



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Evaluación del efecto tóxico de dietas
hipercalóricas ricas en ácido palmítico y/o fructosa
en *Drosophila melanogaster* (Insecta,
Drosophilidae) cepa Oregon R (R)-flare”.

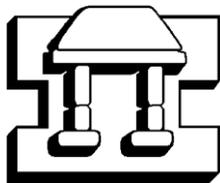
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

Francisco Javier González Ramírez



IZTACALA

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. Irma Elena Dueñas García

Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

Recuerdo tu cara, tu voz, tu olor y me duele que ahora sean sólo eso, un recuerdo. María de la Luz, fuiste mi madre de crianza y más, gracias por todo tu amor, comprensión y mano dura. El presente escrito está dedicado a ti porque no es que ya no estés a mi lado, es sólo que ahora vives en mi memoria. Da por seguro que todo lo que sembraste dará frutos, así que sólo te diré que donde quiera que estés haré que te sientas orgullosa de mí.

A mi madre por el amor y devoción que tienes por tus hijos, por el apoyo e incondicional que siempre me has dado, haberme enseñado lo que significa perseverancia y esfuerzo, por demostrarme que la superación siempre comienza por uno mismo, por estar ahí en todo momento, por tu amor, tu mano amiga y tu sabiduría infinita. Gracias por haber hecho de mi un hombre de bien, espero algún día poder pagarte todo lo que has dado por mí.

El compañero perfecto es aquél que inspira, motiva y fuerza a sacar lo mejor de uno mismo, en el que se puede confiar cualquier tarea sin miedo de los resultados porque se sabe de antemano que no habrá ni fallas ni errores. Y es por ello que en estas líneas se encuentra Karla, mi amiga y compañera de vida, te dedico esto por formar parte de mi formación académica y más importante aún, de mi crecimiento personal. Te considero la encarnación de la responsabilidad, equidad y respeto y te doy gracias por ser el ejemplo perfecto para mí. Sé muy bien que agradecer sobre un papel no basta, es por ello que me encargaré que el tiempo lo haga. Da más está decir que el presente escrito es un logro de ambos porque ya sea en campo, en laboratorio o separados siempre seremos equipo.

A Fernanda por forzarme a ser alguien en quien pudiera ver lo que significa dedicación, y no sólo eso, alguien del cuál sentirse orgullosa. Traté de proyectar en mí quien yo mismo quería que fueras tú, pero con tu propia identidad, con ese carisma y esa insensatez que me hace reír a carcajadas. Debes saber que el amor de hermanos no se expresa ni se comunica, se siente. Y espero que mis sentimientos te hayan alcanzado. Asimismo, sé que eres consciente de que espero

grandes cosas de ti, así que no hace falta esperar a que se hagan realidad, sino que me quedaré esperando a verlo realizado.

A mi familia, porque me considero más un Ramírez que González, gracias por apoyarme, por brindarme los medios necesarios para continuar haciendo lo que me apasiona y por siempre escucharme, el demostrar interés por lo que hacía, todas sus actitudes para conmigo me motivaron a seguir adelante. No pude haber nacido bajo otra cuna, ni hubiese deseado hacerlo.

A Alfredo, Javier y José por acompañarme en este trayecto que se llamó licenciatura, por demostrar que el comer y dormir mal dan sus frutos, y que lo que se propone se cumple. Pocos amigos, pero bien elegidos.

AGRADECIMIENTOS

A mis compañeros de laboratorio, por comprender, soportar y apoyar en las necesidades de cada etapa del proyecto.

A la maestra Irma Dueñas por corregir mis errores y aplaudir mis aciertos.

A la maestra Laura Castañeda por esas pláticas de cualquier ámbito que me dejaron siempre con conocimiento nuevo.

A la maestra Maru Heres, por siempre dejarme más trabajo por hacer, inculcándome así el deseo por el conocimiento.

Y al maestro Luis Felipe, ya que sin él nunca hubiese llegado aquí, porque fue su conocimiento y pasión por su trabajo lo que me hizo querer seguir adelante.

Al personal del laboratorio de Inmunología en la Unidad de Morfofisiología de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Al proyecto PAPIIT cuya clave es DGAPA-PAPIIT-IN227619 ya que sin los medios económicos utilizados el proyecto no hubiese continuado.

TABLA DE CONTENIDO

Dedicatoria	2
Agradecimientos	3
Resumen	5
Introducción	6
<i>Fructosa y ácido palmítico</i>	9
Fructosa.....	9
Ácido palmítico.....	10
<i>Drosophila melanogaster como modelo biológico</i>	12
Antecedentes	14
Objetivo general	16
<i>Objetivos particulares</i>	16
Materiales y Método	17
<i>Análisis bromatológico del Medio Instantáneo Carolina</i>	17
Determinación de carbohidratos totales.....	17
Extracción de grasa total	17
Determinación de proteínas.....	17
<i>Estandarización de los medios cocinados</i>	18
Propagación y mantenimiento de las cepas	18
Elaboración de la Dieta Normal (DN).....	18
<i>Tratamientos hipercalóricos</i>	19
<i>Determinación del peso individual de larvas</i>	19
<i>Estandarización de las técnicas para obtener los homogeneizados de larvas de tercer estadio (96 ± 4h) de la cepa WT Canton S para la medición de triglicéridos, glucosa, ácido úrico y lípidos totales</i>	20
Elaboración del Buffer A (BA) para el procesamiento de larvas de tercer estadio de la cepa WT Canton S	22
Procesamiento de larvas de 3 ^{er} estadio para la medición de triglicéridos, glucosa, ácido úrico y lípidos totales	22
Resultados y discusión	23
<i>Análisis bromatológico del Medio Instantáneo Carolina y estandarización de los medios cocinados</i>	23
<i>Emergencia de Imagos Cultivados en las Diferentes Dietas</i>	25
Dieta normal.....	25
Dieta con ácido palmítico	27
Dieta con fructosa	29
<i>Determinación del peso individual de larvas</i>	31
Proporción sexual en <i>D. melanogaster</i>	32
<i>Medición de triglicéridos, glucosa, ácido úrico y lípidos totales en homogeneizados de larvas de tercer estadio (96 ± 4h) de la cepa WT Canton S</i>	35
Conclusiones	36
Bibliografía	37

RESUMEN

La obesidad y los problemas asociados a ella se han convertido en un problema a nivel global: En los países donde opera la OECD, uno de cada dos adultos y alrededor de uno de cada seis niños tienen sobrepeso u obesidad y algunos tienen patologías asociadas. Los compuestos evaluados, fructosa y ácido palmítico (AP) componen la dieta básica del humano, por lo que se propone a *Drosophila melanogaster* para evaluar el posible daño causado por ellos. Se realizó el análisis bromatológico del Medio Instantáneo Carolina® con el que se alimentan las cepas de *D. melanogaster* determinando 4.73% de proteínas, 94% de carbohidratos y 1.26% de lípidos. Se estandarizaron los medios cocinados Dieta Normal, para la propagación de las cepas Oregon R (R)-flare y WT Canton S, así como los ricos en fructosa y AP y se analizó el porcentaje de emergencia de adultos en cada uno de estos para determinar el o los más adecuados para su uso. Se alimentaron las cepas las cepas Oregon R (R)-flare y WT Canton S desde la fase huevo hasta el tercer estadio larval ($96 \pm 4h$), con fructosa 17%, AP 5% y el testigo cuya composición sólo contenía agua además del medio, se determinó el peso individual de larvas de la cepa Oregon R (R)-flare, tratadas y no tratadas. Los resultados del análisis bromatológico del Medio Instantáneo Carolina® demostraron una proporción de biomoléculas similar a los purés de papa comerciales, por lo que se decidió no usarlo para estudios relacionados con la nutrición. Las proporciones de AP y fructosa se decidieron con base en los resultados de experimentos previos. Colateralmente se estandarizaron las técnicas para la medición de triglicéridos, glucosa, ácido úrico y lípidos totales en larvas de la cepa WT Canton S.

Palabras Clave: *Drosophila melanogaster*, ácido palmítico, fructosa, bromatología, síndrome metabólico, peso, emergencia.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, nos encontramos en una época en la que la obesidad y el impacto socioeconómico es un problema a nivel global, uno de cada dos adultos y alrededor de uno de cada seis niños tienen sobrepeso u obesidad (OECD, 2017) y algunos tienen patologías cardíacas relacionadas con ello, tales como la apnea del sueño, hipoxia, arterosclerosis y enfermedades cardiovasculares, cuya interconexión se denomina síndrome metabólico (SMet), tratándose así de una entidad clínica compleja, que surge con variaciones fenotípicas amplias, en individuos con predisposición endógena, determinada genéticamente y condicionada por factores ambientales. Dicho padecimiento se compone de obesidad o sobrepeso, dislipidemia, hiperglucemia e hipertensión arterial. Estos factores de riesgo se asocian entre sí con una frecuencia más elevada de la esperada por efecto del azar y todos son factores de riesgo cardiovascular (Wilson *et al.*, 1999). La elevada mortalidad que causan la diabetes y la enfermedad cardiovascular en el mundo ha estimulado el estudio del síndrome metabólico. El SMet se caracteriza por la existencia de resistencia a la insulina e hiperinsulinismo compensador, asociados a trastornos del metabolismo hidrocarbonado, hipertensión arterial, alteraciones lipídicas (hipertrigliceridemia, descenso del c-HDL (colesterol ligado a las HDL), presencia de LDL tipo B (LDLs: lipoproteínas pequeñas y densas), aumento de ácidos grasos libres, y lipemia posprandial) y obesidad, con incremento de la morbimortalidad de origen aterosclerótico, lo que lo convierte en la principal causa de muerte en la población adulta (Kylin, 1923; Álamo, 2006; Gómez, 2011; Swinburn *et al.* 2011; Ng *et al.*, 2014).

En 1993, los resultados de la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas (ENEC) mostraron que la prevalencia de obesidad en adultos era de 21.5 %, mientras que con datos de la Encuesta Nacional de Salud 2000 se observó que 24 % de los adultos en nuestro país la padecían y, más recientemente, con mediciones obtenidas por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2006), se encontró que alrededor del 30 % de la población mayor de 20 años (mujeres, 34.5 %, hombres, 24.2 %) tiene obesidad (Olaiz-Fernández *et al.*, 2006).

En México, la prevalencia de sobrepeso y obesidad en los adultos se incrementó de 62 a 70 % en el periodo de 2001 a 2006. En el último siglo, los mexicanos aumentamos la densidad energética de nuestra dieta en casi 24 % (26 % más hidratos de carbono y 36 % más grasas) y hemos reducido el tiempo que destinamos a la actividad física (Olaiz-Fernández *et al.*, 2006; Ortiz-Hernández *et al.*, 2006). La consecuencia de este cambio en el balance de energía es la acumulación de grasa corporal, a la que llamamos obesidad, y no sólo eso, los pacientes que además desarrollan SMet tienen un mayor riesgo de sufrir complicaciones graves de salud como enfermedades oculares, eventos cardiovasculares y cáncer, así como una elevación de triglicéridos, reducción de lipoproteínas de alta densidad, aumento de la presión sanguínea y elevación de glucosa (Poh *et al.*, 2006; Huang, 2009; Pierdomenico & Cuccurullo, 2010; Kaur, 2014).

Una multitud de factores económicos y sociales han contribuido al aumento de esta enfermedad, así como la abundancia de alimentos procesados y baratos, con contenidos altos de carbohidratos y grasas saturadas en su composición (O'Brien y Dixon, 2002). Uno de estos componentes son los jarabes endulzantes altos en fructosa, los cuales son elaborados en forma masiva por la ruptura química de los almidones de excedentes de maíz amarillo (Lingelbach y McDonald, 2000).

En México, éstos son empleados principalmente por la industria de las frituras embolsadas y las bebidas carbonatadas, conocidas como "refrescos". Asimismo, son empleadas en bebidas para deportistas, ya que se transportan directamente al hígado donde se produce energía rápidamente, la cual es liberada en forma de adenosín trifosfato (ATP) o almacenada como glucógeno en el hígado sin causar elevación de la insulina en el plasma, posibilitando así la movilización de grasas a través del torrente sanguíneo a los órganos que requieren energía (Castillo-Urueta *et al.*, 2003). A continuación, se presenta una tabla con los principales productos con edulcorantes y/o con contenidos altos de carbohidratos y grasas saturadas en su composición (Tabla 1).

FRUCTOSA

La fructosa es un azúcar simple con fórmula química $C_6H_{12}O_6$, similar a la de la glucosa; ambas se reducen fácilmente a sorbitol tanto *in vitro* como *in vivo*; la fructosa difiere por la presencia de un grupo ceto unido al carbono 2 de la molécula (C2), en tanto, la glucosa presenta un grupo aldehído en el carbono 1 (C1) (O'Dell, 1993). Los productos principales de su metabolismo en la vía glucolítica son: glucosa, glucógeno, lactato y piruvato; otros en menor cantidad son oxidados a bióxido de carbono, cuerpos cetónicos o convertidos a triacilglicerol (Mayes, 1993; Pérez-Cruz *et al.*, 2007).

Al igual que la sacarosa, la fructosa se encuentra en el grupo de edulcorantes nutritivos reconocidos por la FDA (*Food and Drug Administration*) de los EE.UU. Estos edulcorantes tienen propiedades funcionales de acuerdo a sus características físicas, microbiales y químicas, como lo son: cristalización, viscosidad, preservación, fermentación, antioxidante; además de encontrarse principalmente en frutas y la miel que incluso puede contener hasta 50% de este azúcar y entre los alimentos industrializados se encuentran las bebidas carbonatadas, cereales, hamburguesas, salsa de tomate, mole, mermeladas, jugos y frutas en almíbar (Hanover, 1993; *American Dietetic Association*, 2004; Bray *et al.*, 2004).

En la Figura 1 se muestra la forma libre, en la que el oxígeno cetónico se encuentra en el C2 como en forma de hemicetal (en la que el oxígeno es compartido por los C2 y C5).

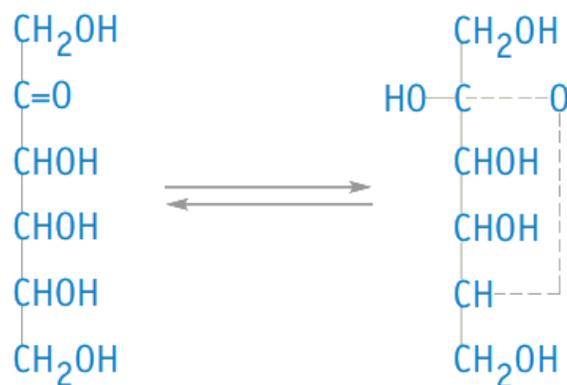


Fig. 1. Estructura química de la fructosa en forma libre.

ÁCIDO PALMÍTICO

El aceite de palma es un aceite vegetal procedente del fruto de la palmera (*Elaeis guineensis*), originaria de África occidental y actualmente muy extendida en las zonas tropicales de América y el sudeste asiático. De las semillas de la palmera se obtiene otro aceite vegetal, el aceite de palmiste, que tiene una composición diferente a la del aceite de palma y se utiliza principalmente para aplicaciones no alimentarias.

El aceite de palma es relativamente rico en ácidos grasos saturados (AGS), que representan aproximadamente la mitad de la grasa total. Los ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) y los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) representan aproximadamente el 40% y el 10%, respectivamente. El ácido palmítico, cuyo nombre proviene del árbol, es un ácido graso saturado de cadena larga (Figura 2), formado por dieciséis átomos de carbono y es el principal ácido graso que se produce de forma natural en los animales y los vegetales, así como el principal componente de las grasas de la leche humana. También es el ácido graso más abundante en el aceite de palma, seguido por el ácido oleico y el ácido linoleico (Read y Sarrif, 1965; Khosla y Sundram, 2010).

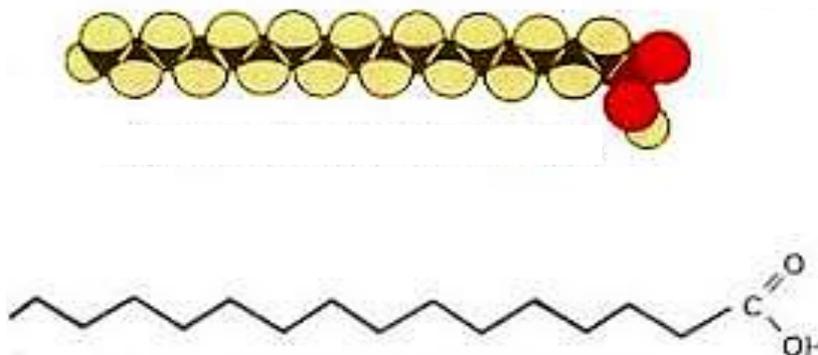


Fig. 2. Estructura química del ácido palmítico, el modelo compacto se muestra en la imagen superior y la fórmula esquemática en la inferior.

Además del contenido de ácidos grasos, el aceite de palma contiene varios fitonutrientes como α -, β -, γ - y δ - tocotrienoles; α -, β -, γ - y δ -tocoferoles (vitamina E); carotenoides; esteroides; fosfolípidos; glicolípidos y escualeno. La mayoría de estos compuestos se consideran beneficiosos para la salud humana, principalmente por su actividad antioxidante (Ong y Goh, 2002; Oguntibeju *et al.*, 2009).

En las últimas décadas, el desacuerdo entre los hallazgos y las opiniones con respecto a la capacidad del aceite de palma para aumentar la colesterolemia ha llevado a discusiones sobre si el aceite de palma es un alimento potencialmente insalubre. La razón principal parece ser su alto contenido de AGS, específicamente de ácido palmítico, el cual ha sido positivamente relacionado con los altos niveles de colesterol en el suero y, como consecuencia, a un aumento del riesgo de enfermedades cardiovasculares. Asimismo, un informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2003) declaró que había pruebas convincentes de que los ácidos mirístico y palmítico aumentan el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, algunas revisiones no parecen apoyar estas conclusiones (Edem, 2002; Ong y Goh, 2002; Sundram *et al.*, 2003; Mukherjee y Mitra 2009; McNamara, 2010; Oguntibeju *et al.*, 2009).

Drosophila melanogaster (*D. melanogaster*) conocida también como mosca de la fruta o del vinagre es un organismo eucarionte, holometábolo, cosmopolita, que comparte los mismos ambientes que el hombre (Vogel, 1987; Ramos, 1993). Posee solamente cuatro pares de cromosomas que han sido mapeados totalmente. Su genoma fue secuenciado en 1998 y actualmente se sabe que está compuesto por 18 millones de pares de bases que codifican para 14 mil genes y que el 60% de estos, tienen homología con genes que provocan enfermedades genéticas conocidas en el hombre y un 50% de sus secuencias proteicas tienen un análogo con mamíferos (Adams *et al.*, 2000). Debido a esto, *D. melanogaster* se está utilizando no sólo para el estudio de la Biología del Desarrollo y Genética sino también para el estudio de los procesos fisiológicos en vertebrados y de la etiología de las enfermedades humanas (González, 2007).

Como se ha mencionado anteriormente, *D. melanogaster* tiene cierta homología con el humano, como es el caso de algunas de las vías metabólicas y de señalización implicadas en el metabolismo de la grasa y la señalización de la insulina, así como sistemas de órganos análogos que controlan la absorción y el almacenamiento de lípidos, un ejemplo de ello son los *lipin*, una familia de genes implicados en el uso y almacenamiento de la grasa, presentes en el cuerpo graso, que funciona como el hígado y el tejido adiposo blanco humano, que se encarga de metabolizar nutrientes y almacenar reservas de glicógeno y lípidos (Heinrichsen y Haddad, 2012). Lo que convierte al insecto en el modelo idóneo para el estudio de desórdenes metabólicos (Chien *et al.* 2002; Baker y Thummel, 2007; Hoffman *et al.* 2013).

De manera general los organismos presentes en los tres dominios taxonómicos cuentan con un complejo de hemoproteínas denominados citocromos P450, de los que con diversos proyectos de secuenciación de genomas se ha identificado una gran cantidad de secuencias de los mismos en eucariotas, comprobando la acción catalizadora de sus enzimas en diversas reacciones importantes, tanto en los procesos de desarrollo como en la desintoxicación de compuestos extraños, sin embargo, las funciones de muchas de las diferentes enzimas de los Cyp450 en

insectos son desconocidas (Le Goff *et al.*, 2003; Lewis, 2004). Una excepción a lo anterior es la participación de los Cyp450 en la metabolización de las hormonas derivadas del colesterol, donde en *D. melanogaster* participan al menos seis (Gilbert, 2004). Continuando con las funciones enzimáticas de los Cyp450, los genes *Cyp302a1*, *Cyp306a1*, *Cyp315a1*, y *Cyp307a2* son expresados en las glándulas protorácicas de embriones tardíos y larvas y sus productos catalizan en la vía biosintética de la ecdisona, mientras que el producto del gen *Cyp314a1*, es responsable de catalizar la conversión de ecdisona a 20H es expresado en el intestino medio, los túbulos de Malpighi y el cuerpo graso (Chávez *et al.*, 2000; Ono *et al.*, 2000; Petryk *et al.*, 2003).

Como se ha mencionado, *D. melanogaster* ha fungido como un organismo modelo que ha permitido a los genetistas el descubrimiento de diversos procesos y mecanismos biológicos, para lo cual se han desarrollado cepas mutantes dedicadas a la investigación, entre las que se encuentran Oregon R(R)-flare (ORR (1)/ORR (2); *flr³ /Bd^S*) y flare (*flr³ /Bd^S* (Dueñas *et al.*, 2001). Siendo la primera de éstas resistente al insecticida conocido como DDT, debido a sus altos niveles de expresión de citocromos P450 por la acción del gen *Cyp6A2*, cuyo producto tiene la capacidad de metabolizar insecticidas, mientras que la segunda posee unos niveles basales de los Cyp450 (Dunkov *et al.*, 1997). De este mismo modo se han caracterizado las funciones de numerosos P450, las cuales son esenciales en mamíferos, insectos y en plantas. Por ejemplo, en humanos el *CYP17A1* y *CYP19A1* que catalizan pasos en la producción de andrógenos y estrógenos (Hakki y Bernhardt, 2006), en el caso de *Drosophila*, se han identificado 106 genes *Cyp450* (FlyBase, 2015) de los cuales se conoce la función de 23 (173 alelos) (Flybase, 2018), 7 relacionados con el metabolismo de la ecdisona, 27 transportadores de electrones deducidos por su secuencia y 42 genes activos en la fase larvaria; dentro de los cuales, el locus del DDT-R que confiere resistencia a DDT-R se asocia con la sobreexpresión de uno solo, *Cyp6g1* (2R: 12,185,667...12,188,431). El papel de este gen en la resistencia al DDT fue encontrado por el mapeo genético de resistencia al DDT y análisis de microarreglos de P450 en Hikone-R, una cepa resistente aislada de las colecciones de campo (Daborn *et al.*, 2002).

ANTECEDENTES

Las cualidades genéticas y de fácil crianza de *D. melanogaster* han permitido una amplia gama de investigaciones, tal es el caso de Lee y colaboradores (2008), quienes evaluaron la influencia de la sobre nutrición e infra nutrición en los parámetros fisiológicos, incluyendo las concentraciones de triacilglicéridos y proteínas, lo cual radica principalmente en la producción de huevos y esperanza de vida del insecto. Aunado a ello Negre-Salvayre y colaboradores (2009) probaron los cambios en el metabolismo al administrarse fructosa en altas dosis, desarrollando enfermedades como la obesidad y SMet, además de comprometer la salud y acelerar el ritmo del envejecimiento en *D. melanogaster*.

Piper y colaboradores (2005) utilizando a *Drosophila* como modelo, han identificado la relación entre la dieta y el metabolismo, y describen algunos parámetros como la diabetes, enfermedades del corazón y la esperanza de vida, asociados a la obesidad y el exceso de grasa corporal. Aunado a esto, Musselman y colaboradores en (2011) demostraron que una dieta de concentraciones altas de azúcar produce hiperglucemia en la cepa silvestre (WT, por sus siglas en inglés) *Canton-S Drosophila* (*WT Canton-S*). Asimismo, Driver y colaboradores (1979, 1980) demostraron que las grasas saturadas en las dietas disminuyen tanto la vida media como la vida máxima de *Drosophila*. Los dos trabajos anteriores corresponden a los primeros estudios que intentaron hacer una conexión entre los componentes de la dieta de *Drosophila* y la longevidad, encontrando que las dietas que consisten en grasas saturadas altas (tales como el ácido palmítico) y bajas en carbohidratos (como la fructosa o sacarosa) acortan, en promedio, la vida útil de *Drosophila* comparada con las moscas alimentadas con dietas "control" altas en carbohidratos y bajas en grasas saturadas.

D. melanogaster posee una serie de ventajas para la investigación, entre las que destacan: su dimorfismo sexual, su tasa elevada de fecundidad, su tamaño, que permite cultivar un número considerable de individuos en un espacio reducido; además de ser un sistema económico y de fácil manipulación, su ciclo de vida es corto (10-12 días) en condiciones controladas (25°C y 60% de humedad relativa)

(Figura 3) (Würgler *et al.*, 1984). Con esto, se puede concluir que el vasto conocimiento de la biología y genética del insecto, así como su mantenimiento simple lo convierten en un excelente candidato para realizar estudios en diferentes disciplinas, entre los que destacan procesos celulares, genéticos, biología del desarrollo, así como de genotoxicidad y anti-genotoxicidad (Graf *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2004; Fong *et al.*, 2008). Por lo anterior, se propone a *Drosophila melanogaster* como un modelo para contribuir a la comprensión de las consecuencias asociadas al sobreconsumo de fructosa y ácido palmítico y el posible papel que desempeña la sobreexposición a estos nutrientes en el desarrollo de patologías metabólicas.

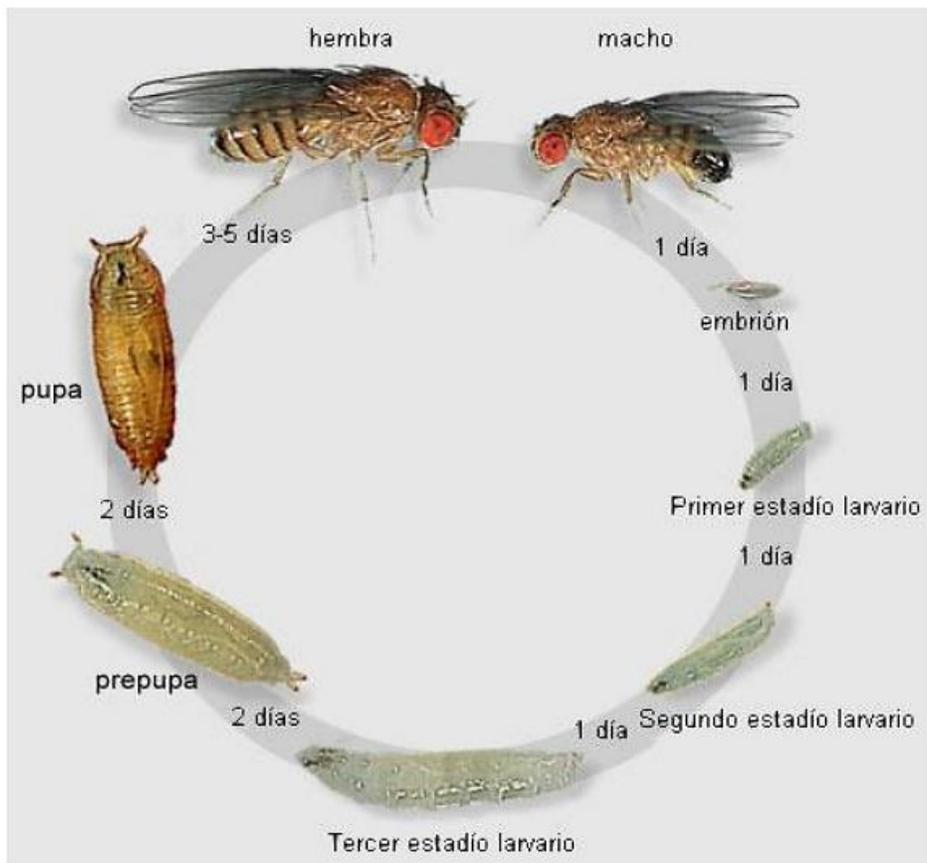


Fig. 3. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*, bajo condiciones ambientales controladas

El presente trabajo forma parte del proyecto titulado “Análisis transcriptómico de dos cepas de *D. melanogaster* expuestas a dos dietas hipercalóricas ricas en ácido palmítico y/o fructosa” cuya clave es DGAPA-PAPIIT-IN227619.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto de dietas hipercalóricas enriquecidas con ácido palmítico y/o fructuosa en la emergencia y sexo de *Drosophila melanogaster* cepa OR(R)-flare.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar análisis bromatológico del Medio Instantáneo Carolina®.
2. Estandarización de los medios cocinados: dieta normal para la propagación de la cepa y control, así como los ricos en fructosa y ácido palmítico.
3. Realizar los tratamientos desde la fase huevo hasta el tercer estadio larval ($96 \pm 4h$) de la cepa Oregon R (R)-flare, con fructosa %, AP% y su control respectivo.
4. Analizar el porcentaje de emergencia para determinar cuál de los medios cocinados es el más adecuado para su uso.
5. Determinar el peso individual de larvas ($96 \pm 4h$) de la cepa Oregon R (R)-flare, con fructosa %, AP% y su control respectivo.
6. Estandarizar las técnicas para obtener los homogeneizados de larvas de tercer estadio ($96 \pm 4h$) de la cepa WT Canton S para la medición de triglicéridos, glucosa, ácido úrico y lípidos totales.

MATERIALES Y MÉTODO

En la actualidad se han utilizado diversos medios de cultivo para la crianza y propagación de *D. melanogaster*, los cuales contienen lo necesario para estas tareas, en el laboratorio de Genética Toxicológica de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala se emplea para los tratamientos el “Medio Instantáneo Carolina (*Drosophila Instant Medium*, DIM)” el cual es resistente al moho, contiene un amortiguador que estabiliza el pH, no necesita cocción ni esterilización y sólo requiere agua bidestilada para obtener un medio nutritivo. Sin embargo, su composición no ha sido descrita, ya que se trata de un secreto industrial. Por lo cual se decidió realizar un análisis bromatológico del mismo.

ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DEL MEDIO INSTANTÁNEO CAROLINA

DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES

Se utilizó el método de antrona, descrito por Wilham (1971). Utilizando 10 mg de DIM y 60 mL de ácido sulfúrico. Se registró la absorbancia a 630 nm. Posteriormente se hizo una estimación de las concentraciones de los azúcares a partir de una curva patrón con glucosa desde 20 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, tal y como se menciona en lo elaborado por Osborne y Vooght (1978).

EXTRACCIÓN DE GRASA TOTAL

Se hizo uso de la técnica descrita por González y Peñalosa (2000), utilizando Soxhlet Corning-Pyrex Modelo 3840-XL y hexano de la marca Sigma-Aldrich® como solvente.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Se utilizó el método de Kjeldahl usando 0.05 g de DIM con 60 mL de mezcla catalizadora (1 g óxido de mercurio, 99 g de sulfato de potasio anhidro y 0.18 g sulfato de cobre pentahidratado) y solución indicadora, tal como lo mencionan González y Peñalosa (2000).

ESTANDARIZACIÓN DE LOS MEDIOS COCINADOS

Una vez que la composición del DIM fue develada, se propuso desarrollar la estandarización de un nuevo medio cocinado que cumpliera con los requerimientos nutrimentales para los experimentos subsecuentes, y además determinar las concentraciones porcentuales de la fructosa o el ácido palmítico que permitieran el crecimiento y el desarrollo de las cepas de *D. melanogaster* (*WT Canton-S* y *Oregon-R (R)-flare*), sin comprometer las condiciones hipercalóricas de los medios.

PROPAGACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS

Para los objetivos 1 - 5 se utilizaron moscas *Drosophila melanogaster* cepa *Oregon-R (R)-flare* y para el objetivo 6 la cepa *WT Canton S*, ambas provenientes del laboratorio de Genética Toxicológica, ubicado en las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Las cepas fueron colocadas dentro de frascos de vidrio de 250 mL, que contenían 20 mL de la dieta normal (DN). Posteriormente fueron mantenidas dentro de una incubadora a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ con ciclos de luz-oscuridad de 12 h y con una humedad relativa del 80%.

ELABORACIÓN DE LA DIETA NORMAL (DN)

Para la preparación de 100 mL de medio DN cocinado, de acuerdo con Hemphill y colaboradores (2018) se utilizaron: 2.6% de harina de maíz amarillo Maseca®, 4% levadura inactiva seca Tradi-Pan®, 4% de agar Golden Coins®, 3% de sacarosa; Se agregaron 80 mL de agua corriente y se mezclaron con una cuchara de madera, al mismo tiempo que se comenzó a elevar la temperatura con la parrilla eléctrica. Una vez que la mezcla hirvió se adicionaron 1.5% de tegosept y 0.3% de ácido propiónico de la marca Sigma-Aldrich®.

Transcurridos 35 min desde que se le agregaron los últimos compuestos se apagó la parrilla y se vertieron 3 mL en cada tubo de vidrio de 20 mL de capacidad y estériles. Se taparon con tul y se dejaron en reposo por 24h a temperatura ambiente, lo cual permitió la solidificación del medio, así como la evaporación total del agua

en las paredes de los tubos. Los insectos utilizados en cada uno de los experimentos correspondieron a la F₃ sometidas a DN.

TRATAMIENTOS HIPERCALÓRICOS

Para las dietas altas en grasa (DAG) se agregó 3.2% de ácido palmítico a la DN, mientras que para la elaboración de la dieta alta en fructosa (DAF) se adicionó 17% de fructosa a la DN. Como se mencionó anteriormente, ambas dietas contienen las mismas proporciones de los demás compuestos, y se siguieron los mismos pasos para la respectiva elaboración.

Una vez que todos los medios fueron elaborados (DN, DAF y DAG) se colocó una pareja de moscas en cada uno de los cinco tubos por tratamiento, dejándolos ovopositar durante 96 ± 4 h, tras lo cual se retiraron y se siguió el curso de la F₁ manteniéndolos a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, con ciclos de luz-oscuridad de 12 h cada uno y humedad relativa del 80%. Se hicieron tres experimentos independientes cada uno con las cinco réplicas descritas.

DETERMINACIÓN DEL PESO INDIVIDUAL DE LARVAS

Mientras los tratamientos crónicos con DAG, DAF y DN transcurrían, se recuperaron las larvas de $(96 \pm 4\text{h})$ de cada uno de los tubos de vidrio de 20 mL de cada tratamiento y se colocaron en cajas de Petri, la cual sirvió como tara en la balanza analítica Velab® modelo VE-204, posteriormente se colocaron en tandas de 50 individuos con cinco repeticiones por tratamiento y el peso resultante se dividió entre ese mismo número, esto para conocer la masa individual de cada uno de ellos.

ESTANDARIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS PARA OBTENER LOS HOMOGENEIZADOS DE LARVAS DE TERCER ESTADIO ($96 \pm 4\text{H}$) DE LA CEPA *WT CANTON S* PARA LA MEDICIÓN DE TRIGLICÉRIDOS, GLUCOSA, ÁCIDO ÚRICO Y LÍPIDOS TOTALES

Para asegurarse de que las muestras procesadas tuvieran siempre la misma calidad, así como para asegurar la reproducibilidad de los resultados se optó por la estandarización de las técnicas con las que se obtuvieron y procesaron las larvas para generar los homogeneizados que servirán para los análisis bioquímicos propuestos en el proyecto DGAPA-PAPIIT-IN227619.

Debido a las características del homogeneizado de larvas de tercer estadio ($96 \pm 4\text{h}$) de la cepa *WT Canton S* se preparó el Buffer A, que contenía un agente quelante (EDTA) CalBiochem® para evitar la oxidación de los homogeneizados procesados con PBS (Figura 4) (*Cold Spring Harbor Protocols*, 2009) y con esto obtener una lectura adecuada de los analitos (Figura 5).



Fig. 4. Homogeneizados de larvas de tercer estadio ($96 \pm 4h$) de la cepa *WT* Canton S, con 25 – 100 larvas (de izquierda a derecha) procesadas con $1000 \mu l$ de PBS.



Fig. 5. Homogeneizados de larvas de tercer estadio ($96 \pm 4h$) de la cepa *WT* Canton S, con 25 – 100 larvas (de izquierda a derecha) procesadas con $1000 \mu l$ de Buffer A.

Como se observa en las figuras anteriores, el oscurecimiento es notoriamente superior en los homogeneizados procesados con PBS, por lo que se estandariza el método de procesamiento con 100 larvas de tercer estadio ($96 \pm 4h$) y con 1000 μL de Buffer A, ya que, con ello se logra una correcta maceración y un oscurecimiento menor en más tiempo transcurrido.

ELABORACIÓN DEL BUFFER A (BA) PARA EL PROCESAMIENTO DE LARVAS DE TERCER ESTADIO DE LA CEPA WT CANTON S

El buffer utilizado para el procesamiento y homogeneizado de larvas fue: Tris Cl 100 mM (pH 7.5) CalBiochem® CAS 1185-53-1, EDTA 100Mm CalBiochem® CAS 6381-92-6, NaCl 100mM Supelco® CAS 7647-14-5 y SDS Millipore® CAS 151-21-3 en una proporción del 0.5%. Esta solución se emplea en el aislamiento de RNA y DNA (Velázquez *et al.*, 2014), y para evitar el oscurecimiento de las muestras se utilizó EDTA, un agente quelante que capta los iones de Cu_2 , con esto, se evita el oscurecimiento de las muestras, lo cual podría dificultar su medición en el espectrofotómetro.

PROCESAMIENTO DE LARVAS DE 3^{ER} ESTADIO PARA LA MEDICIÓN DE TRIGLICÉRIDOS, GLUCOSA, ÁCIDO ÚRICO Y LÍPIDOS TOTALES

Para el procesamiento de las larvas sometidas a los distintos tratamientos se elaboró el Buffer A para *Drosophila* minipreps (BA), de acuerdo a los procedimientos citados por Cold Spring Harbor Protocols (2009) con el cual se colocaron 100 larvas mantenidas con DN en tubos eppendorf, se agregaron 200 μl de BA y maceraron utilizando un homogenizador eléctrico ISOLAB® modelo D-160, una vez hecho esto se aforó a un volumen total de 1000 μL , se mezclaron y centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Transcurrido este lapso se recuperó el sobrenadante y se llevaron al laboratorio de análisis clínicos de la Clínica Universitaria de Salud Integral (CUSI) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala para su análisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DEL MEDIO INSTANTÁNEO CAROLINA Y ESTANDARIZACIÓN DE LOS MEDIOS COCINADOS

El Medio Instantáneo Carolina (DIM) es un compuesto seco y en hojuelas que ha sido utilizado como medio de cultivo para los diferentes experimentos en el Laboratorio de Genética Toxicológica. El olor, la consistencia y su composición se asemejan al puré de papa comercial (Lisinska y Leszcynski, 1989). En la tabla 2, se muestran las cantidades porcentuales de los tres tipos de biomoléculas valoradas en una muestra determinada de DIM obtenidas en el análisis bromatológico.

Tabla 2. Análisis bromatológico medio instantáneo carolina

Biomoléculas	(%)
Proteínas	4.73
Carbohidratos	94
Lípidos	1.26

Debido a las proporciones de las biomoléculas presentes en la muestra se realizó una revisión bibliográfica (Tabla 3) acerca de los diferentes medios de cultivo para *D. melanogaster* que se han reportado en la literatura, en esta tabla se enlistan algunas de las dietas utilizadas por diferentes autores, así como sus proporciones nutrimentales; de acuerdo con ese análisis se decidió que el trabajo realizado por Hemphill y colaboradores (2018) sería la base para la realización de los medios cocinados (DN, DAF y DAG), y modificándola de la siguiente manera: dieta normal (DN): 2.6% de harina de maíz amarillo, 4% levadura inactiva seca, 4% de agar, 3% de sacarosa por cada 100 mL de agua corriente. La incubación de los cultivos se hizo a una temperatura de 25 ± 2 °C con ciclos de luz-oscuridad de 12 h y con una humedad relativa del 80%.

Tabla 3. Dietas en las que se emplean medios cocinados según distintos autores.

Año	Factor de impacto	Referencia	Laboratorio, país y correo	Medio usado	Condiciones incubación	Trabajaron con
2005	N/D	Variation of the male specific wing pigment in the natural populations of <i>Drosophila rajasekari</i> . Chethan, B.K, and S.N. Hegde. Research notes.	Department of Studies in Zoology, Manasagangotri, Mysore-570006, India.	Medio de agar de crema de trigo.	Temperatura ambiente.	Adultos.
2013	5.179	Overexpression of Sir2 in the adult fat body is sufficient to extend lifespan of male and female <i>Drosophila</i> . Hoffmann J, Romey R, Fink C, Yong L, Roeder T.	<i>University of Kiel, Dept. of Zoophysiology II, 24098 Kiel, Germany current address: Biocenter Grindel and Zoological Museum, AG Molekulare Evolutionsbiologie,</i>	Medio control contiene 5 % (w/v) de extracto de levadura (Becton Dickinson), 5 % (w/v) sacarosa, 8.6 % harina de maíz, 0.5 % (w/v) agar, 0.03 % (v/v) ácido propionico, 0.3 % (v/v) 4-hidroxibenzoato de metilo.	25 °C bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 h.	Adultos
2014	2.449	Lutein extends the lifespan of <i>Drosophila melanogaster</i> . Zhang Z, Han S, Wang H, Wang T.	Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China. Electronic address: zhangzesheng@tust.edu.cn.	72g harina de maíz (Porcentaje equivalente en 100 ml: 9.6 %), 10 g levadura (1.33 %), 72 g dextrosa (9.6 %), 6 g agar (0.8 %), y 40 ml 4-hidroxibenzoato de etilo (1%), con 5 ml de la mezcla cocinada por vial.	25.0–26.0°C con humedad relativa de 65-75 %.	Adultos
2018	2.7	Effect of Larval Nutrition on Maternal mRNA Contribution to the <i>Drosophila</i> Egg. Crofton AE, Cartwright EL, Feitzinger AA, Lott SE.	1_Department of Evolution and Ecology, University of California, Davis CA 95616. 2_Department of Evolution and Ecology, University of California.	Diluciones de harina de maíz con una mezcla de agua-agar, en proporciones de 5 y 25 % del alimento original.	Temperatura ambiente.	Tres embriones por tratamiento.
2018	6.1	Growth control through regulation of insulin signalling by nutrition-activated steroid hormone in <i>Drosophila</i>. Buhler K, Clements J, Winant M, Bolckmans L, Vulsteke V, Callaerts P.	Laboratory of Behavioral and Developmental Genetics, Department of Human Genetics, KU Leuven-University of Leuven, Herestraat 49, Box 602, B-3000 Leuven, Belgium.	standard yeast fly food recipe and rearing conditions.	Incubadora a 25 °C	Adultos, embriones larvas, pupas.
2018	2.742	RNA-Sequencing of <i>Drosophila melanogaster</i> Head Tissue on High-Sugar and High-Fat Diets Hemphill, Rivera, and Talbert	Department of Biology, University of Louisiana at Monroe, Louisiana 71209 E-mail: talbert@ulm.edu	The ND as control diet , 2.6% w/v cornmeal, 4% w/v dry inactivated yeast, 0.8% w/v agar, 3% w/v sucrose, 1.5% v/v Tegosept (20% w/v in 70% ethanol), and 0.3% v/v propionic acid. The HFD and HSD were identical to the ND, except for an addition of 20%w/v coconut oil in the HFD , and the use of 20%w/v sucrose instead of 3% in the HSD	25 °C bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 h.	3 hembras y 3 machos por tratamiento, machos retirados tras 24 h.

DIETA NORMAL

La Figura 6 muestra la mediana y la dispersión de los datos referentes al porcentaje de emergencia de los organismos alimentados con la DN. Se observa que la mediana del porcentaje de emergencia oscila entre el 89 y 92%. Estudios previos centrados en el metabolismo energético de *D. melanogaster* suelen utilizar dietas enriquecidas, añadiendo ingredientes específicos a una dieta no definida, lo que aumenta la cantidad de organismos que alcanzan a desarrollarse en adultos tras el proceso de metamorfosis. En los sistemas de los mamíferos, por ejemplo, la capacidad de comprobar las diversas proporciones de carbohidratos en relación con la grasa suele requerir la reducción de los niveles de un solo ingrediente por debajo de la cantidad que se encuentra en una dieta "estándar", manteniendo al mismo tiempo los niveles estándar de los demás ingredientes (Mair *et al.*, 2005; Solon-Biet *et al.*, 2014).

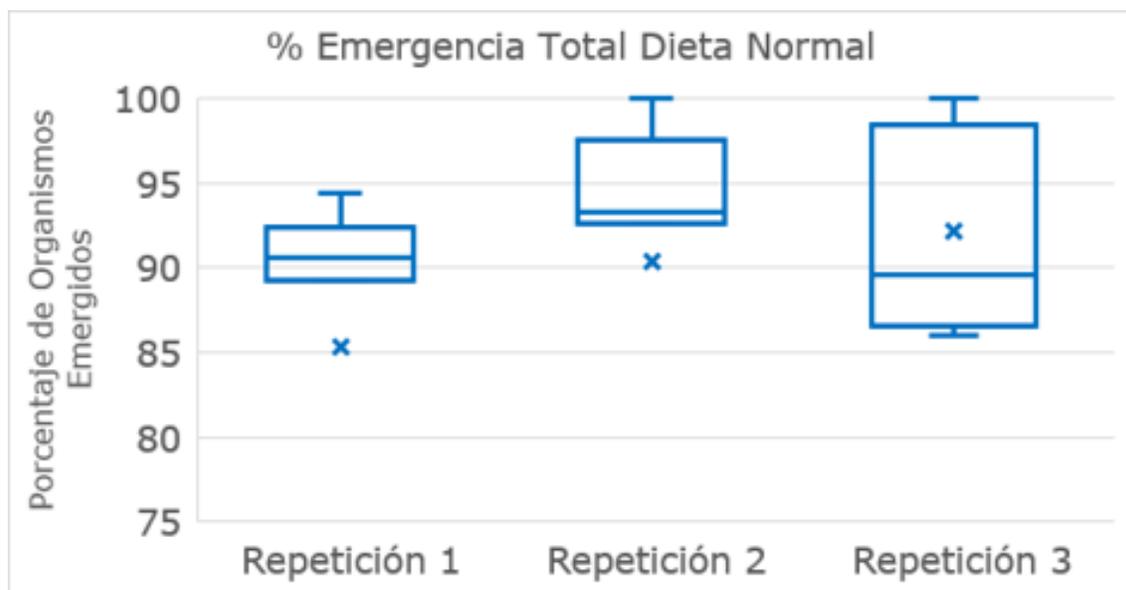


Fig. 6. Gráfico que representa el porcentaje de imagos emergidos tras la alimentación con DN, cada repetición comprende el promedio de organismos emergidos en los cinco tubos de vidrio.

Tras el análisis de las dietas de la (Tabla 3) se encontró que la relación de la levadura con respecto a la sacarosa es importante para una esperanza de vida óptima, ya que al aumentar esta relación aumenta la fecundidad; en el trabajo actual se optó por una relación 1:2 entre los dos parámetros anteriores. Esto fue puesto a prueba al establecer la relación entre los gramos de proteína con respecto a los gramos de carbohidratos. Dicha relación puede ser leída en el siguiente recuadro:

<p>Dieta Normal:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 4% Levadura • 4% Agar • 2.6 Harina de maíz amarillo • 3g Sacarosa 	<p>Si tomamos en cuenta que DN tiene 83 g de proteínas, 66.3 g de carbohidratos y 2.8 g de lípidos podemos establecer una relación porcentual por gramo de cada uno de los ingredientes.</p> <p>Levadura (4 g): 1.6 g Proteína 1.6 g Carbohidratos</p> <p>Harina de maíz amarillo (2.6 g): 0.216 g Proteína 1.724 g Carbohidratos</p>
---	---

A diferencia de la DN establecida en el presente trabajo que mantenía cantidades establecidas de biomoléculas, en estudios con dietas no definidas se ha comprobado que al aumentar el aporte calórico de la levadura se producen moscas magras, mientras que cuando se proporciona el mismo número de calorías, se aumentan los triacilglicéridos (Skorupa *et al.*, 2008).

DIETA CON ÁCIDO PALMÍTICO

La (Figura 7) muestra el porcentaje de organismos emergidos tras la alimentación con DAG, al contabilizar las larvas presentes en cada uno de los tubos y posteriormente contar los imagos emergidos de los mismos se puede apreciar el efecto tóxico del ácido palmítico al disminuir la cantidad de organismos emergidos y, por lo tanto, de supervivientes. Lo anterior concuerda con lo reportado por McKechnie y Geer (1992) quienes evaluaron dietas enriquecidas con etanol y ácidos grasos, como el ácido mirístico, el linoleico y el palmítico, demostrando que estos últimos disminuyeron el número de organismos que alcanzaron el estadio adulto hasta en 30% con respecto al grupo control.

Driver y Cosopodiotis (1979) evaluaron el efecto de grasas presentes en los alimentos en el acortamiento de la esperanza de vida de *D. melanogaster* cepa WT Canton S, demostrando que la vida media fue significativamente menor que la obtenida cuando se administró a las moscas un medio control que contenía sólo un 15% de agar y 4-hidroxibenzoato de metilo. Sin embargo, todas las grasas comestibles y el ácido palmítico acortaron significativamente la esperanza de vida, descubriendo la toxicidad relativa de las grasas comestibles. Una de las posibles especulaciones acerca de los efectos de acortamiento de la vida con la DAG fue que la completa ausencia de un agente endulzante hacía que la comida fuera desagradable para las moscas, las que, por lo tanto, comían menos y morían antes de tiempo como resultado de la inanición parcial.

Considerando que eso hubiera ocurrido, era posible revertir los efectos de una dieta alta en grasas haciendo el medio dulce. Así que se hizo un medio cocinado donde se combinaba ácido palmítico (3.2%) y fructosa (5%) en la misma mezcla, sin embargo, dicho medio no produjo la emergencia de organismos, debido su cristalización y no permitiendo la ovoposición.

La cristalización observada, así como la nula ovoposición había sido comprobada por Skorupa y colaboradores (2008), quienes también intentaron endulzar el medio, añadiendo glucosa en el mismo, demostrando que, a pesar de la presencia de glucosa, la dieta de ácido palmítico acorta la vida. De hecho, demostraron que la cantidad de acortamiento de la vida es proporcional a la concentración de ácido palmítico.

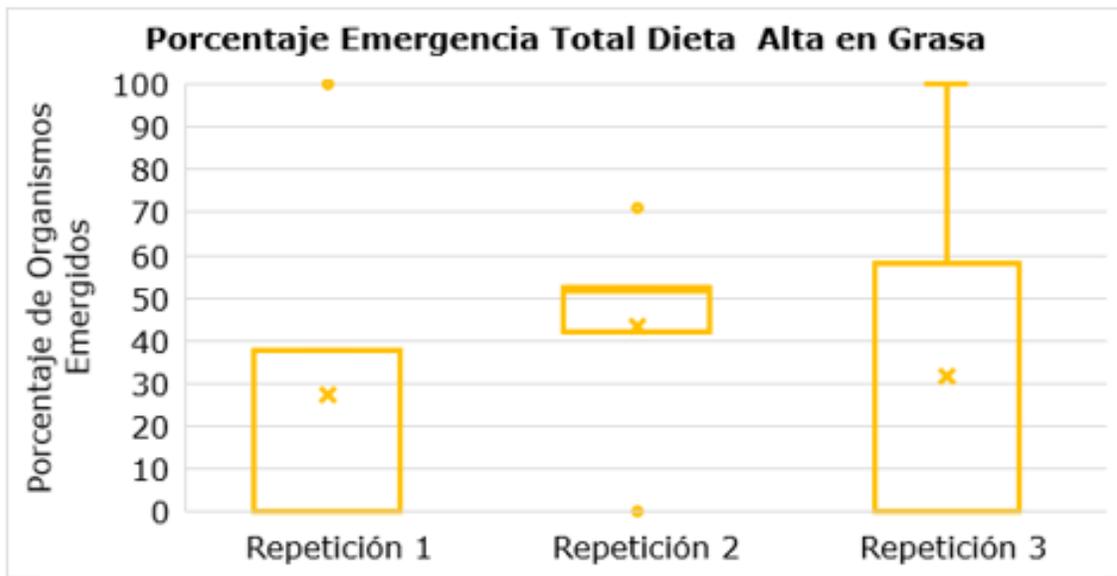


Fig. 7. La presencia de larvas en los tubos permitió la contabilización éstas y, con ello, la determinación del porcentaje de imagos emergidos en la DAG.

DIETA CON FRUCTOSA

Uno de los resultados de los experimentos con fructosa fue el retraso del desarrollo larval y la disminución del tamaño en los organismos emergidos, aun cuando *Drosophila* comúnmente ovoposita en frutas en descomposición, esto coincide con lo reportado por Walker y colaboradores (2007), quienes mencionan que en muchas especies, el consumo insuficiente de calorías atrofia el desarrollo y da lugar a adultos más pequeños y tiene efectos adversos.

Los animales alimentados con DN se adelantaron en promedio 12 h, mientras que el exceso de carbohidratos provocó un retraso de 12 h en el desarrollo. Lo anterior puede ser explicado con base en el trabajo presentado por Palanker y colaboradores (2011) donde se menciona que altas concentraciones de carbohidratos, entre ellos fructosa y maltosa conducen a la resistencia de insulina en *Drosophila* y con ello la disminución de tamaño de los organismos respecto a los controles, que sólo incluían agua además del medio, tal y como se observó en el trabajo realizado. Con esto se explica que la deficiencia de crecimiento observada pudo deberse a la reducción en el número de células, producto de la regulación de la proliferación celular regulada por el gen receptor de insulina. Dicho fenotipo ha sido observado en los síndromes de resistencia a insulina o a receptores IGF-1 en organismos superiores, lo que sugiere una función conservada para esta familia de genes en la regulación del crecimiento y tamaño corporal (Chen *et al.*,1996).

En la figura 8 se observa en las medianas una tendencia en la disminución de organismos emergidos con respecto a lo observado en las (Figuras 6 y 7). Como se ha mencionado, una de las observaciones fenotípicas en los organismos tratados con fructosa fue la disminución del tamaño de los adultos, así como el retraso del desarrollo larvario de *Drosophila*. Esta disminución, tanto poblacional como en el crecimiento ha sido mencionada por Rulifson y colaboradores (2002) quienes reportaron un retraso en el desarrollo larvario de hasta cinco días, contra aquellos alimentados con comida control; De este mismo modo Baker y Thummel (2007) demostraron la relación del consumo de carbohidratos desde estadio larval con la posterior emergencia de los adultos, comprobando que hasta el 6.5% de la masa

corporal se ve reducida. Con la emergencia mostrada en la (Figura 5) y con los documentos previos realizados (Piper *et al.*, 2005) se demuestra que la ingesta de carbohidratos influye en la duración de la vida. Asimismo, en estudios anteriores que utilizaban medios no definidos a los que se añadían componentes dietéticos específicos, la variación de la proporción entre el azúcar y la levadura tenía efectos significativos en la esperanza de vida (Skorupa *et al.*, 2008; Bruce *et al.*, 2013).



Fig. 8. El diagrama de cajas refleja la productividad expresada en número de organismos emergidos tras la alimentación con DAF.

A manera de resumen y para demostrar visualmente las comparaciones de la emergencia total de organismos entre los distintos medios en la (Figura 9) se presentan las medianas de los resultados obtenidos en los tres tratamientos expuestos anteriormente. La concentración de ácido palmítico utilizada en el presente experimento (3.2%) demostró tener efectos semi letales para *Drosophila*, comprometiendo su emergencia y además, produciendo la menor cantidad de organismos emergidos. La cristalización de la fructosa (5%) presente en la DAF produjo que no emergieran organismos, de este modo se demuestra su actividad tóxica.

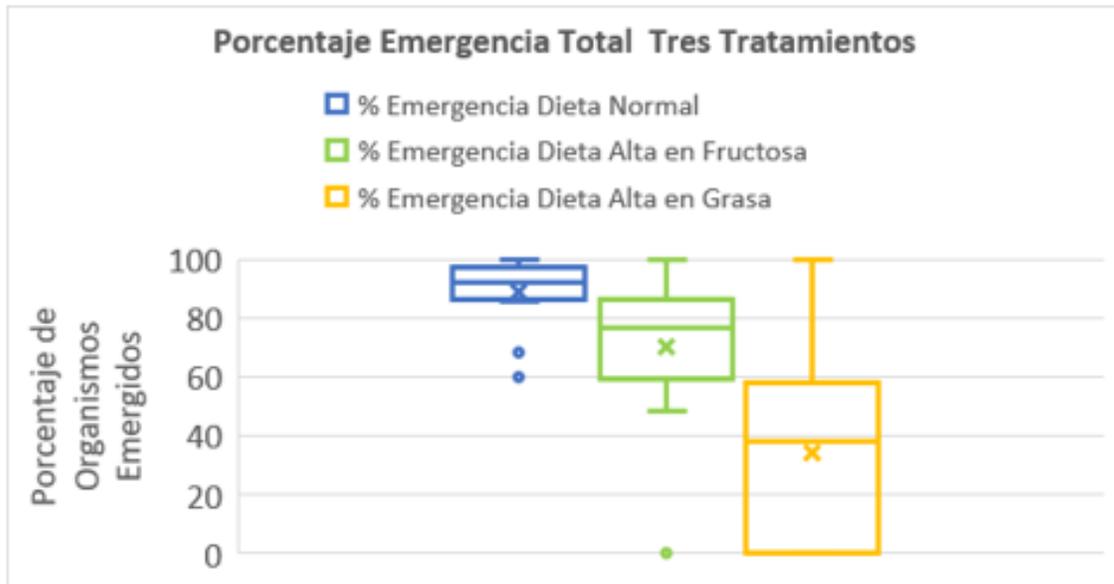


Fig. 9. Comparación entre los dos tratamientos (DAG, DAF) contra la DN.

DETERMINACIÓN DEL PESO INDIVIDUAL DE LARVAS

En la (Tabla 4) se muestra la media del peso de las larvas de cada uno de los tratamientos, observándose que la DN contiene a los individuos con mayor tamaño. Sang (1962) señala que el contenido de proteína es capaz de aumentar la eficiencia en la reproducción de *D. melanogaster*, asimismo Díaz y col. (2008) reportan que los cultivos con características tanto nutritivas, como fisicoquímicas adecuadas producen larvas cuya masa representa por lo menos el peso mínimo teórico que le permite realizar la pupación y metamorfosis. Esto podría explicar que los medios adicionados con ácido palmítico (DAG) y/o fructosa (DAF) impidieron alcanzar este peso mínimo, por lo que se prolonga la etapa de alimentación y expone a las larvas a desaparecer por inanición, contaminación del lugar donde crece por excretas que ella misma produce, y/o parasitismo. Del mismo modo, la pupación puede llegar a iniciarse, pero por falta de reservas suficientes la transición pupa-adulto puede no tener lugar (Godoy-Herrera, 2001).

Tabla 4. Peso en mg de larvas sometidas a los distintos tratamientos, los resultados corresponden a la media de 50 individuos en peso seco \pm desviación estándar.

Peso promedio de larvas de la cepa Oregon R (R)-Flare

DN (mg)	DAF (mg)	DAG (mg)
1.88364 \pm 0.07917833	1.53324 \pm 0.075798997	1.69786 \pm 0.082669632

PROPORCIÓN SEXUAL EN *D. MELANOGASTER*

Aun cuando el análisis de la proporción sexual en los organismos bajo los efectos de los tratamientos hipercalóricos no estaba contemplado en los objetivos del trabajo realizado, resultó interesante realizarlo, ya que, es una manera indirecta de poder estimar la calidad del medio analizado. Con la premisa anterior se exponen las figuras siguientes (figura 10 y figura 11), en ellas se exponen las proporciones de machos y hembras emergidas en cada uno de los tratamientos, donde se observa un mayor número de hembras sin importar el compuesto químico. Sin embargo, el principio de Fisher (1930) establece que la proporción de sexos en organismos que se reproducen de manera sexual gira en torno a la proporción 1:1 cuando la muestra poblacional es grande. Como se observa en ambas figuras el desplazamiento de dicha proporción también podría deberse a la competencia por el apareamiento desde el punto de vista de los progenitores, dado que sus descendientes machos van a competir entre ellos mismos por las hembras y sólo una parte de ellos podrá reproducirse, por lo que resultará más favorable concentrar los esfuerzos en producir hembras, de las cuales todas se reproducirán (Carvalho *et al.*, 1997).

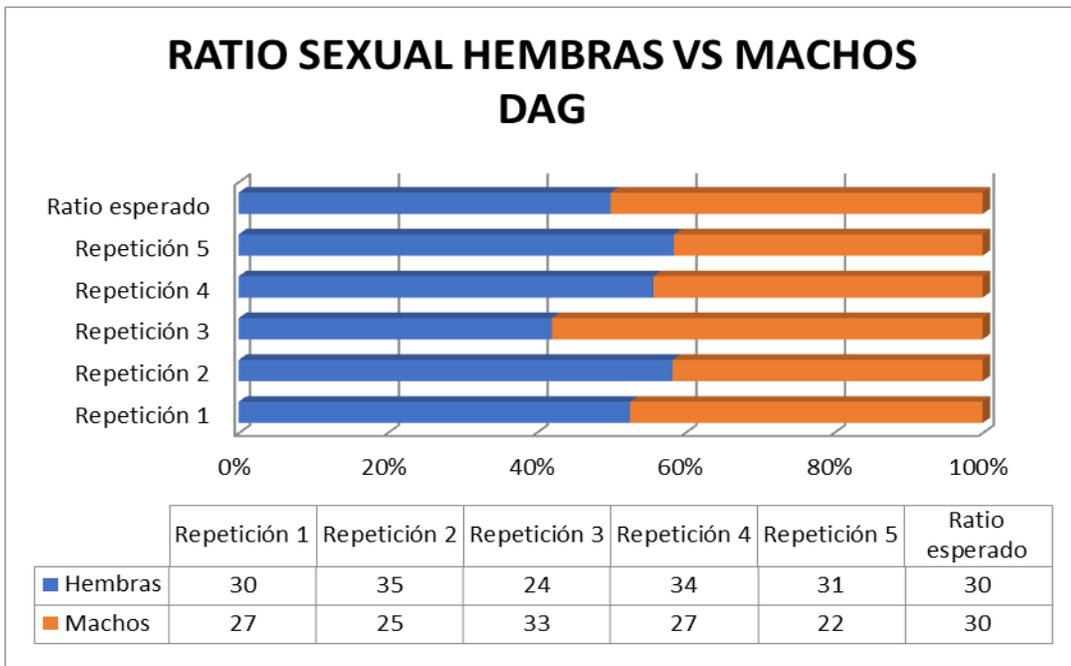


Fig. 10. Emergencia de moscas según su sexo en los tratamientos con la dieta DAG.

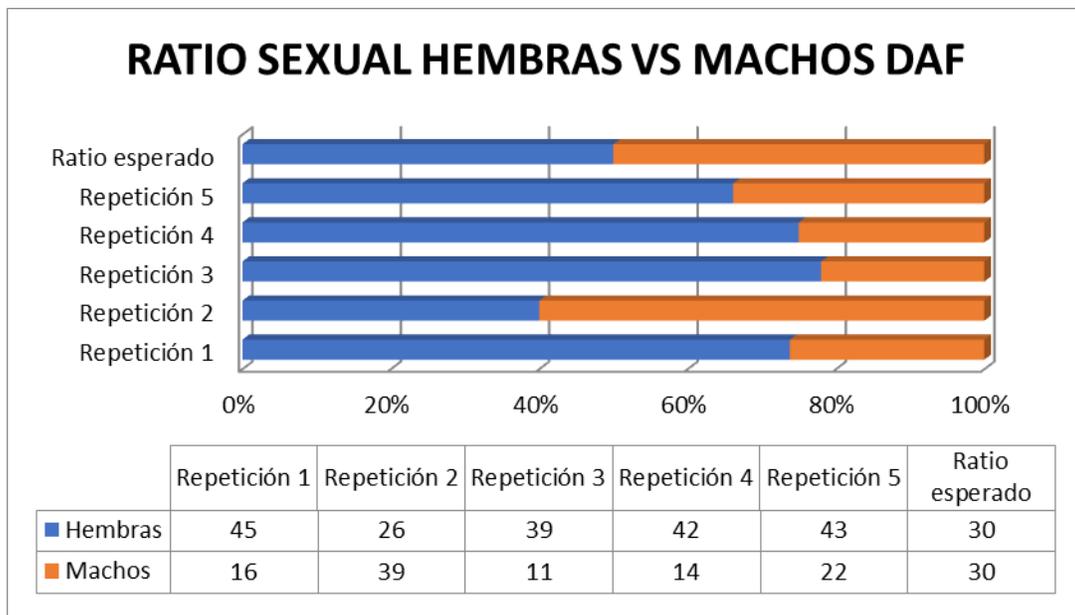


Fig. 11. Emergencia de moscas según su sexo en los tratamientos con la dieta DAF.

Presumiblemente, la mayor proporción de hembras con respecto a los machos emergidos se debe a los sistemas de reparación presentes en el cromosoma X, los cuales están altamente conservados en *D. melanogaster* (López-Castel, 2003), dicho organismo es un eucariota donde los sistemas cromosómicos XY se hacen presentes. De este modo, la presencia de dos cromosomas X en las hembras les confiere cierta resistencia frente a los daños producidos por los compuestos utilizados.

Drosophila es probablemente el único organismo con el que in vivo se puede estudiar la influencia de distintos sistemas de reparación en la inducción de los espectros de mutación, gracias a la reparación materna. Se han analizado dos sistemas de reparación diferentes: a) el sistema de reparación por escisión de nucleótido, NER, utilizando una línea mutante *mus201*, deficiente en el paso de incisión (Boyd *et al.*, 1987); y b) un sistema del que forma parte el locus *mus308* implicado en reparación post-replicativa; Si bien *mus308* se relacionó originalmente con la reparación de enlaces cruzados (Boyd *et al.*, 1990), posteriormente se ha comprobado que más bien está relacionado con la reparación de daños persistentes (Aguirrezabalaga *et al.*, 1995). Asimismo, Sasamura y colaboradores (2013) identificaron las enzimas responsables del metabolismo de lípidos en *D. melanogaster* cepa OR-(R-flare), siendo éstas serina plamitotransferasa (SPT) y acetil-CoA carboxilasa (ACC), codificadas por los genes *lace* y *ACC*, respectivamente.

MEDICIÓN DE TRIGLICÉRIDOS, GLUCOSA, ÁCIDO ÚRICO Y LÍPIDOS TOTALES EN HOMOGENEIZADOS DE LARVAS DE TERCER ESTADIO (96 ± 4 H) DE LA CEPA WT CANTON S

La (Tabla 5) enlista la proporción en mg de los analitos presentes en las muestras homogeneizadas, y, como se puede apreciar no son repetibles, por lo que se continúa el proceso para la correcta obtención y análisis de las mismas.

Tabla 5. Triglicéridos, glucosa, ácido úrico y lípidos totales presentes en homogeneizados de larvas de tercer estadio (96 ± 4 h) de la cepa *WT* Canton S.

Tabla 4. Analitos presentes en homogeneizados de larvas de la cepa *WT* Canton S

MUESTRA	GLUCOSA (mg%)	TRIGLICÉRIDOS TOTALES (mg%)	ÁCIDO ÚRICO (mg%)
DN	18	349	2.7
DN	16	142	2.1
DAG	75	149	3.7
DAG	26	100	0-9
DAF	53	83	0.9
DAF	56	108	2

CONCLUSIONES

El análisis bromatológico del DIM no demostró diferencias nutrimentales con otros purés de papa comerciales, por lo que se pueden continuar utilizando las hojuelas de puré de papas comerciales adicionado con levadura seca como medio de mantenimiento y propagación de las moscas en el laboratorio de Genética Toxicológica y el DIM para experimentos como SMART.

Se estandarizaron los medios cocinados DN, DAG y DAF que serán utilizados en los experimentos relacionados con el proyecto titulado “Análisis transcriptómico de dos cepas de *D. melanogaster* expuestas a dos dietas hipercalóricas ricas en ácido palmítico y/o fructosa” cuya clave es es SGAPA-PAPIIT-IN227619. realizados en Laboratorio De Genética Toxicológica y el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM.

El ensayo de porcentaje de emergencia demostró que las proporciones de fructosa y ácido palmítico en DAF y DAG, respectivamente deben ser modificadas para permitir la emergencia de un mayor número de organismos.

Los resultados obtenidos en el análisis de los homogeneizados de larvas de la cepa WT Canton S no fueron consistentes, ni repetibles las mediciones realizadas, por lo que se continuará el desarrollo de una técnica reproducible y fiable para el registro constante de los analitos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., ... & George, R.A. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461), 2185-2195.
2. Aguirrezabalaga, I., María Sierra, L., y Comendador, M.A. (1995). The hypermutability conferred by the mus308 mutation of *Drosophila* is not specific for cross-linking agents. *Mutation Research/DNA Repair*. 336(3), 243–250. doi:10.1016/0921-8777(94)00057-d
3. Álamo, A. (2006). Síndrome Metabólico. Fisterra. Consultado el 02/08/19 disponible en: www.fisterra.com/guias2/Smetabólico.asp
4. American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association: Use of Nutritive and Nonnutritive Sweeteners. (2004). *J Am Diet Assoc*; 104: 255-275.
5. Andrade, H., Reguly, M. L., Lehmann, M. (2004). Wing somatic mutation and recombination test: En: *Drosophila* Cytogenetics Protocols. Henderson Ed. Human Press. pp. 389-412.
6. Baker, K. D. and Thummel, C. S. (2007). Diabetic larvae and obese flies—emerging studies of metabolism in *Drosophila*. *Cell Metab*. 6, 257-266.
7. Boyd, J.B., Mason, J.M., Yamamoto, A.H., Brodberg, R.K., Banga, S.S., Sakaguchi, K., A. (1987). Genetic and molecular analysis of DNA repair in *Drosophila*, *J. Cell Sci*. 6 39–60. Suppl.
8. Boyd, J.B., Sakaguchi, K., Harris, P.V. (1990). *mus308* mutants of *Drosophila* exhibit hypersensitivity to DNA cross-linking agents and are defective in a deoxyribonuclease. *Genetics* **125**: 813--819.
9. Bray, G.A., Nielsen, S.J., Popkin, B.M. (2004). Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 537-543.
10. Bruce, K.D., Hoxha, S., Carvalho, G.B., Yamada, R., Wang, H.D., Karayan, P., *et al.* (2013). High carbohydrate-low protein consumption maximizes *Drosophila* lifespan. *Experimental gerontology*. 48(10):1129–35.

11. Carvalho, A., Sampaio, M., Roque, F., Klaczko, L. (1997). An Experimental Demonstration of Fisher's Principle: Evolution of Sexual Proportion by Natural Selection. *Genetics* 148(2):719-731.
12. Castillo-Urueta P. Garcia-Gomez R.S. y Durán de Bazúa C. (2003). El Consumo de Fructosa: riesgos para la salud y la economía. Facultad de Química, UNAM.
13. Chavez, V.M. *et al.*, (2000). The *Drosophila* disembodied gene controls late embryonic morphogenesis and codes for a cytochrome P450 enzyme that regulates embryonic ecdysone levels. *Development* 127:4115– 4126.
14. Chen, C., Jack, J. y Garofalo, R. S. (1996). The *Drosophila* insulin receptor is required for normal growth. *Endocrinology* 137, 846-856.
15. Chien, S., Reiter, L. T., Bier, E., y Gribsov, M. (2002). Homophila: human disease gene cognates in *Drosophila*. *Nucleic acids research*, 30(1), 149-51.
16. Cold Spring Harbor Protocols (2009). Recipe Buffer A for *Drosophila* minipreps. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
17. Daborn P.J., Yen, J.L., Bogwitz, M.R., Le Goff, G., Feil, E., Jeffers, S., *et al.*, (2002). A single p450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science* 297:2253–2256.
18. Driver, C. J. I. y Cosopodiotis, G. (1979) The effect of dietary fat on longevity of *Drosophila melanogaster*. *Exp. Gerontol.* 14, 95–100.
19. Driver, C. J. y Lamb, M. J. (1980) Metabolic changes in ageing *Drosophila melanogaster*. *Exp. Gerontol.* 15, 167–175.
20. Dueñas, I.E., M.E. Heres, P.L. Castañeda, and U. Graf. (2001). Easy raising of *Drosophila melanogaster* on a medium consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. *Dros. Inf. Serv.* 84: 44-47.
21. Dunkov, B.C., Mocelin, G., Shotkoski, F., ffrench-Constant, R.H., Feyereisen, R. (1997). The *Drosophila* cytochrome P450 gene *Cyp6a2*: structure, chromosomal localization, heterologous expression and induction by phenobarbital. *DNA and Cell Biology*, 1345–1356.

22. Edem, D.O. (2002). Palm oil: biochemical, physiological, nutritional, hematological, and toxicological aspects: a review. *Plant Foods Hum Nutr* 57:319–341.
23. Eguchi K, Nagia R. (2017). Islet inflammation in type 2 diabetes and physiology. *J Clin Invest*.127(1):14–23.
24. Fisher, R.A. (1930). *The Genetical Theory of Natural Selection*. Clarendon Press, Oxford.
25. FlyBase (2015). Información general del gen: *Dmel\Cyp6a8*. Recuperado el 29/11/2018 de: <http://flybase.org/reports/FBgn0013772>.
26. FlyBase (2018). Información general del gen: *Dmel\Cyp4e2*. Recuperado el 29/11/2018 de: <http://flybase.org/reports/FBgn0014469.html>
27. Fong, C., F. Díaz, J. Osorio, L. Castaño, F. González, L. Jurado, K. Castillo y H. Cárdenas. (2008). Efecto de la densidad poblacional de huevos sobre viabilidad y tiempo de desarrollo de *Drosophila melanogaster* (*Drosophilidae*). *Actabiol. Colomb.*, 13(2):123-132.
28. Gilbert, L.I. (2004). Halloween genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Endocrinol* 215:1–10.
29. Godoy-Herrera, R. (2001). La conducta de larvas de *Drosophila* (Diptera; Drosophilidae): Su etología, desarrollo, genética y evolución. *Rev Chil Hist Nat.* 1(74):55-64
30. Gómez, L.A. (2011). Las enfermedades cardiovasculares: un problema de salud pública y un reto global. *Biomédica*, 31(4), 469-473.
31. González, S. Y Peñalosa, I. (2000). *Biomoléculas. Métodos de análisis*. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM
32. González, M.I. (2007). *Función del gen dRYBP en Drosophila melanogaster*. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid. 126 p.
33. Graf, U., Abraham, S. K., Guzmán, J., Friedrich, E., Würgler, R. (1998). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 402: 203-209.

34. Hakki, T., Bernhardt, R. (2006) CYP17- and CYP11B-dependent steroid hydroxylases as drug development targets. *Pharmacol Ther* 111:27–52.
35. Hanover, L.M., White, J.S. (1993). Manufacturing, composition, and applications of fructose. *Am J Clin Nutr*; 58: 724S-732S
36. Heinrichsen E.T., Haddad, G.G. (2012). Role of High-Fat Diet in Stress Response of *Drosophila*. *PLoS ONE* 7(8): e42587.
37. Hemphill, W., Rivera, O., y Talbert, M. (2018). RNA-sequencing of *Drosophila melanogaster* head tissue on high-sugar and high-fat diets. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(1), 279-290.
38. Huang, P. L. (2009). A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Disease Models y Mechanisms*, 2(5-6), 231–237.
39. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (2016). Tablas de composición de alimentos y productos alimenticios (versión condensada 2016). Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Ciudad de México.
40. Kaur, J. (2014). A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiology Research and Practice*, 2014, 1–21.
41. Khosla, P., Sundram, K. (2010). A supplement on palm oil – why? *J Am Coll Nutr* 29:237S–239S.
42. Kylin, E. (1923). Studies of the hypertension-hyperglycemia síndrome. *Zentralbl Inn Med*, 44:105-127.
43. Lee, K.P., Simpson, S.J., Clissold, F.J., Brooks, R., Ballard, J.W.O., Taylor, P.W., Soran, N., Raubenheimer, D. (2008). Lifespan and reproduction in *Drosophila*: new insights from nutritional geometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 2498–2508.
44. Lee, K.P., Simpson, S.J., Clissold, F.J., Brooks, R., Ballard, J.W.O., Taylor, P.W., Soran, N., Raubenheimer, D. (2008). Lifespan and reproduction in *Drosophila*: new insights from nutritional geometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 2498–2508.
45. Le Goff, G., *et al.*, (2003). Microarray analysis of cytochrome P450 mediated insecticide resistance in *Drosophila*. *Insect Biochem Mol Biol* 33:701–708.

46. Lewis, D.F. (2004). 57 varieties: the human cytochromes *P450*. *Pharmacogenomics* 5:305– 318.
47. Lingelbach, L. y R. McDonald (2000), Description of long-term lipogenic effects of dietary carbohydrates in male Fischer 344 rats. *Journal of Nutrition* 130(12), 3077-3084
48. Lisinska G, Leszczynski W. (1989). *Potato science and technology*. Elsevier Applied Science Publishers. London.
49. López-Castel, A. (2003). Estudio de la inestabilidad genómica espontánea e inducida en mutantes deficientes en la reparación del DNA de *Drosophila melanogaster*. Tesis doctoral. Facultad de ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona.
50. Mair, W., Piper, M.D., Partridge, L. (2005). Calories do not explain extension of life span by dietary restriction in *Drosophila*. *PLoS biology*. 3(7):e223. Epub 2005/07/08
51. Mayes, P.A. (1993). Intermediary metabolism of fructose. *Am J Clin Nutr*; 58: 754S-765S.
52. McKechnie, S., Geer, B. (1992). Long-Chain Dietary Fatty Acids Affect the Capacity of *Drosophila melanogaster* to Tolerate Ethanol. Department of Genetics and Developmental Biology, Monash University. American Institute of Nutrition.
53. McNamara, D.J. (2010). Palm oil and health: a case of manipulated perception and misuse of science. *J Am Coll Nutr* 29: 240S–244S.
54. Mukherjee, S., Mitra, A. (2009). Health effects of palm oil. *J Hum Ecol*. 26:197–203.
55. Musselman, L.P., Fink, J.L., Narzinski, K., Ramachandran, P.V., Hathiramani, S.S., Cagan, R.L., *et al.*, (2011). A high sugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type *Drosophila*. *Disease models & mechanisms*. Epub 4(6):842–9.
56. Negre-Salvayre, A., Salvayre, R., Augé, N., Pamplona, R., Portero-Otín, M. (2009). Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. *Antioxid Redox Signal*: 11:3071–3109.

57. Ng, M. (2014). *et al.*, Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 384, 766-781.
58. O'Brien, P.E., Dixon, J.B. (2002). The extent of the problem of obesity. *Am J Surg* 184: 4S–8S.
59. OECD (2017). Obesity Update 2017. Recuperado el 28/11/2018 de: <http://www.oecd.org/health/obesity-update.htm>
60. Oguntibeju, O.O., Esterhuyse, A.J., Truter, E.J. (2009). Red palm oil: nutritional, physiological and therapeutic roles in improving human wellbeing and quality of life. *Br J Biomed Sci* 66: 216 –222.
61. Olaiz-Fernández, G., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Rojas, R., Villalpando-Hernández, S., Hernández-Avila, M., Sepúlveda-Amor, J. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (2006). México: Instituto Nacional de Salud Pública; 2006.
62. Ong, A.S., Goh, S.H. (2002). Palm oil: a healthful and cost-effective dietary component. *Food Nutr Bull* 23:11–22.
63. Ono, H., Rewitz, K. F., Shinoda, T., Itoyama, K., Petryk, A., Rybczynski, R., ... O'Connor, M. B. (2006). *Spook and Spookier code for stage-specific components of the ecdysone biosynthetic pathway in Diptera. Developmental Biology*, 298(2), 555–570. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.07.023
64. Ortiz-Hernández, L., Delgado-Sánchez, G., Hernández-Briones, A. (2006). Cambios en factores relacionados con la transición alimentaria y nutricional de México. *Gac Med Mex* 2006; 142:181-193
65. Osborne, D.R. and P. Voogt (1978). *The Analysis of Nutrient in Food*, Acad. London, pp: 107.
66. Palanker, L., Fink, J., Ramachandran, P., Hathiramani, S., Cagan, R., Naranski, T. (2011). A high-sugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type *Drosophila*. *Disease Models & Mechanisms* 4, 842-849.
67. Pérez-Cruz, E., Zúñiga, A. E. S., & Mier, G. M. (2007). Beneficial and deleterious effects of fructose consumption. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 15(2), 67-74.

68. Petryk, A. *et al.*, (2003). Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13773–13778.
69. Pierdomenico, S. D., y Cuccurullo, F. (2010). Ambulatory blood pressure monitoring in type 2 diabetes and metabolic syndrome: a review. *Blood pressure monitoring*, 15(1), 1-7.
70. Piper, M.D., Mair, W., Partridge, L. (2005). Counting the calories: the role of specific nutrients in extension of lifespan by food restriction. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 60(5):549–55.
71. Poh, S., Mohamed-Abdul, R. B. B., Lamoureux, E. L., Wong, T. Y., y Sabanayagam, C. (2016). Metabolic syndrome and eye diseases. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 113, 86–100.
72. Ramos, P. (1993). *Manual de genética para Drosophila melanogaster*. McGraw-Hill. México.
73. Read, W.W., Sarrif, A. (1965). Human milk lipids. I. Changes in fatty acid composition of early colostrum. *Am J Clin Nutr* 17: 177 –179
74. Rulifson, E. J., Kim, S. K. and Nusse, R. (2002). Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes. *Science* 296, 1118-1120.
75. Saltiel, A.R., Olefsky, J.M. (2017). Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*. 127(1):1-4.
76. Sasamura, T., Matsuno, K., Fortini, M.E. (2013). Disruption of *Drosophila melanogaster* Lipid Metabolism Genes Causes Tissue Overgrowth Associated with Altered Developmental Signaling. *PLoS Genet* 9(11): e1003917.
77. Skorupa, D.A., Dervisevendic, A., Zwiener, J., Pletcher, S.D. (2008). Dietary composition specifies consumption, obesity, and lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Aging cell*. 7(4):478–90.
78. Solon-Biet, S.M., McMahon, A.C., Ballard, J.W., Ruohonen, K., Wu, L.E., Cogger, V.C., *et al.* (2014). The ratio of macronutrients, not caloric intake,

- dictates cardiometabolic health, aging, and longevity in ad libitum-fed mice. *Cell metabolism*. 19(3):418–30
79. Sundram, K., Sambanthamurthi, R., Tan, Y.A. (2003). Palm fruit chemistry and nutrition. *Asia Pac J Clin Nutr* 12:355–362
80. Swinburn, B. A., Sacks, G., Hall, K. D., McPherson, K., Finegood, D. T., Moodie, M. L., & Gortmaker, S. L. (2011). *The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments*. *The Lancet*, 378(9793), 804–814. doi:10.1016/s0140-6736(11)60813-1
81. Velázquez, L. P. A., Martínez, M. D. C. A., Y Romero, A. C. (2014). Extracción y purificación de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, 1*.
82. Vogel, E. W. (1987). Evaluation of potential mammalian genotoxins using *Drosophila*: the need for a change in test strategy. *Mutagenesis*, 2(3), 161-171.
83. Vogel, E. W., Graf, U., Frei, H. J., Nivard, M. (1999). The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens IARC. *Sci. Publ.* 146: 427-470.
84. Walker, S.P., Wachs, T.D., Gardner, J.M., Lozoff, B., Wasserman, G.A., Pollitt, E., *et al.* (2007). Child development: risk factors for adverse outcomes in developing countries. *Lancet*; 369(9556):145–57.
85. Wilham, C. A., McGuire, T. A., y Mehlretter, C. L. (1971). Hydrolysis of Dialdehyde Starch with Sulfurous Acid. *Starch - Stärke*, 23(6), 201–203.
86. Wilson P, Kannel W, Silbershatz H, D'Agostino R. (1999). Clustering of metabolic factors and heart disease. *Arch Intern Med* 1999; 159:1104-1109.
87. Würgler, F. E., Sobels, H., Vogel, E. W. (1984). *Drosophila* as an assay system for detecting changes. *Handbook of mutagenicity test procedure*. Eds. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. y Rmel, C. Elsevier Science Publishers B. V. pp. 555-601.