglez, M., Leuthold, M., Mierer-Gerschwiler, P. y Weber, T. (1989). Sex determination in the germ line of *Drosophila* depends on genetic signals and inductive somatic factors. *Development*, 107(3),505-518.
- OECD. (2001). Test No. 425. Guideline for testing of chemicals.
- Ogienko, A., Fedorova, S. A. y Baricheva, E.M. (2007). Basic aspects of ovarian development in *Drosophila melanogaster*. *Russian Journal of Genetics*, 43(10):1120-1134.
- O’Neil, M.J. (Ed.) (2013). *The Merck Index: An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*. 15th Edition. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Orr-Weaver, T. (1995). Meiosis in *Drosophila*: Seeing is believing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 10443-10449.

- Ouyang, K.J., Woo, L.L., Ellis, N.A. (2008). Homologous recombination and maintenance of genome integrity: cancer and aging through the prism of human RecQ helicases. *Mech Ageing Dev.*, 129(7-8),425-40.
- Page, A.W. y Orr- Weaver, T. L. (1997). Activation of the meiotic divisions in *Drosophila* oocytes. *Developmental Biology*, 183(2),195-207.
- Parkash, R. y Miglani, G. S. (1976.) Cytological Effects of Three Alkylating Agents in *Drosophila*. *Cytologia*, 41(3-4), 639–643.
- Parodi, D. A., Sjarif, J., Chen, Y. y Allard, P. (2015). Reproductive toxicity and meiotic dysfunction following exposure to the pesticides Maneb, Diazinon and Fenarimol. *Toxicology Research. Royal Society of Chemistry*, 4(3), 645–654.
- Pérez, A.M. (2008). Densidad de población y selección artificial para la producción de biomasa en *Drosophila melanogaster* (Tesis de Doctorado). Facultad de Biología, Universidad de Santiago Compostela. España.
- Plough, H.H. (1917). The effect of temperature on crossing over in *drosophila*. *Jour. Exp. Zoöl.*, 24,147-209.
- Plough.H.H. (1921). Further studies on the effect of temperature on crossing over. *Jour. Exp.Zoöl.*, 32,187-202.
- Poirié, M, Niederer, E. y Steinmann-Zwicky, M. (1995). A sex-specific number of germ cells in embryonic gonads of *Drosophila*. *Development*, 21(6),1867–73.
- Powell, J.R. (1997). *Progress and prospects in Evolutionary Biology: The Drosophila model*. New York: Oxford University Press.
- Ramos, M.P., Abundis, H.M., Gaytán, J.C., Ordaz, M.G., Orozco, P.G., Maldonado, J., Hernández, J., González, E., Reyes, P., Galicia, E. G. y Muñoz, J.A. (1993). *Manual de laboratorio de genética para Drosophila melanogaster*. México: McGraw-Hill, México.
- Ramos-Morales, P., Ordaz, Ma. G., Dorantes, A., Rivas, H., Campos, P., Martínez, M. y Hernández, B. (2001). *Drosophila* as a biomonitor of water pollution. En: Butterworth, F., Ammara, G., y Gonsebatt, M. E. (Eds.) *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change 2* (pp. S120–S120). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers,
- Rathke. C., Baarends, W.M., Awe, S. y Renkawitz-Poh, R. (2015). Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim Biophys*, 1839(3),155-68.
- Repetto, J. M. y Repetto, K. G. (2009). *Toxicología Fundamental* (4ta Edición). Madrid, España: Díaz de Santos.
- Riparbelli, M.G. y Callaini, G. (1996). Meiotic spindle organization in fertilized *Drosophila* oocyte: presence of centrosomal components in the meiotic apparatus. *J Cell Sci.*, 109(Pt 5),911-918.
- Rivas, H. (1999). Participación de la reparación en el daño inducido por mutágenos con diferente actividad química: N-nitrosodimetilamina (DMN), metilmetano-sulfonato (MMS), colchicina, azida de sodio y cloruro de plomo (Tesis de licenciatura). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México.

- Roth, S. y Lynch, J.A. (2009). Symmetry breaking during *Drosophila* oogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 1(2), a001891.
- Rubin, G. y Lewis, E. (2000). A brief history of *Drosophila*'s contributions to genome research. *Science*, 287(5461), 2216-2218.
- Russo, C., Takezaki, N. y Nei, M. (1995). Molecular phylogeny and divergence times of drosophilid species. *Mol. Biol. Evol.*, 12(3), 391-404.
- Salz, H. K. y Erickson, J. W. (2010). Sex determination in *Drosophila*. The view from the top. *Fly (Austin)*, 4(1), 60-70.
- Santos, A. y Lehmann, R. (2004). Germ cell specification and migration in *Drosophila* and beyond. *Current Biology*, 14(14), 578-589.
- Schupbach, T. y Wieschaus, E. (1986). Germline autonomy of maternal-effect mutations altering the embryonic body pattern of *Drosophila*. *Developmental Biology*, 113(2), 443-448.
- Sekelsky J. DNA Repair in *Drosophila*: Mutagens, Models, and Missing Genes. *Genetics*, 205(2), 471-490.
- Sgrò, C.M. y Hoffmann, A.A. (2004). Genetic correlations, tradeoffs and environmental variation. *Heredity (Edinb)*, 93(3), 241-8.
- Shelby, M.D., Bishop, J.B., Mason, J.M., Tindall, K.R. (1993). Fertility, reproduction and genetic disease: studies on the mutagenic effects of environmental agents on mammalian germ cells. *Environmental Health Perspectives*, 100, 283-291.
- Singh, K., Kochar, E. y Prasad, N. G. (2015). Egg viability, mating frequency and male mating ability evolve in populations of *drosophila melanogaster* selected for resistance to cold shock., *PLoS ONE*, 10(6), 1-20.
- Singer, T. y Yauk, C. L. (2010). Germ cell mutagens: risk assessment challenges in the 21st century. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51, 919-928.
- Schmidt, P.S. y Paaby, A.B. (2008). Reproductive diapause and life-history clines in North American populations of *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 62(5), 1204-1215.
- Sobels, F.H. (1974). The advantages of *Drosophila* for mutation studies, *Mutation Research*, 26, 277-284.
- Sobels, F. H. y Vogel, E.W. (1976). The capacity of *Drosophila* for detecting relevant genetic damage. *Mutation Research*, 41, 95-106.
- Sokal, R.R., Ehrlich, P.R., Hunter, P.E. y Schlager, G. (1960). Some factors affecting pupation site of *Drosophila*. *Annals of the Entomological Society of America*, 53(2), 174-182.
- Sonnenblick, B.P. (1941). Germ cell movements and sex differentiation of the gonads in the *Drosophila* embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 27(10), 484-489.
- Sonnenblick, B.P. (1950). The early embryology of *Drosophila melanogaster*. En Demerec, M. (Ed.) *Biology of Drosophila* (pp. 62-167). New York: Wiley.
- Spradling, A.C. (1993). Developmental genetics of oogenesis. En: Martinez-Arias, M. y Bate, A. (Ed.) *The Development of Drosophila melanogaster* (pp. 1-70). New York: Cold Spring Harbor Press.
- Steinmann-Zwicky, M., Schmid, H. y Nothiger, R. (1989). Cell-autonomous and inductive signals can determine the sex of the germ line of *Drosophila* by regulating the gene *Sxl*. *Cell*, 57(1), 157-166.

- Steinmann-Zwicky, M. (1994). Sex determination of the *Drosophila* germ line: tra and dsx control somatic inductive signals. *Development*, 120(3),707-716.
- Stern, C. (1926). An effect of temperatura and age on crossing-over in the first chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ,12(8), 530-532.
- Sturtevant, A.H. (1913). The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. *Journal of Experimental Zoology*, 14,43-59.
- Sullivan, W., Ashburner, R. y Hawley, S. (Eds.) (2000). *Drosophila protocols*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Susiarjo, M., Rubio, C. y Hunt, P. (2009). Analyzing mammalian female meiosis. *Methods Mol Biol.*, 558,339-54.
- Susuki, D. T. (1964). Effects of mitomycin C on crossing over in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 51(4),635-640.
- Tang, H.M., Fung, M.C. y Tang, H.L. (2018). Detecting Anastasis In Vivo by Caspase Tracker Biosensor. *J Vis Exp.*, 132, e54107.
- Trujillo, Y. (2015). Evaluación del desempeño reproductivo de *Drosophila melanogaster* en relación con el daño genético (Tesis de maestría). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Truong, L., Simonich, M.T. y Tanguay, R.L. (2016). Better, faster, cheaper: Getting the most out of high-Throughput Screening with Zebrafish. En: Hao Zhu y Manghang Xia (eds.) *High-Throughput Screening Assays in Toxicology. Methods in Molecular Biology*, vol. 1473. New York, NY, Human press.
- Tuncel, G. y Kalkan, R. (2019). Importance of m N6-methyladenosine (m6A) RNA modification in cancer. *Med Oncol*, 16;36(4),36.
- Valencia, R., Mason, J.M., Woodruff, R.C. y Zimmering, S. (1985). Chemical mutagenesis testing in *Drosophila* III. Results of 48 coded compounds tested for the National Toxicology Program. *Environmental Mutagenesis*. 7,325-34.
- Valentin, J. (1973). Characterization of a meiotic control gene affecting recombination in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas*, 75,5-22.
- VanDerOost, R., Porte-Visa, C. y Van-den-Brink, N. W. (2005). Biomarkers in environmental assessment. En: den Besten, P. J. y Munawar, M. (Eds.). *Ecotoxicological Testing of Marine and Freshwater Ecosystems Emerging Techniques, Trends, and Strategies*. (pp.89-152) New York: CRC PRESS Taylor and Francis Group.
- Vogel, E.W. (1974). Some aspects of the detection of potential mutagenic agents in *Drosophila*. *Mutation Research*, 29,241-250.
- Vogel, E.W. (1985). Summary report on the performance of the *Drosophila* assays, En Ashby, J., de Serres, F., Shelby, M., Margolin, B., Ishidate, M. y Becking, G. (Eds.), *Progress in Mutation Research: Volume 5. Evaluation of short-term tests for carcinogens: Report of the International Programme on Chemical Safety's collaborative study on in vitro assays* (pp. 47-57). Amsterdam, Netherlands: Elsevier.

- Vogel, E.W. (1987). Evaluation of potential mammalian genotoxins using *Drosophila*: the need for a change in test strategy. *Mutagenesis*, 2(3),161-171.
- Vogel, E. W. y Zijlstra, J. A. (1987). Somatic cell mutagenesis in *Drosophila melanogaster* in comparison with genetic damage in early germ-cell stages. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 180(2),189–200.
- Vogel, E.W. (1989). Somatic Mutation and Recombination Test SMART in *Drosophila melanogaster* the w/w+ eye mosaic technique. Description of its basic application. Department of radiation genetics & Chemical mutagenesis. Sylvius Laboratories Wasswaarseweg, The Netherlands.
- Vogel, E. W. y Nivard, M. J. M. (1997). The response of germ cells to ethylene oxide, propylene oxide, propylene imine and methyl methanesulfonate is a matter of cell stage-related DNA repair. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 29(2),124–135.
- Vogel, E.W. y Nivard, M.M. (1999). A novel method for the parallel monitoring of mitotic recombination and clastogenicity in somatic cells *in vivo*. *Mutation Research*, 431(1),141-153.
- Waddington, C.H. y Okada, E. (1960). Some degenerative phenomena in *Drosophila* ovaries. *Journal Embryology Experimental and Morphology*, 8,341-8.
- Wakimoto, B. T., Lindsley, D. L. y Herrera, C. (2004). Toward a Comprehensive Genetic Analysis of Male Fertility in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 167(1), 207–216.
- White-Cooper, H. (2009). Studying how flies make sperm- Investigating gene function in *Drosophila* testes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 306(1-2),67-74.
- Whittinghill, M. (1951). Some effects of gamma rays on recombination and on crossing over in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 36(4),332-355.
- Wieschaus, E. y Szabad, J. (1979). The development and function of the female germ line in *Drosophila melanogaster*: a cell lineage study. *Developmental Biology*, 68(1),29-46.
- Wieschaus, E., Audit, C. y Masson, M. (1981). A clonal analysis of the roles of somatic cells and germ line during oogenesis in *Drosophila*. *Development Biology*, 88(1),92-103.
- Williamson, A. y Lehmann, R. (1996). Germ cell development in *Drosophila*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 12:365-391.
- Winder, C. y Bonin, T. (1993). The genotoxicity of lead. *Mutations Research*, 285,117-124.
- Wyatt, M. D. y Pittman, D. L. (2006). Methylating agents and DNA repair responses: methylated bases and sources of strand breaks. *Chem Res Toxicol*, 19(12),1580–1594.
- Würgler, F.E. y Graf, U. (1985). Mutagenicity Testing with *Drosophila Melanogaster*. En: Muhammed, A., von Borstel, R.C. y Woslyng D. (eds), *Basic and Applied Mutagenesis*. (pp.343-372). Boston, MA: Basic Life Sciences. Springer.
- Würgler, F.E. (1991). Effects of chemical and physical agents on recombination events in cells of germ line of male and female *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 250,275-290.
- Wyrobek, A.J., Mulvihill, J.J., Wassom, J. S., Malling, H. V., Shelby, M.D., Lewis, S. E., Witt, K. L., Preston, R. J., Perreault, S. D., Allen, J.W., DeMarini, D. M., Woychik, R. P., Bishop, J. B. (2007).

Assessing Human Germ-Cell Mutagenesis in the Postgenome Era: A Celebration of the Legacy of William Lawson (Bill) Russell. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 48(2),71–95.

- Yamamoto, I. Kosinski, M. y Greenstein, D. (2006). Start me up: cell signaling and the journey from oocyte to embryo in *Ceanobarditis elegans*. *Dev Dyn*, 235(3),571-585.
- Yauk, C.L., Argueso, J.L., Auerbach, S.S., Awadalla, P., Davis, S.R., DeMarini, D.M., Douglas, G. R., Dubrova, Y.E., Elespuru, R. K., Glover T. W., Hales, B. F., Hurles, M. E., Klein,C. B., Lupski, J.R., Manchester,D. K., Marchetti, F., Montpetit, A., Mulvihill,J. J., Robaire, B., Robbins, W. A., Rouleau, G.A., Shaughnessy, D. T., Somers, C.M., Taylor VI, J.G., Trasler, J., Waters, M. D., Wilson, T. E., Witt, K. L., Bishop,J.B. (2013). Harnessing genomics to identify environmental determinants of heritable diseases. *Mutation Research*, 752,6-9.
- Yauk, C.L., Aardema, M. J., van Benthemc, J., Bishop, J. B., Dearfielde, K. L., DeMarini, D. M., Dubrova, Y. E., Honmah, M., Lupski, J. R., Marchetti, F., Meistrich, M. L., Pacchierotti, F., Stewart, J., Waters, M. D., Douglas, G. R. (2015a). Approaches for identifying germ cell mutagens: Report of the 2013 IWGT workshop on germ cell assays. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 783,36–54.
- Yauk, C.L., Lambert, I.B., Meek, M.E.(Bette), Douglas, G.R., Marchetti, F. (2015b). Development of the adverse outcome pathway “alkylation of DNA in male premeiotic germ cells leading to heritable mutations” Using the OECD’s Users’ Handbook Supplement. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 56,724-750.
- Zijilstra, J.A. y Vogel, E. W. (1988). Metabolic inactivation of mutagens in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 198(1),73-83.
- Zimmering S., Mason J. y Osgood C. (1986). Current satus of aneuploidy testing in *Drosophila*. *Mutation Research*, 167,71-87.