



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto reprotóxico y transgeneracional inducido por el
ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en *Drosophila*
melanogaster

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:

Edgar Alberto Ragde Gutiérrez Álvarez



DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Patricia Ramos Morales

Ciudad Universitaria, Cd. De México.
(2022)



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

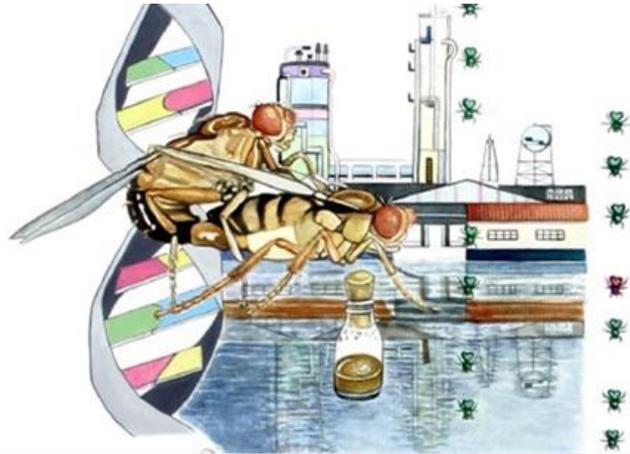
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno.
Gutiérrez Álvarez Edgar Alberto
Ragde
5525293228
Universidad Nacional Autónoma
de México
Facultad de Ciencias
Biología
310193214
2. Datos del Tutor.
Dra. Patricia Ramos Morales
3. Datos del sinodal 1.
Dr. Luis Humberto Mojica
Vázquez
4. Datos del sinodal 2.
Dr. Javier Andrés Juárez Díaz
5. Datos del sinodal 3.
Dra. Sylvia Patricia Garza Manero
6. Datos del sinodal 4.
Adriana Muñoz Hernández
7. Datos del trabajo escrito.
Efecto reprotóxico y
transgeneracional inducido por el
ácido 2,4-diclorofenoxiacético
(2,4-D) en *Drosophila melanogaster*.
65p
2022

Este trabajo se realizó en:

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



El material biológico utilizado para la realización de este trabajo fue otorgado por el Banco de Moscas de la Facultad de Ciencias, UNAM.



Este trabajo fue realizado con la ayuda del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT). Registro de proyecto IN-229719.

Dedicatoria

Llegó el momento, sin duda un camino largo y que no fue fácil, pero todo el esfuerzo y empeño han rendido un fruto. Gran parte de este trabajo ha sido por ustedes, sin su apoyo, no hubiera podido cumplir esto que considero un logro.

Por mucho tiempo fui duro y creí que todo lo estaba haciendo solo, pero el tiempo, las experiencias, los momentos buenos y malos, me han enseñado y dejado en claro que siempre han estado ahí, lo han hecho todo por mí y por mi hermana, siempre han buscado nuestro bien y la manera de apoyarnos.

A mis padres, Guadalupe y Austreberto.

Gracias por no soltarme y seguir confiando en mí, me basta tu amor.

“²⁰Y a Aquel que es poderoso para hacer todas las cosas mucho más abundantemente de lo que pedimos o entendemos, según el poder que actúa en nosotros”.

Efesios 3:20

Dedicatoria especial

Te fuiste antes de tiempo, sigo recordando el momento y mis ojos se llenan de lágrimas, no puedo asimilar tu pérdida. Aun guardo esos últimos mensajes, justo cuando me sentía muy solo y creía que todos me habían abandonado, tú me dijiste que creías en mí y que siempre me ibas a apoyar. Me hubiera encantado darte esta alegría, me tarde y te pido perdón. Te extraño, tío José[†].

Siempre quise que estuvieran orgullosos de mí, siempre busque su aprobación y me hubiera encantado que estuvieran aquí compartiendo este logro conmigo, los amo y los extraño abuelos, para ustedes, Austreberto Gutiérrez[†] e Isabel Alcántara[†].

Agradecimientos

A mis padres y a mi hermana Karla, gracias por su apoyo, compañía, paciencia y, sobre todo, gracias por creer en mí, son mi motivación. No me alcanzan las palabras para agradecerles, pero tengo toda una vida para demostrárselos.

A ti, compañera, que llegaste para hacerme soñar de nuevo, que me hiciste creer en mí y en mi potencial, que me hiciste recordar tantas cosas que había olvidado y otras más que había ignorado. Por acompañarme e inspirarme, quiero llegar muy lejos contigo y por ti, gracias, mi Cesia.

A mi familia, tío José†, tía Ana, Sandra, Edinho, Ian. Desde que tengo conciencia, siempre han estado con nosotros.

A mis amigos Jorge, Calina, Derek y Jonathan. Gracias por permitirme ser un miembro más de su familia, su apoyo y compañía durante todos estos años ha sido una gran bendición, los quiero mucho.

A la Dra. Patricia Ramos Morales, por enseñarme no solo de genética, sino por ser esa gran persona que es. La admiro mucho y es un buen momento para agradecerle por haber creído en mí. Siempre recibí su apoyo, me impulso para seguir adelante y no solo me impulso con palabras, también me dio las herramientas para poder concluir con esta tesis y para participar en el congreso de AMEQA. Gracias por todo, es un orgullo decir que soy su alumno.

Rubi, por convertirse en mi amiga desde el principio. Sin duda, el laboratorio no hubiera sido lo mismo si no hubieras estado ahí, las risas nunca faltaron... y tampoco las lágrimas.

A Thelma, gracias por ser mi amiga desde el primer semestre y hasta el día de hoy.

A mis sinodales: Dra. Adriana Muñoz Hernández, Dra. Sylvia Patricia Garza Manero, Dr. Javier Andrés Juárez Díaz y Dr. Luis Humberto Mojica Vázquez por su tiempo y aporte a este trabajo.

Por su apoyo técnico y académico a la M. en Ciencias Estefania Arroyo Jilote. Aprendí mucho de ti y no solo me refiero a lo académico. Eres una gran persona y una mente brillante.

Gracias a todas aquellas personas que han estado cerca de mí y han ayudado a que lograra culminar con esta etapa. Gracias por sus palabras de ánimo, por sus mensajes, por sus pláticas, por escucharme, por su tiempo y porque a pesar de mi forma de ser, ustedes han insistido y han seguido allí, gracias.

Índice General

| | |
|---|----|
| Resumen..... | 8 |
| I. Introducción..... | 9 |
| I.1. El uso de pesticidas..... | 9 |
| I.2. El ácido 2,4-diclorofenoxiacético y su uso como herbicida..... | 10 |
| I.3. Efecto y toxicidad del 2,4-D en organismos no blanco..... | 12 |
| I.4. Toxicología..... | 16 |
| I.4.1. Factores que determinan la respuesta toxicológica..... | 16 |
| I.4.1.1. Relación dosis-respuesta..... | 17 |
| I.4.1.2. Factores genéticos..... | 18 |
| I.4.1.3. Sexo..... | 18 |
| I.4.1.4. Estado fisiológico: embarazo y edad..... | 18 |
| I.4.2. Toxicología ambiental..... | 18 |
| I.4.3. Toxicología genética..... | 19 |
| I.5. ¿Herencia genética o epigenética?..... | 20 |
| 1.5.1. Efecto multigeneracional vs. efecto transgeneracional..... | 22 |
| I.6. <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo biológico..... | 24 |
| I.6.1. Generalidades de <i>Drosophila</i> | 25 |
| I.7. Justificación..... | 28 |
| I.8. Objetivo general..... | 29 |
| I.8.1. Objetivos particulares..... | 29 |
| I.9. Hipótesis..... | 30 |
| II. Materiales y Métodos..... | 31 |
| II.1. Cepa..... | 31 |
| II.2. Compuesto..... | 31 |
| II.3. Sincronización de cultivos y obtención de larvas..... | 31 |

| | |
|--|----|
| II.4. Tratamiento..... | 31 |
| II.5. Registro de toxicidad..... | 33 |
| II.6. Cruzas | 33 |
| II.7. Análisis morfológico..... | 35 |
| II.8. Análisis de resultados | 35 |
| II.8.1. Toxicidad del 2,4-D | 35 |
| II.8.2. Efecto reprotóxico | 35 |
| III. Resultados | 37 |
| III.1. Toxicidad del 2,4-D..... | 37 |
| III.2. Efecto reprotóxico y transgeneracional..... | 40 |
| III.2.1. Cruza TxT..... | 41 |
| III.2.2. Cruza TxNT..... | 43 |
| III.2.3. Cruza NTxT..... | 45 |
| III.3. Alteraciones morfológicas..... | 48 |
| IV. Discusión | 52 |
| IV.1. Toxicidad del 2,4-D | 52 |
| IV.2. Efecto reprotóxico y transgeneracional..... | 53 |
| IV.3. Alteraciones morfológicas..... | 55 |
| V. Conclusión..... | 59 |
| VI. Referencias..... | 61 |

Resumen

Todos los días grandes cantidades de sustancias se liberan en el ambiente, lo que representa un peligro potencial para los organismos y, para la mayoría de éstas, se ignora el alcance de las repercusiones en las generaciones posteriores a la exposición. El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es un regulador de crecimiento en plantas (auxina) y se utiliza como herbicida sistémico. Forma parte de la mezcla química que compone al “Agente Naranja” y en México, este herbicida se distribuye como Hierbamina (Syngenta). En este trabajo se busca establecer el daño reprotóxico inducido por el 2,4-D a lo largo de 3 generaciones de *Drosophila melanogaster*.

Larvas de 72 h fueron alimentadas con medio para mosca enriquecido con 2,4-D (1.72×10^{-4} - 1.12×10^1 mM). Una vez que emergieron los adultos se cuantificó el número de hembras y machos para obtener la sobrevivencia promedio y la proporción sexual. Posteriormente se realizaron 3 sistemas de cruza: hembra tratada x macho tratado (TxT), hembra tratada x macho no tratado (TxNT) y hembra no tratada x macho tratado (NTxT) hasta obtener la F₃. Se cuantificó la progenie promedio, proporción sexual, fertilidad y se hizo un análisis morfológico de las moscas obtenidas en cada generación.

La concentración 1.12×10^1 mM fue letal para las moscas. El tratamiento afectó de manera significativa al promedio de la progenie en la cruza NTxT a lo largo de las tres generaciones.

El análisis morfológico mostró alteraciones en el tamaño corporal, alteraciones en la placa genital y en las patas. La incidencia de alteraciones morfológicas se mantuvo a lo largo de las tres generaciones, en los tres diferentes sistemas de cruza y en las 8 concentraciones probadas. La mayor incidencia de malformaciones ocurrió en la F₃.

La exposición al 2,4-D modificó la cantidad de progenie y afectó la morfología de estructuras reproductivas, principalmente; este efecto se mantuvo a lo largo de las tres generaciones. Existe un impacto a nivel poblacional a lo largo del tiempo, en donde se observa un umbral de respuesta en las concentraciones intermedias (1.10×10^{-2} mM). Por lo anterior, se considera que el uso descontrolado de pesticidas puede tener un efecto negativo en la diversidad y abundancia de los organismos no blanco de los pesticidas.

I. Introducción

I.1. El uso de pesticidas

El crecimiento de la población mundial y la creciente demanda de alimentos han llevado a buscar estrategias para aumentar el rendimiento de los cultivos, lo que ha provocado un mayor uso de pesticidas con el fin de prevenir o controlar las plagas. A pesar del aumento en el rendimiento de los cultivos, el uso de pesticidas puede tener graves efectos ecológicos contaminando cuerpos de agua, suelo y aire con compuestos tóxicos. En la figura 1 se muestra el uso de pesticidas en todo el mundo, de acuerdo con su categoría en el año de 2011.

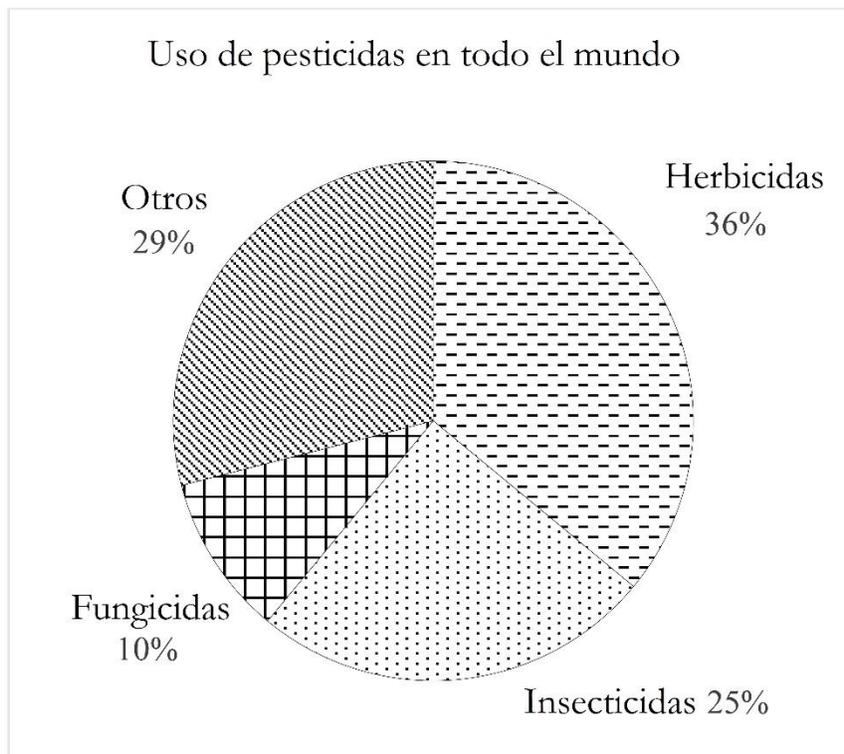


Fig. 1 Uso de pesticidas en el mundo. Tomado de Qurratu y Reehan, 2016.

Los pesticidas más utilizados en el mundo son los herbicidas, ya que ayudan a controlar el problema de las malezas y una manera de clasificarlos es de acuerdo con su modo y sitio de acción (Qurratu y Reehan, 2016).

La dosis de aplicación de los pesticidas puede ser letal o subletal, por lo tanto, la población de plagas que recibe dosis subletales puede presentar una cantidad significativa de mutaciones en el DNA, algunas de estas adaptativas, lo que provoca la resistencia de las plagas a los pesticidas (de Castro-Marcato *et al.*, 2017).

I.2. El ácido 2,4-diclorofenoxiacético y su uso como herbicida

Durante la Segunda Guerra Mundial, el número de compuestos nuevos y su uso extensivo en la agricultura aumentaron dramáticamente. La aplicación de herbicidas que actúan como auxinas sintéticas comenzó una nueva época en la producción agrícola debido a su movilidad sistémica en la planta y su acción selectiva, principalmente contra las malezas dicotiledóneas sin afectar a plantas monocotiledóneas (de Castro Marcato *et al.*, 2017).

A comienzos de los años 40, se desarrolló un potente herbicida cuyo principio activo es el ácido 2,4-diclorofenoxiacético, mejor conocido como 2,4-D (Fig. 2). Tiene un antecedente histórico muy importante debido a que años más tarde, durante la guerra de Vietnam, el ejército de los Estados Unidos roció una mezcla química denominada “Agente Naranja” en territorio vietnamita para destruir la cubierta forestal, siendo el 2,4-D uno de sus principales componentes. La mezcla estaba compuesta por ácido 2,4-D y ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) (de Castro Marcato *et al.*, 2017).

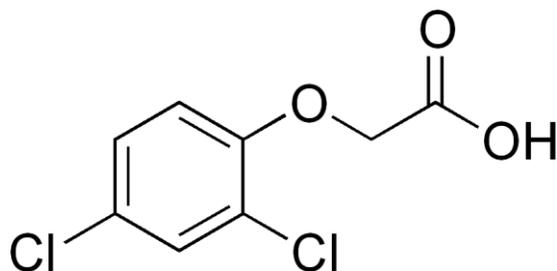


Fig. 2 Molécula del 2,4-D

El 2,4-D sigue utilizándose ampliamente en todo el mundo para el control de malezas de hoja ancha en cultivos de trigo, sorgo, maíz, arroz, caña de azúcar, soja y pastos (de Castro Marcato *et al.*, 2017). Es un ácido no volátil y sus derivados, como el 2,4-D sal dimetilamina y el 2,4-D butil éster, son de los herbicidas más usados en el mundo. Este tipo de herbicidas son populares entre los agricultores debido a su bajo costo, efectividad incluso en dosis bajas y buena solubilidad en agua (Qurratu & Reehan, 2016).

El 2,4-D desempeña el mismo papel que el ácido indolacético (AIA) que es una auxina natural (Fig. 3) vital en la división, diferenciación y alargamiento de las células vegetales. Por lo tanto, pueden interrumpir el crecimiento de la planta de forma “natural”. Además, el 2,4-D persiste por largos periodos en la planta por lo que es muy eficaz y letal (de Castro Marcato *et al.*, 2017; Qurratu & Reehan, 2016).

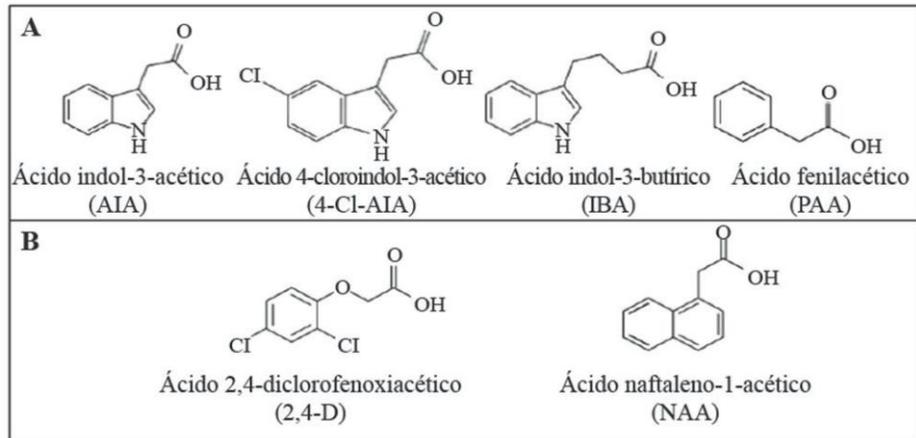


Fig. 3 Diversidad de Auxinas. A: auxinas naturales; B: Auxinas producidas por síntesis química industrial. Tomado de Vega-Celedón *et al.*, 2016.

El 2,4-D es capaz de causar lesiones y daño a las plantas como torsiones del tallo y del pecíolo, malformaciones de las hojas, tallos frágiles, crecimiento de raíces atrofiadas y tallos inclinados (Qurratu & Reehan, 2016).

El modo de acción de este compuesto se caracteriza por un aumento anormal en la plasticidad de la pared celular, un aumento en la síntesis de ciertas proteínas y etileno, que resulta en una descontrolada división celular y daño al tejido vascular de las plantas. Al tener una estructura química que funciona como auxina, sobreestimula el crecimiento, culminando en la muerte de la planta blanco (de Castro Marcato et al., 2017).

I.3. Efecto y toxicidad del 2,4-D en organismos no blanco

Los pesticidas, al ser desarrollados con el fin de controlar especies no deseadas, tienen que ser biológicamente activos. Por esta razón se caracterizan por tener diferentes grados de toxicidad.

Los herbicidas pueden contaminar cuerpos de agua, el suelo y el aire después de su aplicación. Debido a su amplio uso, los seres humanos y otros organismos también están expuestos a los herbicidas. Una vez en el ambiente, los herbicidas se someten a diversos procesos por agentes químicos, biológicos y físicos que determinan su persistencia en el ambiente (Fig. 4) (de Castro Marcato *et al.*, 2017; Qurratu & Reehan, 2016).



Fig. 4. Destino ambiental de los herbicidas. Tomado de Qurratu y Reehan, 2016.

La mayoría de los herbicidas muestran cierto nivel de toxicidad, pero algunos de sus metabolitos pueden volverse más tóxicos en comparación con el compuesto original. Los clorofenoles son uno de sus productos de degradación. Por ejemplo, se pueden producir varios tipos de clorofenoles a partir de la degradación microbiana del 2,4-D. El 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) es uno de los clorofenoles tóxicos y resistentes a la biodegradación (Qurratu & Reehan, 2016).

El 2,4-D muestra toxicidad en los seres humanos y otros organismos que no son blanco de este plaguicida.

La mayor parte de 2,4-D se detecta en fuentes de agua como: ríos, estanques y aguas subterráneas, a los que puede llegar por medio de un proceso de escorrentía debido a su baja capacidad de adsorción por el suelo, su alto potencial de lixiviación y su alta solubilidad en agua. Por lo tanto, humanos y otros animales pueden estar expuestos a este compuesto por la contaminación del agua, suelo y alimentos, o bien, por una exposición laboral en el sector

agrícola o en la producción del mismo (Qurratu & Reehan, 2016). De hecho, se ha detectado la presencia de este compuesto en muestras de semen y orina de humanos (Qurratu & Reehan, 2016).

Los factores que influyen en la toxicidad del pesticida son la concentración, la frecuencia e intensidad de la exposición, así como la susceptibilidad del órgano blanco, que depende de la edad, sexo, estado de salud y variaciones genéticas de los organismos expuestos (Qurratu & Reehan, 2016).

En sistemas acuáticos el 2,4-D es poco biodegradable, y su biodegradación por bacterias puede retrasarse debido a factores que cambian la calidad del agua (por ejemplo, otros contaminantes), ya que las variaciones en la temperatura, así como la disponibilidad de oxígeno y nutrientes, afectan directamente a dicho proceso (Mesak et al., 2018).

Existen reportes sobre su impacto en diferentes organismos bioindicadores. Se informan efectos en bacterias, artrópodos, peces, anfibios, mamíferos y especies de plantas (Tabla 1).

Se ha reportado un efecto negativo en el suelo al inhibir o eliminar directamente a algunas bacterias (de Castro Marcato *et al.*, 2017).

Los efectos tóxicos observados después de la exposición de animales a suelos contaminados con 2,4-D fueron más severos que los observados en animales expuestos al herbicida glifosato en la misma concentración (de Castro Marcato *et al.*, 2017).

En humanos, el 2,4-D puede ser absorbido por ingestión, inhalación y/o contacto con la piel (Sharifi Pasandi *et al.*, 2017). Sin embargo, este herbicida no se metaboliza, se elimina rápidamente a través de los riñones y se excreta por la orina como el compuesto original (Li *et al.*, 2017).

La exposición al 2,4-D produce efectos tóxicos en mamíferos tales como la hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, neurotoxicidad y reprotoxicidad. Induce efectos de tipo teratogénicos, inmunosupresores y citotóxicos. Durante los periodos pre y post natal, el sistema nervioso central (SNC) parece ser uno de los principales blancos de los efectos tóxicos del 2,4-D. Provoca alteraciones en el desarrollo cerebral, la inducción de astrogliosis, la interrupción del ensamblaje del citoesqueleto y la desorganización del aparato de Golgi (Horikoshi *et al.*, 2008; Rosso *et al.*, 2000; Sharifi Pasandi et al., 2017).

En roedores, la administración de 2,4-D produce disfunción testicular. En los agricultores expuestos al 2,4-D, se ha reportado astenospermia, necrospermia y teratospermia, y se asocia con un mayor riesgo de aborto espontáneo temprano (Harada et al., 2016).

Se ha reportado que el ácido 2,4-D tiene efectos citotóxicos y mutagénicos en levaduras, células hematopoyéticas transformadas y médula ósea de ratón después de un análisis de los cromosomas en metafase que indicó una inducción probada de roturas, deleciones e intercambios después de la administración del 2,4-D (Venkov *et al.*, 2000).

Tabla 1. Resumen de los estudios de toxicidad del 2,4-D para diferentes organismos.

| Organismo | Concentración de 2,4-D | Efectos en el organismo | Referencia |
|--|--------------------------------------|---|--|
| <i>Eisenia foetida</i> (Annelidae) | 1, 10, 100, 500, 1000 mg/kg de suelo | Efectos sobre el desarrollo y la reproducción, mostrando una reducción gradual y significativa en el peso medio. Alta tasa de mortalidad. | de Castro Marcato <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Scytonotus simplex</i> (milpiés) | No específica | Alta tasa de mortalidad. Evita las superficies tratadas por lo que hay un cambio en su distribución espacial. | de Castro Marcato <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Leporinus obtusidens</i> (pez) | 1, 10 mg/L | Efecto en el cerebro y en la actividad de la enzima muscular acetilcolinesterasa (AChE) en músculos y algunos parámetros metabólicos de sangre. | de Castro Marcato <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Geophagus brasiliensis</i> (pez) | 1, 5, 10, 20, 40 y 80 mg/L | Cambios en las tasas de mortalidad, consumo de oxígeno y excreción de amoníaco. Las tasas de mortalidad fueron directamente proporcionales a las concentraciones del herbicida. | de Castro Marcato <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Clarias batrachus</i> (pez gato) | 75 ppm | Efecto genotóxico y alteraciones histopatológicas en machos y gónadas femeninas. | de Castro Marcato <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Danio rerio</i> (pez cebra) | 25, 40, 50, 60, 75 y 100 mg/L | Reduce la tasa de eclosión, la tasa de sobrevivencia, la longitud del cuerpo de embriones y causa malformaciones pericárdicas. | Li <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Xenopus</i> (genero de ranas carnívoras) | No específica | Inhibe la maduración de ovocitos <i>in vitro</i> al interferir con los mecanismos de traducción y post-traducción. Es un potencial disruptor endocrino ambiental con efectos reproductivos tempranos. | LaChapelle <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Lithobates catesbeianus</i> (rana toro) | 1.97 mg/L | Tiene un efecto mutagénico (micronúcleos) en renacuajos en concentraciones bajas (relevantes para el medio ambiente) y por un corto período de tiempo de exposición. | Mesak <i>et al.</i> , 2018 |
| <i>Rhinella arenarum</i> (sapo argentino) | 1 a 26 mg/L ⁻¹ | El tratamiento fue teratogénico, lo que resultó en una reducción del tamaño corporal, desarrollo retrasado, microcefalia, agenesia de las branquias y procesos de proliferación celular anormales. | Aronzon <i>et al.</i> , 2010 |
| Ratas | 100 y 200 mg/kg de peso corporal | Aumenta la muerte embrionaria en ratas hembra. Induce cambios testiculares en ratas. Actuó directamente sobre los testículos y afectó la biosíntesis de andrógenos en las células de Leydig, provocando un bajo nivel de testosterona que detuvo la espermatogénesis y afectó el desarrollo de los testículos. El tratamiento subagudo de 2,4-D promueve la toxicidad del sistema reproductivo. | Marouani <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | 0, 5, 10, 30, 100, 200, 300 µg/L | Efecto sobre la recombinación. | de Castro Marcato <i>et al.</i> , 2017 |

En el 2015 la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) clasificó al 2,4-D como posible carcinógeno para humanos (grupo 2B). Sin embargo, algunos estudios sostienen que el 2,4-D no causa cáncer en los seres humanos (Garabrant & Philbert, 2002; Goodman *et al.*, 2017).

Diversas enfermedades se han asociado con la exposición al agente naranja en soldados expuestos (Stellman & Stellman, 2018). Un metaanálisis desarrollado por Ngo y colaboradores (2010), sugiere que la exposición paterna al agente naranja puede estar asociada a un mayor riesgo de padecer espina bífida y otras malformaciones en su descendencia (Ngo *et al.*, 2010).

I.4. Toxicología

La toxicología es la disciplina que estudia los efectos relacionados con la exposición de organismos a algún tóxico, generalmente agentes químicos, físicos o biológicos, para determinar los mecanismos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de los compuestos y evaluar los cambios biológicos causados por dichos agentes (Peña *et al.*, 2001).

En gran parte, la toxicología estudia los compuestos exógenos al metabolismo regular de los organismos; estos compuestos se denominan xenobióticos. Sin embargo, muchos compuestos endógenos, incluyendo intermediarios metabólicos, llegan a ser tóxicos cuando se administran en dosis más altas a las normales o en sitios diferentes. Con frecuencia los xenobióticos son compuestos de naturaleza lipofílica, por lo que pueden atravesar con relativa facilidad las membranas biológicas, accediendo al interior de las células y pueden unirse a diversas estructuras celulares (Reyes, 2016).

Desde el momento en el que un agente tóxico penetra en el organismo empieza a ser transformado por las distintas enzimas de las que puede ser sustrato. Existen diversas rutas metabólicas que convierten a los agentes xenobióticos liposolubles en metabolitos hidrosolubles capaces de ser excretados por las vías de excreción. A esta actividad bioquímica se le ha denominado biotransformación (Peña *et al.*, 2001).

La biotransformación convierte entonces a los xenobióticos en compuestos más polares y menos tóxicos para facilitar su remoción por las diferentes vías de excreción; sin embargo, al modificarse la estructura química del agente xenobiótico, se pueden presentar casos en los que se modifique la actividad original, así como el aumento de la toxicidad, lo que se conoce como bioactivación (Reyes, 2016).

La toxicología ha proporcionado una fuente de datos sobre los efectos en la salud para las evaluaciones de seguridad química de productos nuevos y existentes. Sin esta información, muchas sustancias químicas potencialmente peligrosas se habrían identificado solo a través de la experiencia humana. La exposición accidental a productos químicos y la exposición a agentes de guerra química han proporcionado datos importantes a la toxicología (Brusick, 1987).

I.4.1. Factores que determinan la respuesta toxicológica

La toxicidad y la respuesta biológica a una sustancia se determina con base en el tipo de sustancia, la dosis, forma de exposición (inhalación, ingestión, inyección, entre otros), duración de la exposición (aguda, subcrónica y crónica), la absorción, distribución, metabolismo y excreción. Algunos factores relacionados con el organismo receptor que influyen sobre la toxicidad de un compuesto pueden ser genéticos (especie, cepa, sexo, individuo) o fisiológicos (embarazo, edad, nutrición, estado hormonal, condición de salud) (Brusick, 1987; Peña *et al.*, 2001; Timbrell, 2002).

I.4.1.1. Relación dosis-respuesta

Paracelso (Siglo XVI) fue probablemente el primero en reconocer que la toxicidad depende no solo de las propiedades tóxicas sino también de la dosis del compuesto administrado. Esta relación entre la dosis de un compuesto y la respuesta que provoca es un concepto fundamental en toxicología. La respuesta tóxica que es más fácil de observar es la muerte. Otro indicador de una respuesta tóxica es la presencia de una lesión patológica como la necrosis celular. Una respuesta medida con mayor precisión puede ser un cambio bioquímico, farmacológico o químico. Es posible distinguir entre la respuesta "todo o nada", como la muerte, de respuestas graduales, como la inhibición de una enzima o el nivel de un marcador de daño patológico. Se considera que, tanto las respuestas "todo o nada" como las respuestas graduales pueden mostrar una relación típica de dosis-respuesta. En ambos casos habrá una dosis a la que no hay un efecto medible y una dosis superior donde haya una respuesta máxima (Timbrell, 2002)

De esta manera, la correspondencia entre la cantidad de tóxico y la magnitud del efecto es lo que se conoce como la relación dosis-efecto o dosis-respuesta. La mayoría de los estudios de la relación dosis-respuesta se han hecho para determinar los efectos terapéuticos de drogas en experimentos de tipo farmacológico. Si se obtiene una respuesta de una magnitud definida para cada dosis, dentro de un rango determinado, se dice que la respuesta es "gradual" (Peña *et al.*, 2001; Reyes, 2016; Timbrell, 2002).

Para poder observar de manera gráfica la relación dosis-respuesta, se puede construir una curva de los efectos causados en los organismos expuestos, con respecto a las dosis a las que éstos fueron expuestos (Fig. 5).

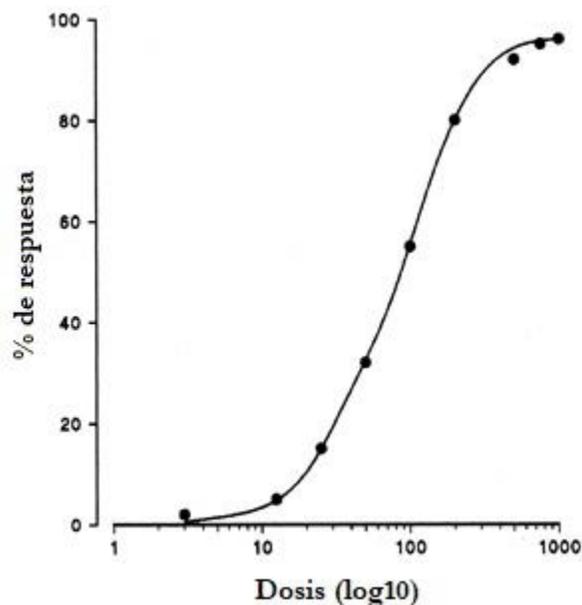


Fig. 5 Curva típica de dosis-respuesta donde el porcentaje de respuesta se traza en el eje de las ordenadas en función del logaritmo de la dosis, en el eje de las abscisas. Modificado de Timbrell, 2002.

I.4.1.2. Factores genéticos

La presencia, ausencia o efectividad de un determinado camino metabólico está determinada por la constitución genética del individuo. Estas variantes genéticas pueden resultar en diferencias a la respuesta tóxica (Brusick, 1987). El hecho de que organismos de diferente especie presenten relaciones dosis-respuesta similares es un argumento a favor de que es posible extrapolar o estimar el efecto en los humanos de los datos toxicológicos obtenidos con animales de estudio. Las respuestas serán más parecidas entre más semejantes sean los caminos metabólicos que siga el xenobiótico en el humano y en el modelo animal. Los polimorfismos genéticos puede afectar la capacidad de un organismo para biotransformar un compuesto exógeno, lo cual afecta también a su toxicidad (Brusick, 1987; Peña *et al.*, 2001).

I.4.1.3. Sexo

Se ha observado que algunos tóxicos tienen un efecto diferente dependiendo del sexo del organismo expuesto. Algunas de estas diferencias se pueden explicar con base en la regulación hormonal entre ambos sexos, y los efectos que estas hormonas tienen en los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción, especialmente la presencia o ausencia de testosterona o estrógeno. Estas diferencias se pueden atribuir a la actividad de enzimas de biotransformación que están bajo control hormonal (Brusick, 1987; Timbrell, 2002).

I.4.1.4. Estado fisiológico: embarazo y edad

El embarazo es un estado fisiológico durante el cual hay grandes cambios en la actividad de hormonas sexuales y esto tiene gran influencia sobre los efectos tóxicos de un compuesto en la madre gestante y el feto en desarrollo. La actividad de varias enzimas de biotransformación disminuye durante el embarazo afectando la toxicidad de algunos compuestos. En varias especies, el nivel de actividad de la monooxigenasa microsomal y la del citocromo P450 en el hígado, es menor durante el embarazo (Peña *et al.*, 2001).

La edad es otro factor importante ya que se ha demostrado que los neonatos y los animales muy jóvenes, en general, son más susceptibles a los tóxicos lo que se atribuye a una deficiencia en las enzimas de desintoxicación involucradas (Peña *et al.*, 2001).

I.4.2. Toxicología ambiental

La toxicología ambiental estudia los daños causados al organismo por la exposición a sustancias que pueden ser tóxicas y que se encuentran en el ambiente. La estimación de la toxicidad de una sustancia se puede hacer de dos formas: por medio de muestreo biológico y por el uso de marcadores biológicos. Los marcadores biológicos o biomarcadores son los cambios medibles, ya sean bioquímicos, fisiológicos o morfológicos, que se asocian con la exposición a un tóxico. Los biomarcadores se utilizan para determinar las consecuencias biológicas de la exposición, detectar los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico, e identificar a los individuos sensibles de una población (Reyes, 2016).

I.4.3. Toxicología genética

La toxicología genética estudia el daño al material genético inducido por agentes químicos, físicos o biológicos (genotóxicos).

El daño al material genético, si no se repara rápida y correctamente, puede afectar la secuencia de DNA. Si las alteraciones en el material genético no provocan una condición letal, pueden llevar a cambios heredables, es decir, mutaciones (Kramer, 1998; Reyes, 2016). En ocasiones, algunos genes pueden ser letales en forma homocigota, pero cuando se encuentran en estado heterocigoto, pueden ser heredables.

Las alteraciones que los genotóxicos inducen en el material genético se pueden dividir en: aneuploidía, clastogénesis y mutagénesis. La aneuploidía es la pérdida o adquisición de un cromosoma completo, resultado de errores en la segregación de cromosomas durante la mitosis o la meiosis; la clastogénesis implica el rompimiento del material hereditario y puede llevar a la pérdida, adición o reordenamiento de partes de los cromosomas; una mutación puntual puede originar la sustitución de una base (transición o transversión), pero también puede ocurrir la pérdida o adición de una o más bases, lo que, dentro de una región codificante, provoca un corrimiento en el marco de lectura, lo que podría llevar a procesos de carcinogénesis y teratogénesis (Brusick, 1987; Timbrell, 2002).

Las mutaciones pueden resultar en la eliminación o alteración de la función del gen. El efecto adverso de una mutación depende del gen, el sitio en el gen y el tejido afectado. Así, las mutaciones en las células germinales pueden llegar a tener efectos hereditarios o congénitos (Kramer, 1998).

La probabilidad de que el daño genético produzca una enfermedad depende en última instancia de la naturaleza del daño, la capacidad que posee la célula de reparar o amplificar el daño genético, la oportunidad de expresar cualquier alteración que se haya inducido y la capacidad del cuerpo de reconocer y suprimir la multiplicación de células aberrantes (Reyes, 2016).

I.5. ¿Herencia genética o epigenética?

El material genético está conformado por unidades funcionales hereditarias conocidas como genes, que son secuencias específicas de bases nitrogenadas. Los genes determinan los caracteres de cada individuo y se ubican en los cromosomas (Morgan, 1910).

Durante la mitosis, los cromosomas se copian y heredan a las células hijas, manteniendo un número diploide ($2n$) de cromosomas, mientras que, durante la meiosis, las células que se producen reciben un juego de cada cromosoma, lo que da origen a células haploides (n) (Klug *et al.*, 2013).

Durante la meiosis se originan los gametos, que son los encargados de transmitir la información genética de generación en generación. Los gametos son células haploides que tienen un juego de cromosomas con una sola copia de cada gen. Al fecundarse un óvulo por un espermatozoide, se forma un cigoto diploide, que contiene dos juegos de cromosomas homólogos, cada juego proviene de uno de los dos progenitores. Los genes tienen formas alternativas que se denominan alelos. Los alelos pueden producir diferencias en los rasgos observables, por lo que la capacidad de transmitir la información genética de una generación a otra dependerá de cómo se segreguen los cromosomas durante la formación de los gametos (Klug *et al.*, 2013).

En años recientes se han obtenido evidencias de que el entorno influye en ciertos aspectos de la vida de un organismo que antes se consideraban determinados únicamente por los genes. Existen procesos bioquímicos que regulan la actividad de los genes y que responden a la influencia del ambiente. Estos procesos forman una segunda capa de información relacionada con el DNA: la información epigenética (Guerrero, 2009).

La definición de epigenética ha cambiado y se ha adaptado a los diferentes campos de estudio. Se consideró a los componentes epigenéticos como mecanismos auxiliares en la regulación génica y las interacciones genotipo-fenotipo. Cabe destacar que entre las características principales se encuentra: la herencia de los estados de expresión génica (como la impronta génica, por ejemplo) y la herencia nuclear, que no se basa en diferencias en la secuencia del ADN. Con estas dos ideas se sugiere a la epigenética como “el estudio de los cambios en la función de los genes que son hereditarios mitóticos y/o meióticos y que no implican cambios en la secuencia del ADN” (Deans, 2015).

Una célula no traduce todas las proteínas codificadas en su DNA, sino sólo unas cuantas, que dependen del tejido al que pertenece la célula y de sus necesidades del momento. Teniendo esto en cuenta, existen mecanismos que “encienden” y “apagan” los genes y regulan su expresión. Estos mecanismos son epigenéticos porque no están determinados por la información contenida en la secuencia misma del DNA, sino por las proteínas y otras sustancias químicas que la rodean y que afectan la estructura y, por lo tanto, la expresión de los genes. Estos mecanismos responden a distintos factores del ambiente, como la exposición a sustancias químicas, los hábitos alimenticios y, en general, al estilo de vida (Guerrero, 2009).

La regulación epigenética del genoma es un proceso bien establecido que involucra la metilación del DNA, modificaciones en las histonas, estructura de la cromatina y RNA no codificante (Hanson & Skinner, 2016). La metilación del DNA es el mecanismo epigenético primario involucrado en los fenómenos hereditarios transgeneracionales. En varios estudios se ha

demostrado la capacidad de los compuestos y factores ambientales para influir en la metilación del DNA y la epigenética (Skinner, 2008). Estos estudios incluyen la capacidad que tienen algunos compuestos para promover enfermedades en adultos durante varias generaciones, cuando son expuestos de manera temprana durante la embriogénesis y/o el periodo posnatal (Skinner, 2008).

Skinner (2008) propone que la capacidad de un tóxico ambiental (por ejemplo, un disruptor endocrino) para promover un cambio epigenético en la línea germinal, es un mecanismo que resulta en un fenotipo anormal o una enfermedad transgeneracional. Además de las consideraciones de la línea germinal, la exposición y la modificación epigenética de cualquier sistema de órganos en desarrollo, pueden influir en los fenotipos o enfermedades para el individuo y el tejido expuesto. Estas enfermedades pueden provocar tumores, defectos reproductivos y defectos metabólicos (por ejemplo, obesidad y diabetes) (Skinner, 2008).

Anway *et al.* (2005) demostraron que en ratas, tras la exposición de hembras gestantes a vinclozolina (disruptor endocrino) durante la determinación del sexo gonadal embrionario induce un fenotipo adulto en la generación F₁ con capacidad espermatogénica disminuida (infertilidad, número de células y viabilidad). Estos efectos se transfirieron a través de la línea germinal masculina durante varias generaciones (es decir, F₁ a F₄). Los efectos se correlacionan con patrones de metilación del DNA alterados en la línea germinal. La capacidad de un factor ambiental (por ejemplo, un disruptor endocrino) para reprogramar la línea germinal y promover un estado de enfermedad transgeneracional tiene implicaciones significativas para la biología evolutiva y etiología de la enfermedad (Anway *et al.*, 2005).

Aunque se ha demostrado que determinados compuestos y factores ambientales influyen en los fenotipos anormales que aparecen en adultos, los mecanismos moleculares involucrados aún no están claros.

La frecuencia y la reproducibilidad de la mayoría de estos fenotipos anormales que inician en adultos son tales que las mutaciones de la secuencia genética del DNA probablemente no estén involucradas. Sin embargo, la reproducibilidad y frecuencia de la mayoría de los fenotipos anormales o enfermedades de inicio en adultos es significativamente mayor y se puede reproducir. Por ejemplo, la frecuencia de las enfermedades epigenéticas transgeneracionales que inician en adultos varía del 20 al 90% para toda la progenie. Por lo tanto, se sugiere un mecanismo que no implique mutaciones en la secuencia de DNA o un mecanismo genético (Skinner, 2008).

1.5.1. Efecto multigeneracional vs. efecto transgeneracional

Cuando una hembra gestante se expone a un determinado compuesto, existen efectos en múltiples generaciones. Skinner (2008) propone que la exposición de una hembra gestante (F_0) a un tóxico determinado, impacta a la F_1 en desarrollo y por lo tanto a las células de la línea germinal que darán origen a la generación F_2 . La F_0 , F_1 y F_2 tienen una exposición directa al compuesto (Fig. 6). Dando continuidad a las generaciones, la F_3 representa la primera generación no expuesta.

El efecto multigeneracional implica la exposición directa a un compuesto. En contraste, el efecto transgeneracional se transmite entre generaciones a través de la línea germinal sin que exista una exposición directa (Skinner, 2008).

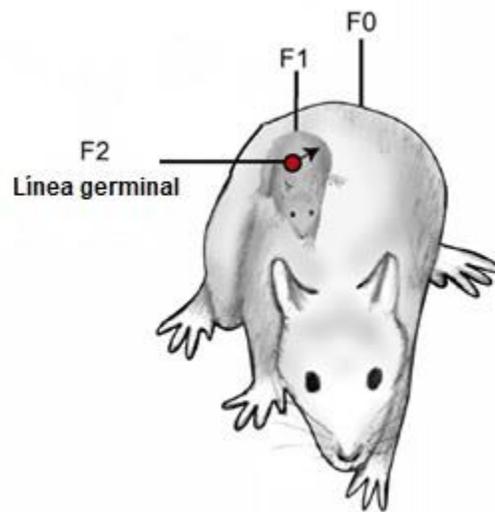


Fig. 6 Esquema de un efecto multigeneracional, donde ocurre una exposición directa de la madre F_0 , embrión F_1 y línea germinal F_2 . La generación F_3 es la primera sin exposición directa. Modificado de Skinner, 2008.

Si la hembra no se encuentra en estado gestante o la exposición se realiza en machos, únicamente existirá una exposición directa en la F₀ y la línea germinal F₁ (Fig. 7).

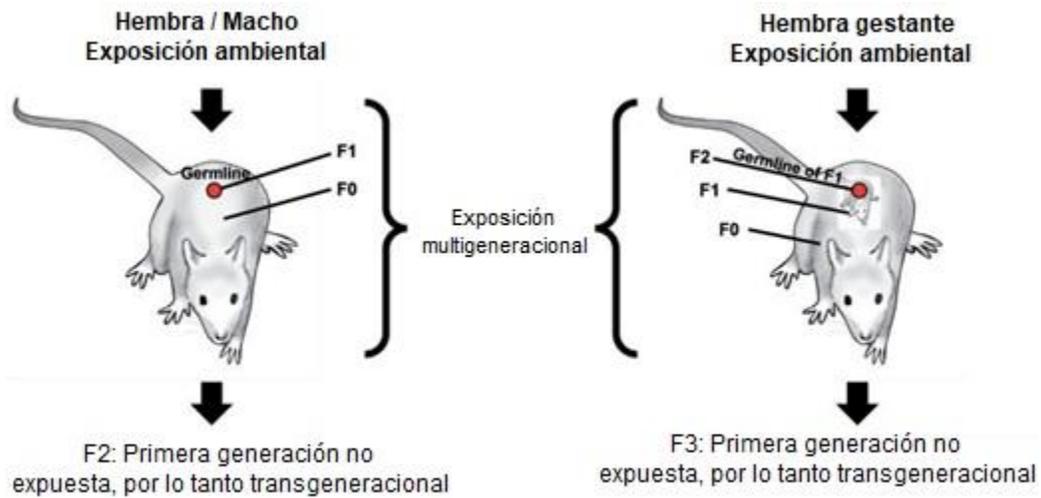


Fig. 7 Efecto transgeneracional. Esquema de exposición y generaciones afectadas. Las exposiciones directas (multigeneracionales) se indican en contraste con la generación transgeneracional sin exposición directa. Tomado de Hanson & Skinner, 2016.

I.6. *Drosophila melanogaster* como modelo biológico

Es importante el estudio de agentes que tengan un potencial tóxico y la capacidad de producir un daño al material genético y/o en las siguientes generaciones. Para ello se han desarrollado ensayos de mutagenicidad con animales y estudios epidemiológicos sobre poblaciones expuestas a dichos agentes.

En las pruebas de detección con mamíferos se debe minimizar el número de animales utilizados en estudios experimentales, además es preciso tener en consideración el tiempo para producir nuevas generaciones a partir de los organismos tratados, el espacio y los recursos económicos para mantener a los organismos.

Drosophila es un modelo bien establecido que, con su estructura genética ampliamente estudiada, muestra casi el 75% de homología funcional con los genes humanos que causan enfermedades. Los mecanismos de desarrollo, celulares y moleculares en *Drosophila* están bien estudiados y comprendidos, por lo que es un organismo modelo para la investigación en varios campos, como genética, medicina, biología del desarrollo, inmunología y toxicología, para dilucidar problemas de interés humano (Rajak *et al.*, 2018).

Muchos de los procarcinógenos que requieren activación metabólica han mostrado actividad mutagénica en *Drosophila*, ya que posee un metabolismo bien desarrollado (Lee *et al.*, 1983).

En investigaciones de genética y toxicología, *Drosophila* es un buen modelo biológico para la evaluación de los efectos producidos por la exposición a xenobióticos, ya que no necesita de un sistema metabólico exógeno debido a su actividad enzimática propia. Se han identificado varios tipos de citocromo P-450 en *Drosophila*. Estos complejos enzimáticos están presentes en larvas de tercer estadio y en adultos, y también se sabe que existen respuestas diferenciales entre larvas más jóvenes y adultos tratados con procarcinógenos (Lee *et al.*, 1983).

Posee complejos enzimáticos semejantes a los que se presentan en la fracción S9 del hígado de los mamíferos, por lo que se les ha utilizado como modelo experimental en mutagénesis, ya que los cambios genéticos inducidos que se detectan en *Drosophila* son similares a los encontrados con sistemas de prueba de mamíferos (Ramos *et al.*, 1993).

Teniendo esto en cuenta, *Drosophila* es un buen modelo biológico para estudiar el posible efecto transgeneracional del 2,4-D. Entre las ventajas que se destacan para su uso está la facilidad para realizar cultivos experimentales, la corta duración de su ciclo de vida (dura de 10 a 12 días a 25°C), la distinción clara entre cada una de las fases de su ciclo de vida (Fig. 8) y la gran cantidad de descendencia que produce una sola pareja (Ramos *et al.*, 1993).

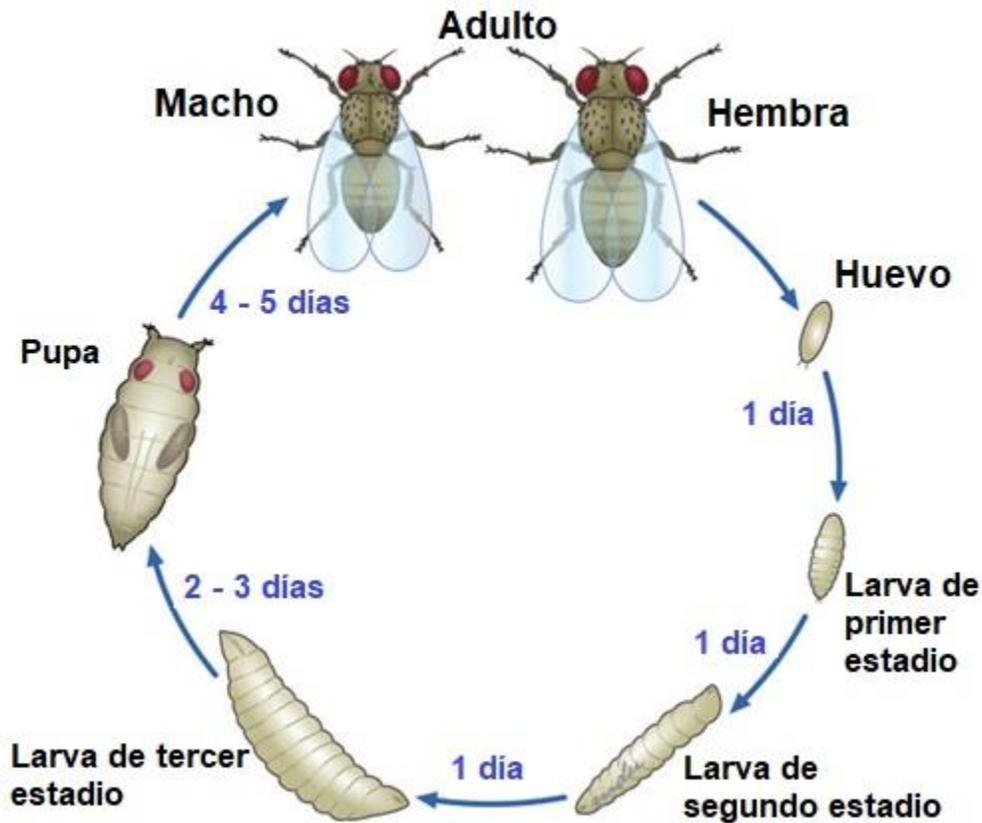


Fig. 8 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. El desarrollo de *Drosophila* se divide en varias etapas: Huevo, larva (primer estadio, segundo estadio y tercer estadio), pupa y adulto. Tomado de Ong *et al.*, 2015.

I.6.1. Generalidades de *Drosophila*

Drosophila presenta un dimorfismo sexual evidente en adultos. Las hembras, por lo general, son de mayor tamaño que los machos. El abdomen del macho tiene en su extremo terminal tres segmentos fusionados visiblemente melanizados; por su parte, el abdomen de la hembra no tiene fusionados estos segmentos y la coloración es uniforme; en la hembra, la terminación del abdomen es ligeramente puntiaguda en contraste con la del macho, que es más redondeada (Fig. 9).

La placa genital de la hembra tiene un ovopositor, mientras que la del macho está formada por múltiples piezas. Los machos presentan “peines sexuales” en la región basal del tarso del primer par de patas, que constan de una hilera de aproximadamente 10 cerdas cortas y gruesas de color negro y con apariencia de peine.

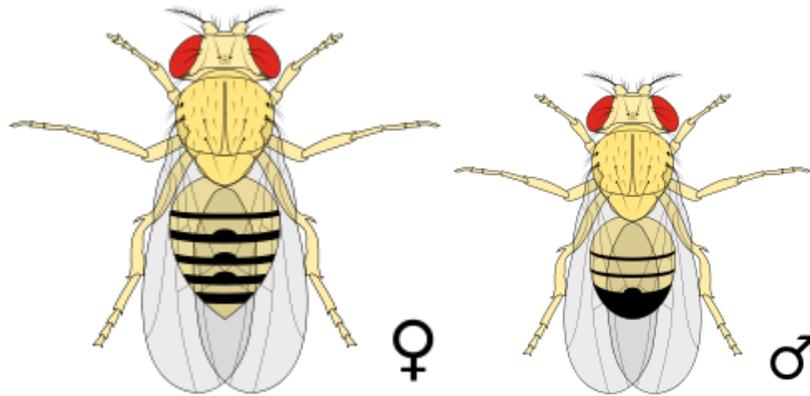


Fig. 9 Vista dorsal de hembra y macho de *Drosophila melanogaster*. Modificado de (https://blogaxotl.files.wordpress.com/2015/09/450px-biology_illustration_animals_insects_drosophila_melanogaster-svg.png).

Al ser un organismo holometábolo, durante su desarrollo, *Drosophila* pasa por una metamorfosis completa: huevo, larva, pupa e imago o adulto (Fig. 8). La mayor parte de los órganos y estructuras del adulto se forman a partir de un complejo de células llamado discos imagales (Ramos *et al.*, 1993). Los discos imagales se encuentran presentes en las larvas y están formados por células determinadas genéticamente pero no diferenciadas, ya que este proceso ocurrirá hasta que la larva entra en metamorfosis para formar al imago. Las larvas presentan 9 pares de discos, más un disco que forma los genitales, teniendo un total de 19 discos imagales (Fig. 10) (Beira & Paro, 2016).

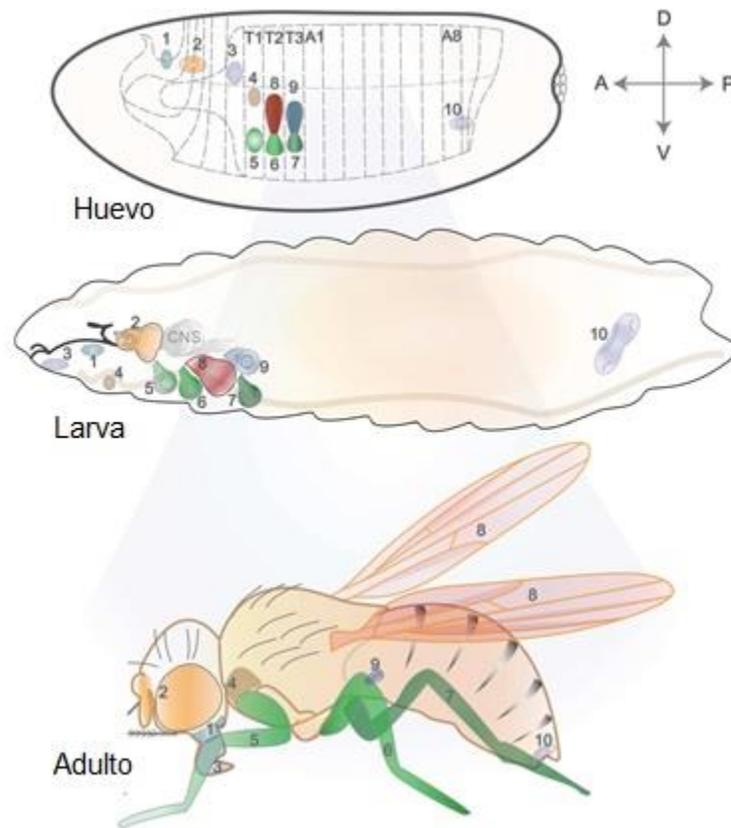


Fig. 10 Discos imagales en *Drosophila*: 1, clipeolabral; 2, antena ocular; 3, labial; 4, humeral (o protorácico); 5, primera pata; 6, segunda pata; 7, tercera pata; 8, ala; 9, halterio o balancin; 10, genital. La orientación de los ejes está indicada por las flechas perpendiculares (A anterior, P posterior, D dorsal, V ventral). Tomado de Beira & Paro, 2016.

I.7. Justificación

Todos los días grandes cantidades de sustancias se liberan al ambiente, lo que representa un peligro potencial para los organismos y de la mayoría, se ignora el alcance de las repercusiones en las generaciones siguientes a la exposición, así como en su capacidad reproductiva. La exposición a estas sustancias puede afectar, entre otros aspectos: la fertilidad, el número de prole, estructuras de órganos reproductores e incluso la integridad del material genético a nivel de gametos, lo que podría representar un daño a la siguiente generación.

Hay evidencias que muestran la toxicidad del 2,4-D en organismos que son expuestos, pero es muy poca la información que existe sobre los efectos que podría tener este compuesto en los descendientes de los organismos que son expuestos. Es relevante conocer si existe un efecto transgeneracional asociado a este compuesto.

I.8. Objetivo general

En este trabajo se busca conocer el efecto reprotóxico inducido por el 2,4-D a lo largo de 3 generaciones de *Drosophila melanogaster* mediante tres esquemas de cruza con moscas tratadas y no tratadas. Con esto se pretende conocer si existe un efecto diferencial en el número de progenie, dependiendo del tipo de cruza que se realice, y establecer si hay diferencias en los defectos que los dos progenitores transmiten a sus descendientes, después de haber sido tratados.

I.8.1. Objetivos particulares

- Establecer la toxicidad del 2,4-D reflejada en la sobrevivencia de organismos tratados.
- Determinar si alguno de los dos sexos se ve más afectado al ser expuestos con el 2,4-D.
- Conocer la fertilidad de los organismos tratados, de la F₁ y F₂.
- Cuantificar la cantidad de progenie F₁, F₂ y F₃.
- Determinar la proporción de sexos de la F₁, F₂ y F₃.
- Evaluar la contribución de los progenitores al daño inducido por el 2,4-D mediante tres diferentes esquemas de cruza: tratada x tratado (TxT), no tratada x tratado (NTxT) y tratada x no tratado (TxNT) y así determinar si alguno de los dos sexos transmite mayor daño.

I.9. Hipótesis

El 2,4-D es una sustancia tóxica considerada como posiblemente carcinógeno para los humanos según la IARC. Se ha visto que una gran cantidad de pesticidas tienen un efecto directo en la salud. La exposición a dichos pesticidas puede ocurrir de dos maneras: directa, lo que provoca un efecto multigeneracional o de manera indirecta que resultaría en un efecto transgeneracional, que se da después de una exposición inicial y el efecto se transmite a través de la línea germinal en ausencia de una exposición directa. Debido al uso desmedido de estos pesticidas y en particular del 2,4-D, se requiere conocer su efecto directo, así como averiguar si tiene un efecto indirecto o transgeneracional.

Si *Drosophila melanogaster* es sensible al ácido 2,4-diclorofenoxiacético, será posible evaluar cambios y deficiencias en la capacidad reproductora de los organismos tratados (efecto reprotóxico), será posible conocer si existen efectos adversos en las siguientes generaciones (efecto transgeneracional) y podremos evaluar si existe un daño diferencial dependiendo del origen parental que fue expuesto a través de diferentes biomarcadores (fertilidad, progenie promedio y proporción de sexos).

II. Materiales y Métodos

II.1. Cepa

Se utilizó la cepa silvestre Canton-S de *D. melanogaster*. Los cultivos se mantuvieron a 25°C y 60 % de humedad relativa en medio estándar para *Drosophila* compuesto de harina de maíz (5.92 %), sacarosa (7.60 %), levadura (4.07 %), agar (0.56 %), nipagin (0.22 %), ác. Propiónico (0.22 %) y agua (81.41 %).

II.2. Compuesto

El compuesto a probar fue el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), CAS: 94-75-7. En México se distribuye como herbicida con el nombre comercial: Hierbamina (Syngenta, presentación líquida).

II.3. Sincronización de cultivos y obtención de larvas

Un cultivo maduro de moscas se transfirió por un período de 8 h a medio fresco. Tres días después, las larvas de 72 ± 4 h de edad se extrajeron del medio utilizando una solución de sacarosa al 20 % según el método de Nöthiger (Nöthiger, 1970).

II.4. Tratamiento

A partir de una concentración inicial de 11.24 mM se obtuvieron nueve concentraciones mediante diluciones sucesivas (1.72×10^{-4} mM es la más baja). Como disolvente y testigo negativo se utilizó agua destilada (Fig. 11).

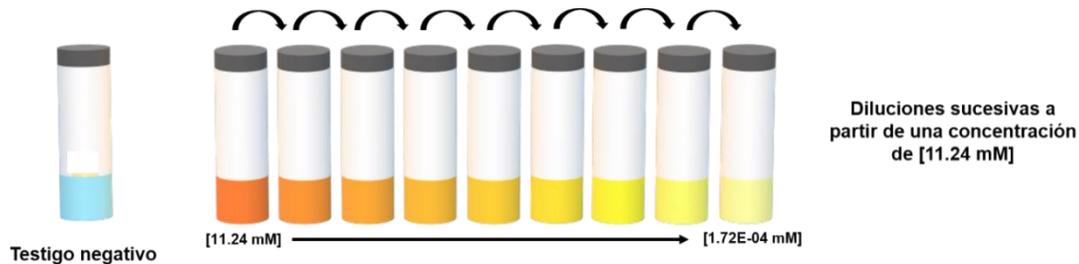


Fig. 11 Diluciones sucesivas a partir de una concentración inicial de 11.24 mM. Como disolvente y testigo negativo se utilizó agua destilada.

Grupos de aproximadamente 100 larvas se colocaron en tubos homeopáticos de fondo plano de 2 cm de diámetro por 9.5 cm de alto que contenían 1 g de medio instantáneo para mosca (Carolina Biological Supply) y 4.5 ml de la solución a probar (Fig. 12). Las larvas permanecieron en este medio hasta completar su desarrollo para un tratamiento subcrónico de 48 h (Fig. 12). El ensayo se hizo por duplicado para cada concentración y el experimento completo se repitió en tres ocasiones.

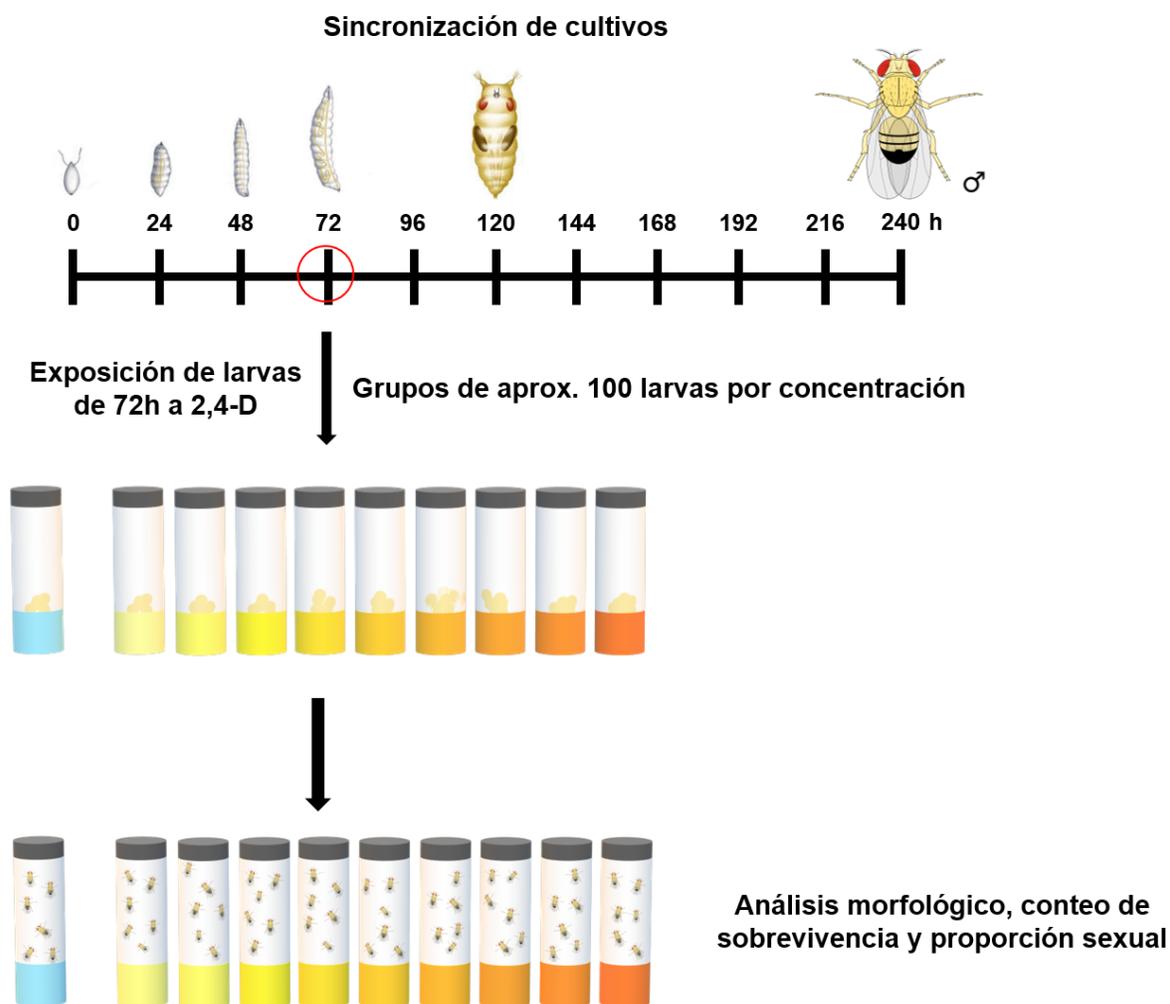


Fig. 12 Diseño experimental utilizado para la exposición de larvas de tercer estadio.

II.5. Registro de toxicidad

Al emerger los adultos se revisó su morfología para sexar a los organismos y buscar alteraciones. Se cuantificó el número de hembras y machos en los lotes testigo y experimentales (Fig. 12).

II.6. Cruzas

Para establecer la actividad reprotóxica del 2, 4-D y determinar el efecto de una sola exposición en los progenitores y en su descendencia, se realizaron 3 esquemas de cruza: hembra virgen tratada x macho tratado (TxT), hembra virgen tratada x macho no tratado (TxNT) y hembra virgen no tratada x macho tratado (NTxT). En paralelo, se mantuvieron cultivos de los cuales se obtienen las hembras y los machos no expuestos. Para cada esquema de cruza se siguieron en total 20 parejas que se colocaron en una relación 1 : 1 (hembra : macho) en tubos individuales con medio de cultivo fresco, libre del 2, 4-D. Los progenitores se retiraron a los 5 días y a los 14 días se revisaron los tubos para determinar la fertilidad (Fig. 13).

Se examinó la morfología de las moscas de la primera generación (F_1) y se registró el número de hembras y machos por tubo.

Para cada concentración se colocaron 20 parejas (F_1 x F_1) en tubos individuales libres del 2, 4-D para obtener la F_2 . Se retiró a los progenitores F_1 a los 5 días y se esperó la emergencia de los adultos. Se obtuvo la fertilidad de las moscas de la F_1 y se registró el número de hembras y machos por tubo. El procedimiento se repitió para obtener a la F_3 .

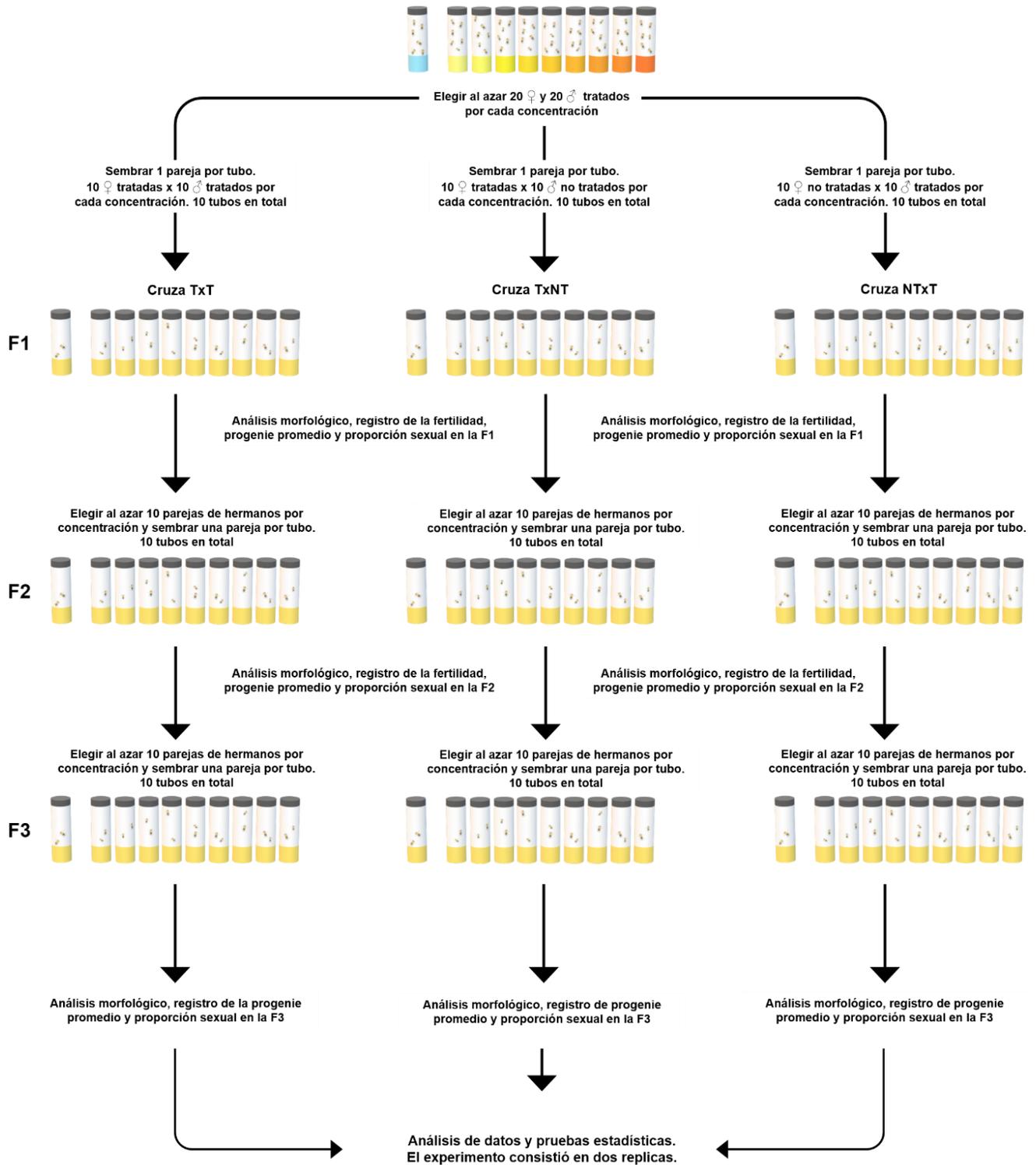


Fig. 13 Diagrama de la metodología utilizada en los 3 esquemas de cruce.

II.7. Análisis morfológico

Al emerger los adultos, se revisó la morfología para sexar a los organismos y buscar alteraciones. Se cuantificó el número de hembras y machos en los lotes testigo y experimentales. También se registraron las alteraciones morfológicas, en donde se consideraron únicamente aquellas que estuvieran relacionadas con la placa genital, alteraciones en las patas y con relación al tamaño de los organismos.

II.8. Análisis de resultados

II.8.1. Toxicidad del 2,4-D

Para determinar la toxicidad del tratamiento se calculó la sobrevivencia promedio (SP) en las series experimentales y en el testigo, de la siguiente manera:

$$SP = \frac{\sum \text{de organismos recobrados}}{\sum \text{de tubos sembrados}}$$

Para determinar si el 2,4D tiene un efecto relacionado con el sexo de los organismos, se obtuvo la proporción sexual (PSx) con base en la siguiente fórmula:

$$PSx = \frac{\sum \text{total de } \text{♀} \text{ ó } \text{♂}}{\sum \text{total de organismos (♀ y ♂)}}$$

En ambos casos se compararon mediante un ANOVA de una vía, a dos colas y $\alpha = 0.05$.

II.8.2. Efecto reprotóxico

Se determinó si existían diferencias entre la fertilidad de las series experimentales y el testigo mediante una prueba de Z para proporciones, a dos colas, con un $\alpha = 0.05$.

Mediante la fertilidad (F) y la progenie promedio (PP), se evalúa cómo afectó el tratamiento con 2,4-D a la capacidad reproductiva y cómo se modificó la cantidad de progenie obtenida en las tres diferentes cruzas.

$$F = \frac{\sum \text{de tubos con progenie}}{\sum \text{tubos sembrados}} \quad PP = \frac{\sum \text{de moscas por concentración}}{\sum \text{de tubos con progenie}}$$

Para determinar el efecto de la exposición de los progenitores en la cantidad de progenie F_1 , F_2 y F_3 se comparó la progenie promedio/familia de las series experimentales y el testigo, mediante un ANOVA de una vía, a dos colas y $\alpha=0.05$, respectivamente.

Se realizó la prueba de Kastenbaum-Bowman (Kastenbaum & Bowman K. O., 1970) y se probó si existen diferencias significativas en el número de malformaciones por concentración entre el número total de organismos recuperados.

Con la finalidad de visualizar de una mejor manera los resultados obtenidos con relación a la progenie promedio, se corrigieron a 1 dividiendo los datos de cada concentración sobre el testigo de su respectivo tratamiento y tipo de cruce. Lo anterior se aplicó a las tres generaciones.

III. Resultados

Los datos obtenidos en este trabajo se evaluaron en tres etapas. En primera instancia, se evaluó el efecto del 2,4-D en la sobrevivencia y en la proporción sexual de los organismos tratados. En la segunda, se analizó el efecto del 2,4-D en la descendencia de los organismos tratados durante tres generaciones para lo cual se registró: la cantidad de progenie, la fertilidad y la proporción sexual en los tres diferentes esquemas de cruza. Por último, se analizó la morfología de los organismos para determinar la presencia de algún fenotipo anormal.

III.1. Toxicidad del 2,4-D

Para evaluar el efecto tóxico del 2,4-D se calculó el promedio de la sobrevivencia de las moscas tratadas con cada una de las concentraciones de 2,4-D utilizadas. Los resultados muestran que el 2,4-D tuvo un efecto letal en la concentración de 1.12×10^1 mM (Fig. 14 y Tabla 2), pues ningún organismo sobrevivió a dicha concentración.

En el rango de concentración de 1.72×10^{-4} mM a 1.10×10^{-2} mM de 2,4-D, hay un incremento en el número de organismos que lograron sobrevivir, tomando como referencia al testigo (Fig. 14 y Tabla 2). En concentraciones mayores, empezó a disminuir el número de organismos recobrados hasta llegar a la concentración letal (1.12×10^1 mM; Fig. 14 y Tabla 1). Al no recuperar moscas en la concentración más alta (1.12×10^1 mM), no hubo manera de evaluar el efecto del 2,4-D en sus descendientes.

Los promedios de sobrevivencia, proporción sexual y fertilidad obtenidos después de la exposición de larvas al 2,4-D se muestran en la Tabla 2.

Sin importar el sistema de cruza, la exposición al 2,4-D no afectó la fertilidad de los organismos expuestos (Tabla 2).

Tabla 2. Supervivencia promedio, proporción sexual promedio y fertilidad de moscas tratadas con 2,4-D.

| 2,4-D [mM] | N | S \pm ee | α | PS ♀ \pm ee | α | PS ♂ \pm ee | α | F TxT | F TxNT | F NTxT |
|------------|-----|-----------------|----------|------------------------|----------|------------------------|----------|-------|--------|--------|
| Test | 738 | 105.4 \pm 9.2 | - | 0.508 \pm 0.01 | - | 0.492 \pm 0.01 | - | 0.90 | 0.95 | 1.00 |
| 1.72E-04 | 565 | 113.0 \pm 4.8 | - | 0.509 \pm 0.04 | - | 0.491 \pm 0.04 | - | 0.95 | 1.00 | 0.95 |
| 6.86E-04 | 855 | 122.1 \pm 4.6 | - | 0.480 \pm 0.02 | - | 0.520 \pm 0.02 | - | 1.00 | 1.00 | 0.90 |
| 2.74E-03 | 791 | 113.0 \pm 6.0 | - | 0.491 \pm 0.02 | - | 0.509 \pm 0.02 | - | 0.95 | 0.90 | 0.85 |
| 1.10E-02 | 834 | 119.1 \pm 6.7 | - | 0.477 \pm 0.02 | - | 0.523 \pm 0.02 | - | 1.00 | 0.90 | 0.85 |
| 4.39E-02 | 757 | 108.1 \pm 4.4 | - | 0.473 \pm 0.02 | - | 0.527 \pm 0.02 | - | 1.00 | 0.80 | 0.95 |
| 1.76E-01 | 759 | 108.4 \pm 5.5 | - | 0.463 \pm 0.02 | - | 0.537 \pm 0.02 | - | 0.95 | 0.95 | 0.95 |
| 7.03E-01 | 685 | 97.9 \pm 6.3 | - | 0.505 \pm 0.03 | - | 0.495 \pm 0.03 | - | 1.00 | 1.00 | 0.95 |
| 2.81E+00 | 588 | 84.0 \pm 5.2 | - | 0.445 \pm 0.02 | - | 0.555 \pm 0.02 | - | 1.00 | 0.95 | 0.90 |
| 1.12E+01 | 4 | 0.6 \pm 0.4 | * | 0.667 \pm 0.14 | - | 0.333 \pm 0.14 | - | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

N, número total de moscas por concentración; S, Supervivencia promedio; PS, Proporción sexual promedio; ee, Error estándar; F, Fertilidad; α , ANOVA; El * indica diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$.

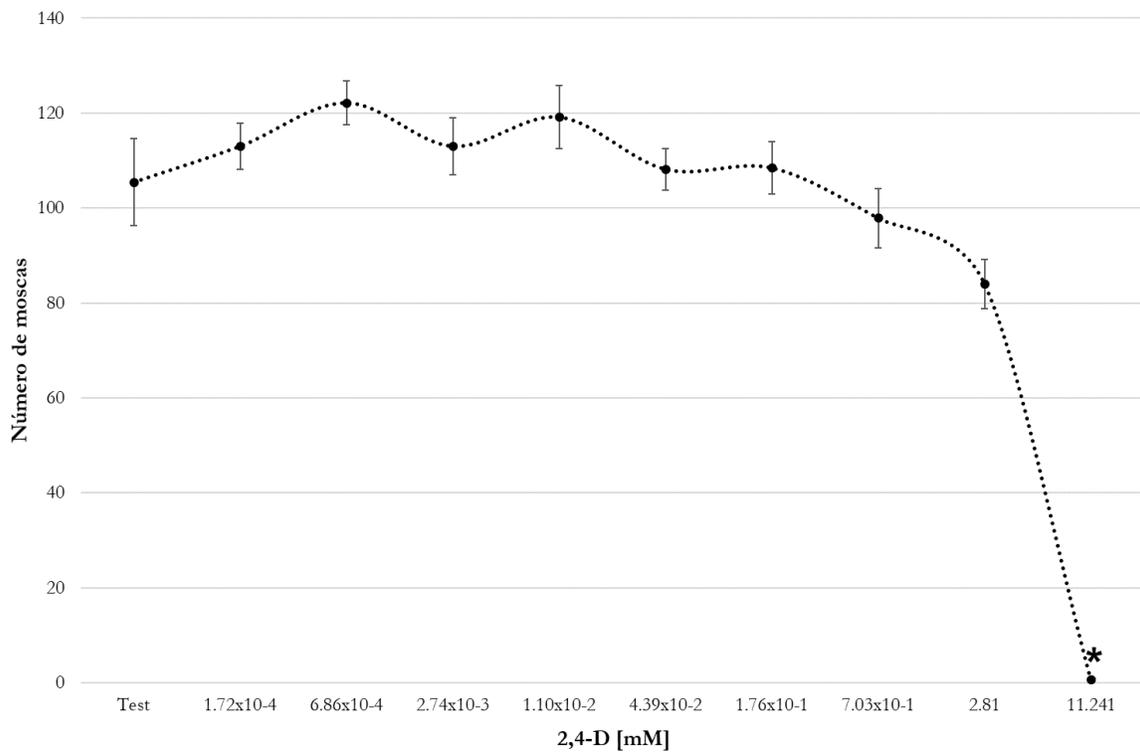


Fig. 14. Supervivencia (promedio \pm ee) de moscas tratadas con 2,4-D durante el desarrollo larvario. El * indica diferencias significativas con respecto al testigo ($P < 0.05$).

En la Fig. 15 se muestra la proporción sexual promedio de los organismos tratados con diferentes concentraciones de 2,4-D. En todos los tratamientos se recuperaron más machos que hembras, a excepción del testigo y las concentraciones 1.72×10^{-4} y 7.03×10^{-1} mM (Fig. 15 y Tabla 2).

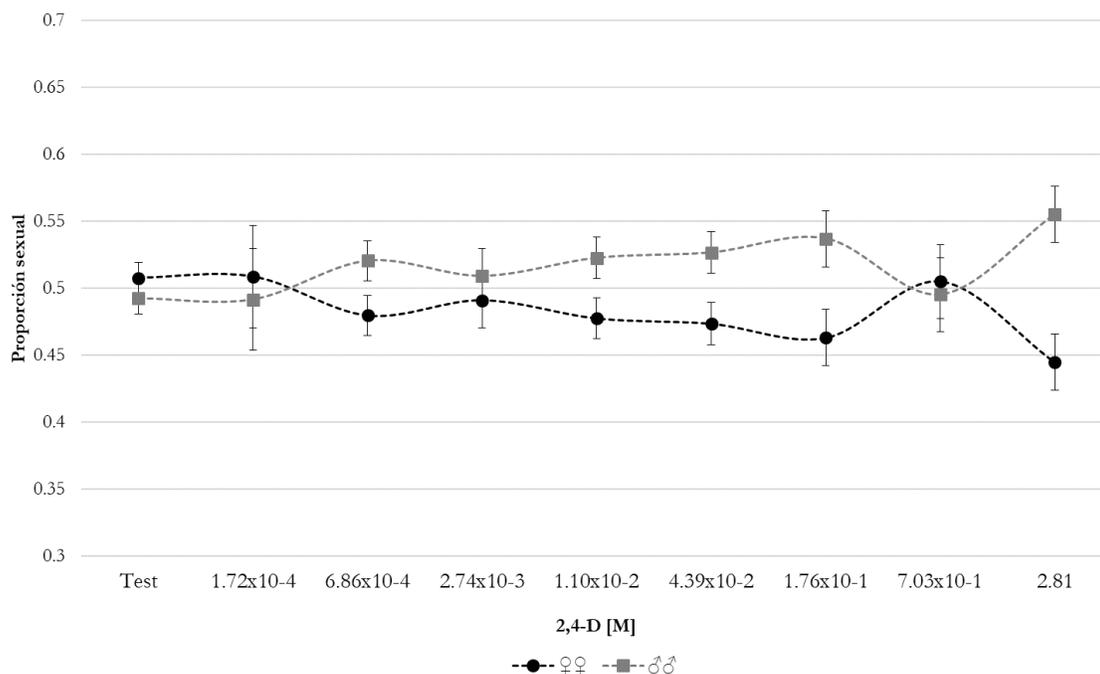


Fig. 15. Promedio de la proporción sexual de moscas tratadas con 2,4-D durante el desarrollo larvario.

El tratamiento parece tener un efecto que estimula la sobrevivencia, recuperamos más organismo en las concentraciones medias (6.86×10^{-4} a 1.76×10^{-1}) en comparación con el testigo. Si tomamos en cuenta que la proporción sexual esperada entre machos y hembras es del 0.5, para cada sexo, el efecto que tiene el tratamiento sobre las moscas expuestas pareciera estimular la sobrevivencia de los machos. Se observa una tendencia de recuperar más machos que hembras (Fig. 15) en las diferentes concentraciones (a excepción de las concentraciones 1.72×10^{-4} y 7.03×10^{-1} mM). Este efecto se conoce como hormesis y se discutirá más adelante.

III.2. Efecto reprotóxico y transgeneracional.

Para determinar si el 2,4-D afectó la capacidad reproductiva de los organismos tratados, se realizaron 3 esquemas de cruza. En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos de la progenie promedio y la fertilidad para cada una de las diferentes cruza, a lo largo de 3 generaciones.

La fertilidad de los organismos en la F₁ y F₂ no se vio afectada de manera significativa (Tabla 3).

Tabla 3. Progenie promedio y fertilidad de los tres tipos de cruza (TxT, TxNT y NTxT) a lo largo de 3 generaciones

| 2,4-D [mM] | F1 | | | | | F2 | | | | | F3 | | |
|------------|-------------|--------------|---|------|---|------|--------------|---|------|---|------|--------------|---|
| | N | P ± ee | α | F | β | N | P ± ee | α | F | β | N | P ± ee | α |
| | TxT | | | | | | | | | | | | |
| Test | 1977 | 109.8 ± 8.2 | - | 1.00 | - | 2559 | 127.9 ± 6.9 | - | 1.00 | - | 2217 | 110.8 ± 11.3 | - |
| 1.72E-04 | 1872 | 98.5 ± 8.5 | - | 0.95 | - | 2579 | 135.7 ± 6.4 | - | 1.00 | - | 2476 | 123.8 ± 11.1 | - |
| 6.86E-04 | 1894 | 94.7 ± 8.3 | - | 0.90 | - | 2062 | 114.5 ± 9.6 | - | 1.00 | - | 2558 | 127.9 ± 11.9 | - |
| 2.74E-03 | 1848 | 97.2 ± 8.3 | - | 1.00 | - | 2453 | 122.6 ± 9.7 | - | 0.90 | - | 1835 | 101.9 ± 6.0 | - |
| 1.10E-02 | 2310 | 115.5 ± 7.2 | - | 1.00 | - | 2599 | 129.9 ± 9.6 | - | 0.95 | - | 2109 | 111.0 ± 10.9 | - |
| 4.39E-02 | 1940 | 97.0 ± 10.8 | - | 1.00 | - | 2566 | 128.3 ± 9.8 | - | 0.90 | - | 2114 | 117.4 ± 10.9 | - |
| 1.76E-01 | 1871 | 98.4 ± 8.0 | - | 0.95 | - | 2017 | 112.0 ± 8.4 | - | 0.90 | - | 1899 | 105.5 ± 9.4 | - |
| 7.03E-01 | 2007 | 100.3 ± 5.8 | - | 1.00 | - | 2285 | 114.2 ± 9.6 | - | 0.95 | - | 2420 | 127.3 ± 8.2 | - |
| 2.81E+00 | 1713 | 85.6 ± 6.2 | - | 1.00 | - | 2123 | 106.1 ± 12.4 | - | 1.00 | - | 2398 | 119.9 ± 7.9 | - |
| | TxNT | | | | | | | | | | | | |
| Test | 2035 | 107.1 ± 8.1 | - | 1.00 | - | 2697 | 134.8 ± 10.7 | - | 0.95 | - | 2541 | 133.7 ± 8.5 | - |
| 1.72E-04 | 1985 | 99.2 ± 6.5 | - | 1.00 | - | 2523 | 126.1 ± 11.9 | - | 1.00 | - | 2603 | 130.1 ± 7.7 | - |
| 6.86E-04 | 1723 | 86.1 ± 6.3 | - | 1.00 | - | 2754 | 137.7 ± 11.6 | - | 0.95 | - | 2176 | 114.5 ± 4.7 | - |
| 2.74E-03 | 1604 | 89.1 ± 10.1 | - | 1.00 | - | 2071 | 103.5 ± 10.9 | - | 1.00 | - | 2156 | 107.8 ± 12.7 | - |
| 1.10E-02 | 1565 | 86.9 ± 10.8 | - | 0.90 | - | 2090 | 116.1 ± 12.0 | - | 0.90 | - | 2149 | 119.3 ± 7.1 | - |
| 4.39E-02 | 1390 | 86.8 ± 10.3 | - | 1.00 | - | 2612 | 130.6 ± 6.9 | - | 0.85 | - | 1923 | 113.1 ± 8.1 | - |
| 1.76E-01 | 1550 | 81.5 ± 9.4 | - | 0.95 | - | 2363 | 124.3 ± 8.0 | - | 1.00 | - | 2395 | 119.7 ± 8.7 | - |
| 7.03E-01 | 1689 | 84.4 ± 6.2 | - | 1.00 | - | 2763 | 138.1 ± 10.2 | - | 0.95 | - | 2395 | 126.0 ± 10.9 | - |
| 2.81E+00 | 1986 | 104.5 ± 7.2 | - | 1.00 | - | 2828 | 141.4 ± 5.8 | - | 0.95 | - | 2340 | 123.1 ± 9.1 | - |
| | NTxT | | | | | | | | | | | | |
| Test | 1673 | 83.6 ± 8.2 | - | 0.85 | - | 1826 | 107.4 ± 13.1 | - | 0.90 | - | 2282 | 126.7 ± 11.1 | - |
| 1.72E-04 | 1838 | 96.7 ± 8.6 | - | 0.65 | - | 2048 | 157.5 ± 6.8 | * | 1.00 | - | 2387 | 119.3 ± 9.1 | - |
| 6.86E-04 | 2185 | 121.3 ± 14.1 | - | 1.00 | - | 2248 | 112.4 ± 12.8 | - | 1.00 | - | 1824 | 91.2 ± 9.4 | - |
| 2.74E-03 | 2482 | 146.0 ± 9.4 | * | 0.90 | - | 2209 | 122.7 ± 12.6 | - | 1.00 | - | 1892 | 94.6 ± 10.5 | - |
| 1.10E-02 | 2220 | 130.5 ± 9.8 | * | 0.85 | - | 2204 | 129.6 ± 12.3 | - | 0.95 | - | 1476 | 77.6 ± 11.2 | * |
| 4.39E-02 | 2477 | 130.3 ± 11.5 | * | 0.90 | - | 1873 | 104.0 ± 12.9 | - | 0.95 | - | 1662 | 87.4 ± 12.0 | - |
| 1.76E-01 | 1909 | 100.4 ± 9.0 | - | 1.00 | - | 1933 | 96.6 ± 7.4 | - | 0.95 | - | 1480 | 77.8 ± 7.1 | * |
| 7.03E-01 | 1938 | 102.0 ± 9.2 | - | 0.85 | - | 1359 | 79.9 ± 11.7 | - | 0.90 | - | 1391 | 77.2 ± 13.2 | * |
| 2.81E+00 | 2593 | 144.0 ± 9.8 | * | 0.95 | - | 2611 | 137.4 ± 8.7 | - | 1.00 | - | 2343 | 117.1 ± 9.2 | - |

N, número de total de moscas por concentración; P, Progenie promedio; ee, Error estándar; α, prueba ANOVA; F, Fertilidad; β, Prueba de Z para proporciones; El * indica diferencias estadísticamente significativas P<0.05.

III.2.1. Cruza TxT.

En la Fig. 16 se muestra el índice de la sobrevivencia promedio, la progenie promedio de la F₁, F₂ y F₃ de la cruza TxT. El índice se obtuvo independientemente para cada generación, dividiendo el número de la progenie promedio de cada concentración entre el número de progenie promedio obtenida en su testigo correspondiente.

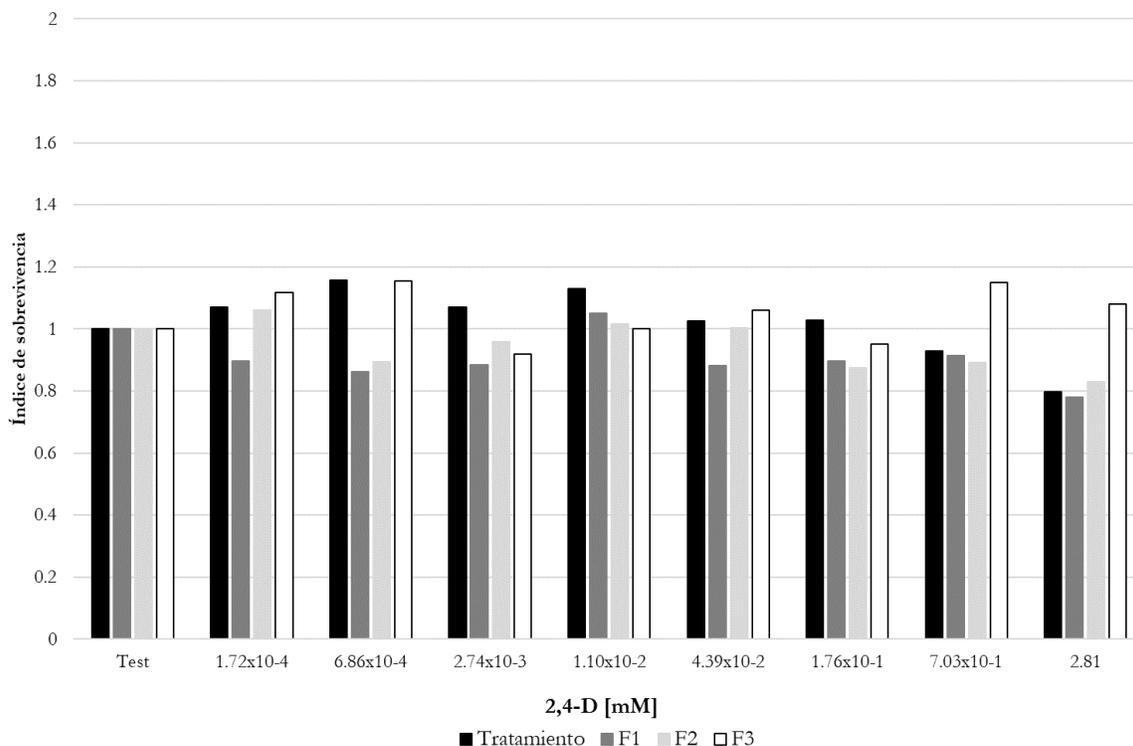


Fig. 16. Sobrevivencia promedio de moscas tratadas con 2, 4-D, progenie promedio F₁, F₂ y F₃ de la cruza TxT.

La progenie promedio proveniente de los tratamientos con diferentes concentraciones se mantuvo similar al testigo durante las tres generaciones. Durante las primeras dos generaciones (F₁ y F₂), en las concentraciones 6.86x10⁻⁴, 7.03x10⁻¹ y 2.81, el número de progenie se mantuvo por debajo del testigo, pero al llegar a la F₃ se observó un incremento en el número de progenie incluso ligeramente mayor que en el testigo.

Los resultados de la proporción sexual promedio obtenidos en la cruza TxT a lo largo de las tres generaciones se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Proporción sexual promedio de la cruce TxT durante 3 generaciones.

| 2,4-D [mM] | TxT | | | | | | | | | | | |
|------------|---------------|---|---------------|---|---------------|---|---------------|---|---------------|---|---------------|---|
| | F1 | | | | F2 | | | | F3 | | | |
| | PS ♀ ± ee | α | PS ♂ ± ee | α | PS ♀ ± ee | α | PS ♂ ± ee | α | PS ♀ ± ee | α | PS ♂ ± ee | α |
| Test | 0.523 ± 0.015 | - | 0.477 ± 0.015 | - | 0.473 ± 0.012 | - | 0.527 ± 0.012 | - | 0.521 ± 0.013 | - | 0.479 ± 0.013 | - |
| 1.72E-04 | 0.524 ± 0.030 | - | 0.476 ± 0.030 | - | 0.509 ± 0.015 | - | 0.491 ± 0.015 | - | 0.479 ± 0.010 | - | 0.521 ± 0.010 | - |
| 6.86E-04 | 0.497 ± 0.013 | - | 0.503 ± 0.013 | - | 0.509 ± 0.011 | - | 0.491 ± 0.011 | - | 0.521 ± 0.010 | - | 0.479 ± 0.010 | - |
| 2.74E-03 | 0.467 ± 0.015 | - | 0.533 ± 0.015 | - | 0.488 ± 0.024 | - | 0.512 ± 0.024 | - | 0.501 ± 0.014 | - | 0.499 ± 0.014 | - |
| 1.10E-02 | 0.514 ± 0.012 | - | 0.486 ± 0.012 | - | 0.497 ± 0.013 | - | 0.503 ± 0.013 | - | 0.488 ± 0.019 | - | 0.512 ± 0.019 | - |
| 4.39E-02 | 0.527 ± 0.019 | - | 0.473 ± 0.019 | - | 0.506 ± 0.013 | - | 0.494 ± 0.013 | - | 0.515 ± 0.011 | - | 0.485 ± 0.011 | - |
| 1.76E-01 | 0.512 ± 0.014 | - | 0.488 ± 0.014 | - | 0.498 ± 0.010 | - | 0.502 ± 0.010 | - | 0.544 ± 0.020 | - | 0.456 ± 0.020 | - |
| 7.03E-01 | 0.493 ± 0.017 | - | 0.507 ± 0.017 | - | 0.504 ± 0.014 | - | 0.496 ± 0.014 | - | 0.506 ± 0.015 | - | 0.494 ± 0.015 | - |
| 2.81E+00 | 0.487 ± 0.015 | - | 0.513 ± 0.015 | - | 0.504 ± 0.011 | - | 0.496 ± 0.011 | - | 0.498 ± 0.013 | - | 0.502 ± 0.013 | - |

Proporción sexual promedio; ee, Error estándar; α, Pruebas de ANOVA.

Se detectaron fluctuaciones en la proporción sexual dentro de un rango similar al testigo, por lo que no existen diferencias significativas (Tabla 4). La proporción sexual, tanto en hembras como en machos se mantuvo cerca de 0.5. (Fig. 17).

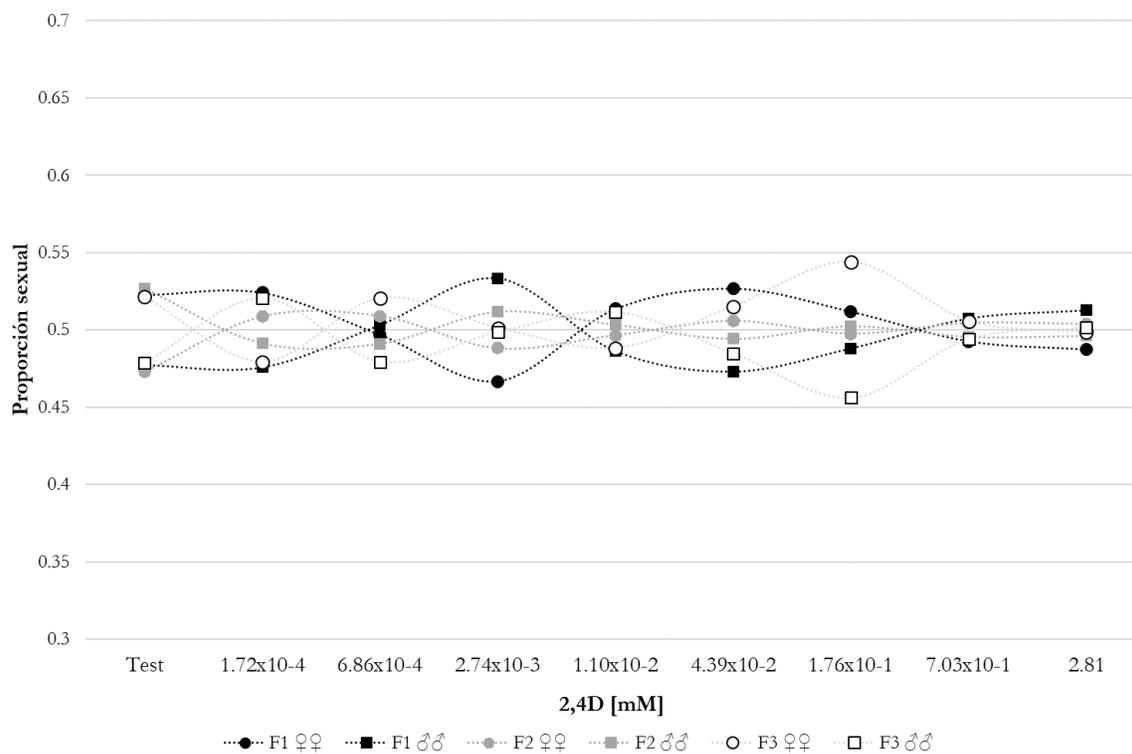


Fig. 17. Promedio de la proporción sexual de moscas provenientes de la cruce TxT durante tres generaciones.

III.2.2. Cruza TxNT.

En la Fig. 18 se muestra el índice de la sobrevivencia promedio, progenie promedio de la F₁, F₂ y F₃ de la cruza TxNT. El índice se obtuvo independientemente para cada generación, dividiendo el número de la progenie promedio de cada concentración entre el número de progenie promedio obtenida en el testigo.

Cuando la hembra fue la única expuesta, se observó una tendencia en donde la progenie de todas las concentraciones es menor o igual a la obtenida en el testigo (Fig. 18).

Durante la F₁, F₂ y F₃ se observa una tendencia de obtener menor cantidad de progenie comparado con el testigo. En las dos concentraciones más altas (7.03×10^{-1} y 2.81 mM) la cantidad de progenie es similar al testigo.

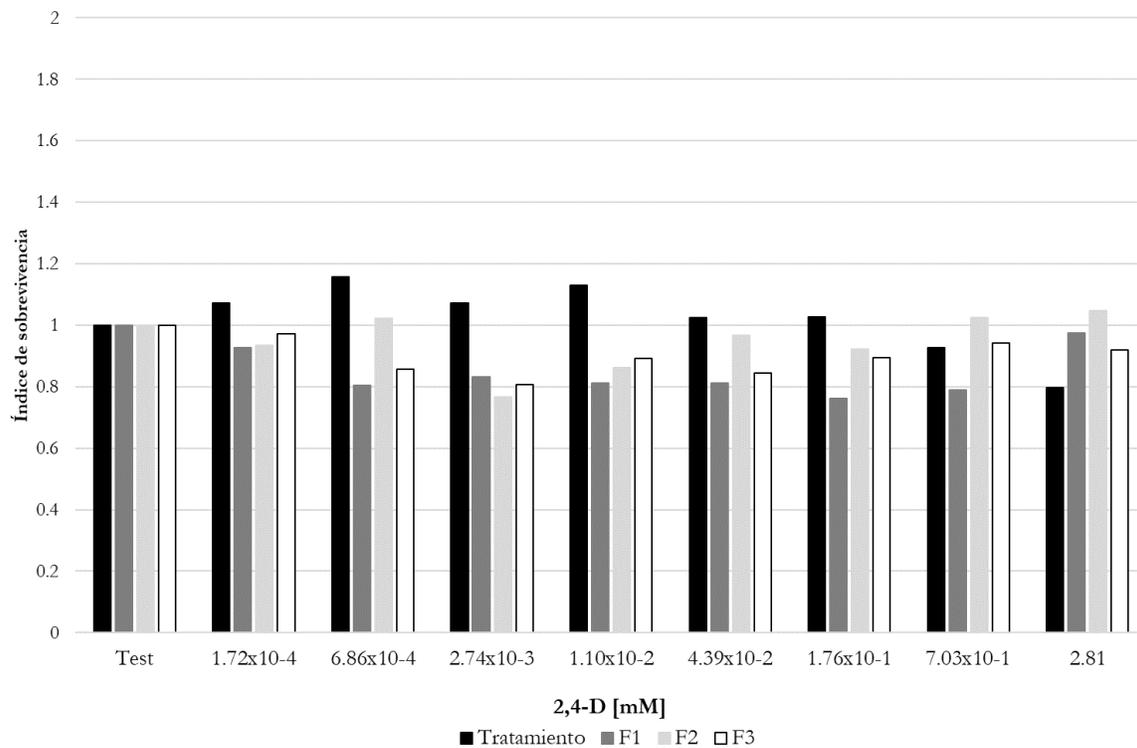


Fig. 18. Sobrevivencia promedio de moscas tratadas con 2, 4-D y progenie F₁, F₂ y F₃ de la cruza TxNT.

Los promedios de la proporción sexual obtenidos en la cruza TxNT a lo largo de las tres generaciones se muestran en la Tabla 5

Tabla 5. Proporción sexual promedio de la cruce TxNT durante 3 generaciones.

| 2,4-D [mM] | TxNT | | | | | | | | | | | |
|------------|---------------|---|---------------|---|---------------|---|---------------|---|---------------|---|---------------|---|
| | F1 | | | | F2 | | | | F3 | | | |
| | PS ♀ ± ee | α | PS ♂ ± ee | α | PS ♀ ± ee | α | PS ♂ ± ee | α | PS ♀ ± ee | α | PS ♂ ± ee | α |
| Test | 0.519 ± 0.018 | - | 0.481 ± 0.018 | - | 0.511 ± 0.011 | - | 0.489 ± 0.011 | - | 0.514 ± 0.011 | - | 0.486 ± 0.011 | - |
| 1.72E-04 | 0.499 ± 0.008 | - | 0.501 ± 0.008 | - | 0.509 ± 0.022 | - | 0.491 ± 0.022 | - | 0.495 ± 0.012 | - | 0.505 ± 0.012 | - |
| 6.86E-04 | 0.499 ± 0.016 | - | 0.501 ± 0.016 | - | 0.515 ± 0.017 | - | 0.485 ± 0.017 | - | 0.488 ± 0.012 | - | 0.512 ± 0.012 | - |
| 2.74E-03 | 0.539 ± 0.021 | - | 0.461 ± 0.021 | - | 0.477 ± 0.031 | - | 0.523 ± 0.031 | - | 0.520 ± 0.016 | - | 0.480 ± 0.016 | - |
| 1.10E-02 | 0.494 ± 0.020 | - | 0.506 ± 0.020 | - | 0.547 ± 0.027 | - | 0.453 ± 0.027 | - | 0.522 ± 0.012 | - | 0.478 ± 0.012 | - |
| 4.39E-02 | 0.488 ± 0.025 | - | 0.512 ± 0.025 | - | 0.516 ± 0.014 | - | 0.484 ± 0.014 | - | 0.508 ± 0.011 | - | 0.492 ± 0.011 | - |
| 1.76E-01 | 0.497 ± 0.020 | - | 0.503 ± 0.020 | - | 0.534 ± 0.016 | - | 0.466 ± 0.016 | - | 0.504 ± 0.012 | - | 0.496 ± 0.012 | - |
| 7.03E-01 | 0.506 ± 0.021 | - | 0.494 ± 0.021 | - | 0.479 ± 0.009 | - | 0.521 ± 0.009 | - | 0.477 ± 0.033 | - | 0.523 ± 0.033 | - |
| 2.81E+00 | 0.472 ± 0.023 | - | 0.528 ± 0.023 | - | 0.502 ± 0.010 | - | 0.498 ± 0.010 | - | 0.510 ± 0.011 | - | 0.490 ± 0.011 | - |

Proporción sexual promedio; ee, Error estándar; α, Pruebas de ANOVA.

A pesar de que hubo variación en la proporción sexual, no existen diferencias significativas ya que los valores se mantienen dentro de un rango similar al testigo (Tabla 5). La proporción sexual, tanto en hembras como en machos, se mantuvo cerca de 0.5 en todas las concentraciones y a lo largo de la F₁, F₂ y F₃ (Fig. 19).

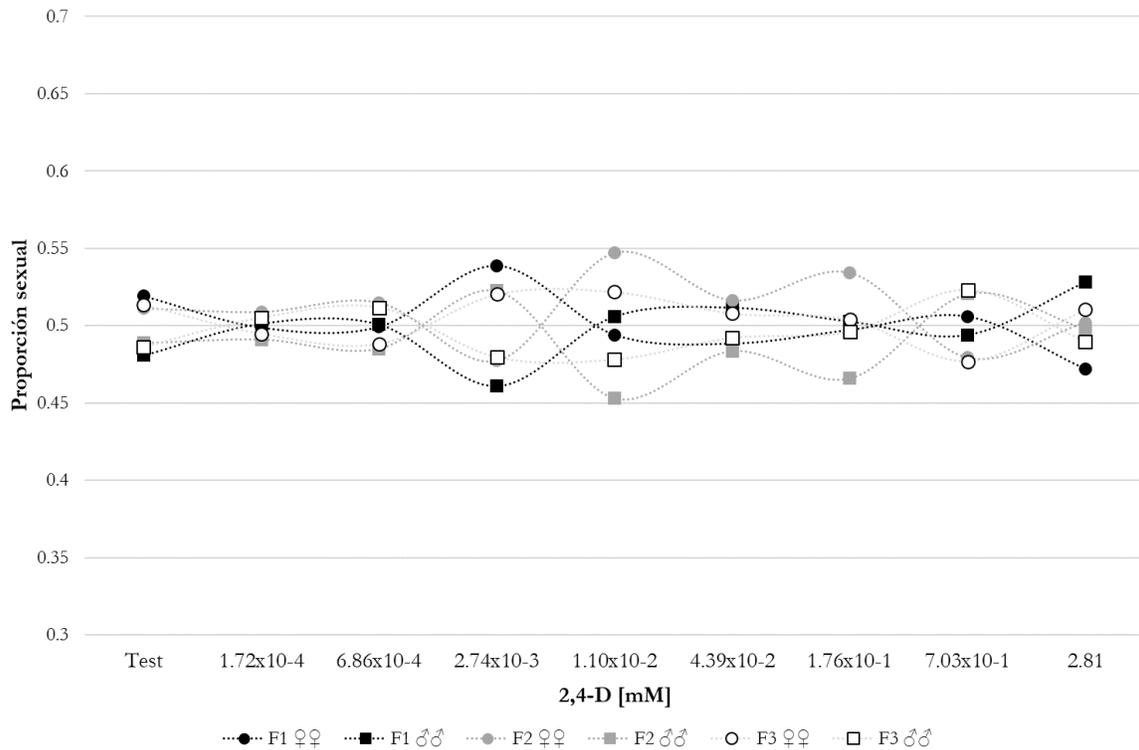


Fig. 19. Promedio de la proporción sexual de moscas provenientes de la cruce TxNT durante tres generaciones.

III.2.3. Cruza NTxT.

En la Fig. 20 se muestra el índice de la sobrevivencia promedio, progenie promedio de la F₁, F₂ y F₃ de la cruza NTxT. El índice se obtuvo independientemente para cada generación, dividiendo el número de la progenie promedio de cada concentración entre el número de progenie promedio obtenida en el testigo.

Cuando el macho es el único expuesto al 2,4-D, la progenie que se obtiene durante la F₁ siempre es mayor que el testigo y en las concentraciones 2.74×10^{-3} , 1.10×10^{-2} , 4.39×10^{-2} y 2.81 mM hubo diferencias estadísticamente significativas.

En la F₂ hubo un incremento en el valor de la progenie en la concentración 1.72×10^{-4} mM que llegó a ser estadísticamente significativo. En las concentraciones siguientes, hay una disminución gradual de la progenie, la tendencia es recuperar menos organismos conforme aumenta la concentración, excepto en la concentración 2.81 mM en donde la progenie recuperada es mayor con respecto al testigo.

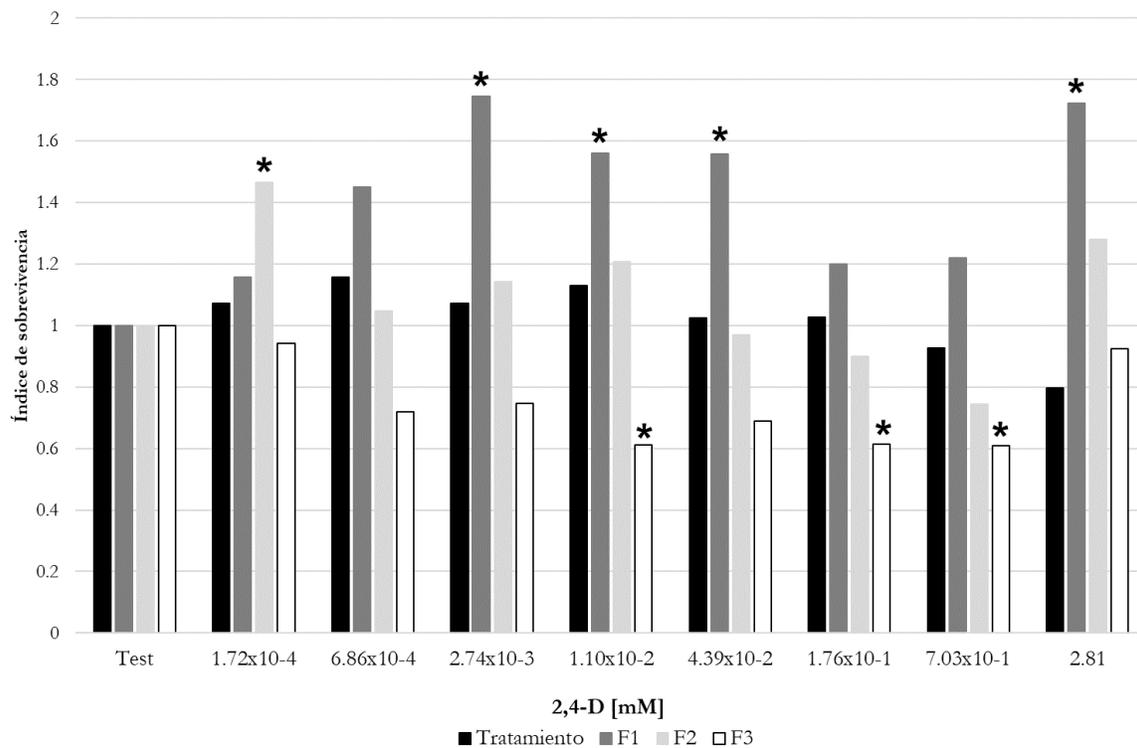


Fig. 20. Sobrevivencia promedio de moscas tratadas con 2, 4-D y progenie F₁, F₂ y F₃ de la cruza NTxT. El * indica diferencias significativas con respecto al testigo (P < 0.05).

En la F₃ los valores siempre fueron menores que en el testigo, aunque solo en las concentraciones 1.10x10⁻², 1.76x10⁻¹ y 7.03x10⁻¹ mM se encontraron diferencias significativas. El promedio de la progenie disminuyó gradualmente conforme aumentó la concentración, pero al llegar a la concentración más alta (2.81 mM), hubo un aumento en la cantidad de progenie hasta llegar a ser similar al testigo.

En la cruce NTxT se visualiza una tendencia en cada generación. Durante la F₁, se obtiene más progenie, en la F₂ la progenie se mantiene muy similar o cerca de los valores del testigo y en la F₃ hay una disminución en el número de progenie.

La Tabla 6 muestra los resultados de la proporción sexual promedio. La proporción sexual, tanto en hembras como en machos, se mantuvo cerca de 0.5 a lo largo de la F₁, F₂ y F₃ (Fig. 21).

Tabla 6. Proporción sexual promedio de la cruce NTxT durante 3 generaciones.

| 2,4-D [mM] | NTxT | | | | | | | | | | | |
|------------|---------------|---|---------------|---|---------------|---|---------------|---|---------------|---|---------------|---|
| | F1 | | | | F2 | | | | F3 | | | |
| | PS ♀ ± ee | α | PS ♂ ± ee | α | PS ♀ ± ee | α | PS ♂ ± ee | α | PS ♀ ± ee | α | PS ♂ ± ee | α |
| Test | 0.540 ± 0.015 | - | 0.460 ± 0.015 | - | 0.544 ± 0.018 | - | 0.456 ± 0.018 | - | 0.519 ± 0.020 | - | 0.481 ± 0.020 | - |
| 1.72E-04 | 0.539 ± 0.013 | - | 0.461 ± 0.013 | - | 0.508 ± 0.014 | - | 0.492 ± 0.014 | - | 0.534 ± 0.012 | - | 0.466 ± 0.012 | - |
| 6.86E-04 | 0.465 ± 0.013 | - | 0.535 ± 0.013 | - | 0.488 ± 0.013 | - | 0.512 ± 0.013 | - | 0.486 ± 0.023 | - | 0.514 ± 0.023 | - |
| 2.74E-03 | 0.517 ± 0.015 | - | 0.483 ± 0.015 | - | 0.495 ± 0.020 | - | 0.505 ± 0.020 | - | 0.533 ± 0.023 | - | 0.467 ± 0.023 | - |
| 1.10E-02 | 0.513 ± 0.017 | - | 0.487 ± 0.017 | - | 0.501 ± 0.010 | - | 0.499 ± 0.010 | - | 0.539 ± 0.035 | - | 0.461 ± 0.035 | - |
| 4.39E-02 | 0.482 ± 0.028 | - | 0.518 ± 0.028 | - | 0.502 ± 0.030 | - | 0.498 ± 0.030 | - | 0.476 ± 0.018 | - | 0.524 ± 0.018 | - |
| 1.76E-01 | 0.518 ± 0.013 | - | 0.482 ± 0.013 | - | 0.487 ± 0.018 | - | 0.513 ± 0.018 | - | 0.514 ± 0.020 | - | 0.486 ± 0.020 | - |
| 7.03E-01 | 0.509 ± 0.013 | - | 0.491 ± 0.013 | - | 0.495 ± 0.015 | - | 0.505 ± 0.015 | - | 0.475 ± 0.034 | - | 0.525 ± 0.034 | - |
| 2.81E+00 | 0.513 ± 0.020 | - | 0.487 ± 0.020 | - | 0.506 ± 0.015 | - | 0.494 ± 0.015 | - | 0.498 ± 0.014 | - | 0.502 ± 0.014 | - |

Proporción sexual promedio; ee, Error estándar; α, Pruebas de ANOVA; El * indica diferencias estadísticamente significativas P<0.05.

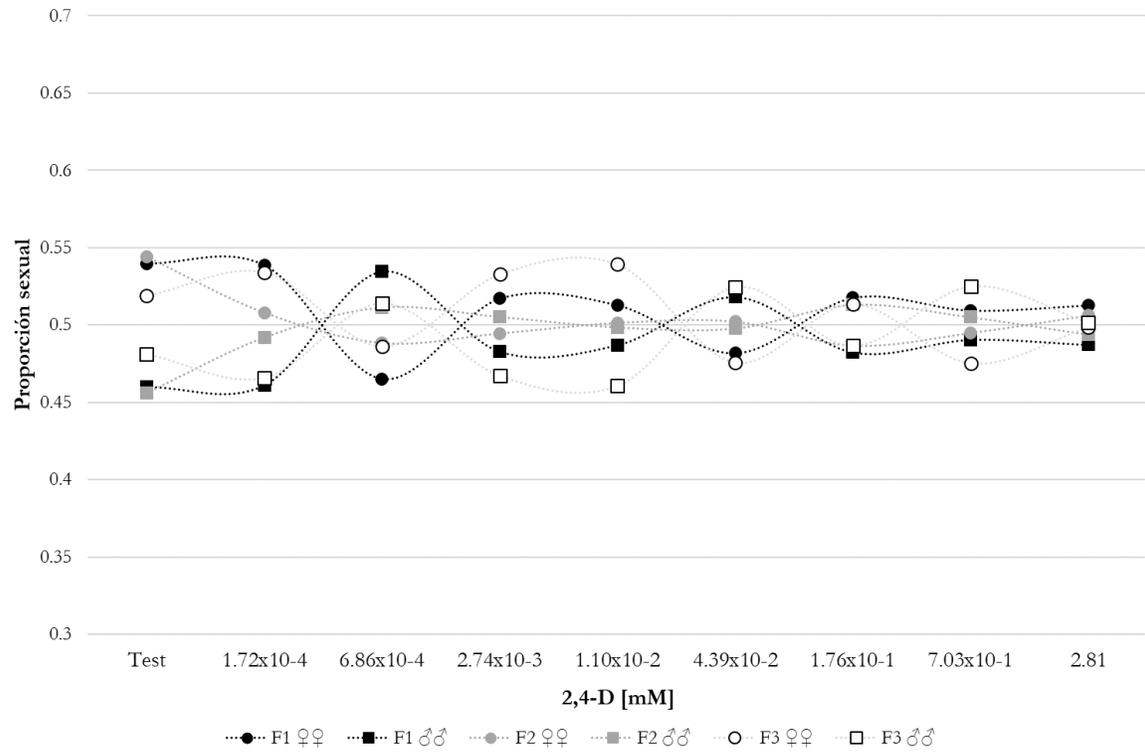


Fig. 21. Promedio de la proporción sexual de moscas provenientes de la cruce NTxT durante tres generaciones.

El tratamiento no tiene un efecto directo sobre la proporción sexual durante la descendencia de los organismos tratados en los tres diferentes esquemas de cruce.

III.3. Alteraciones morfológicas.

Los adultos que fueron expuestos al 2,4-D durante la etapa larvaria no presentaron ninguna alteración morfológica, pero en la progenie de estos organismos se presentó una serie de alteraciones morfológicas que persistieron durante las tres generaciones. En la Fig. 22 se muestran algunos de los organismos que fueron encontrados en la F₃ en los diferentes esquemas de cruza.

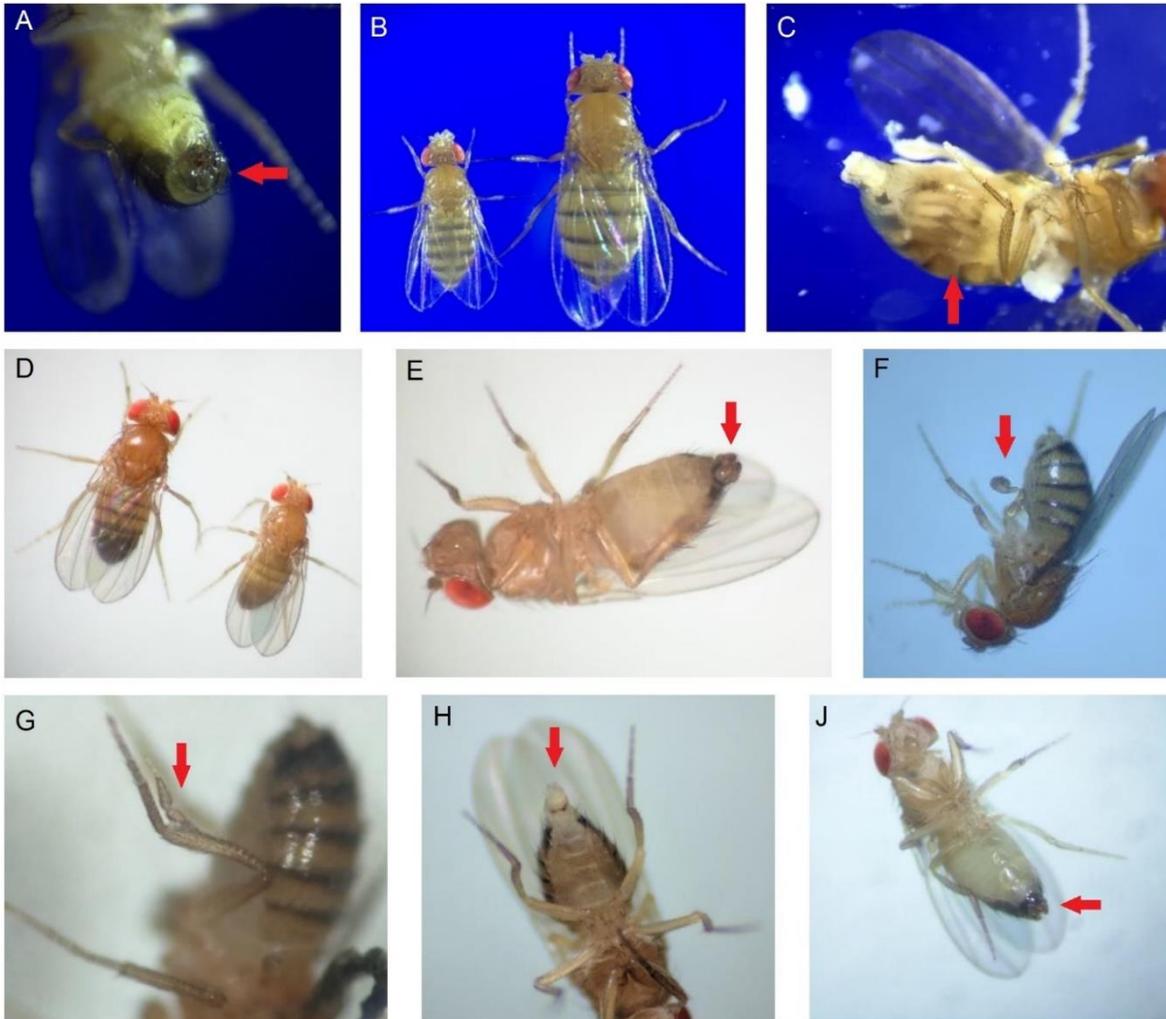


Fig. 22 Alteraciones morfológicas en moscas de la F₃. A) Macho con la placa genital evertida, cruce TxNT; B) Hembra de menor tamaño, cruce TxT; C) Hembra con la placa genital evertida y huevos sueltos en la cavidad abdominal, cruce NTxT; D) Macho de menor tamaño, cruce TxT; E) Hembra con placa genital evertida y girada, cruce TxT; F) Extremidad no desarrollada, cruce TxNT; G) Segmento extra en una pata, cruce TxNT; H) hembra con placa genital evertida, cruce TxNT; J) Macho con placa genital evertida y girada, cruce TxNT.

Las alteraciones morfológicas que se consideraron fueron únicamente aquellas que estuvieran relacionados con: 1) la placa genital, en la mayoría de los casos la placa estaba evertida y/o girada; 2) con relación al tamaño de los organismos, ya que hubo una reducción en el tamaño corporal; y 3) con respecto a las patas, se observó que en algunos casos no se encontraban desarrolladas completamente o presentaban segmentos extras.

En la Tabla 7 y Fig. 23 se presenta el número de organismos recobrados con alteraciones morfológicas a lo largo de las tres generaciones en cada esquema de cruza.

Tabla 6. Incidencia de alteraciones morfológicas.

| 2,4-D[mM] | TxT | | | | | | | TxNT | | | | | | | NTxT | | | | | | | Evaluacion poblacional | | | |
|-----------|-----|----|----|-------|---------|------------|----------|------|----|----|-------|---------|-------------|----------|------|----|----|-------|---------|-------------|----------|------------------------|------------|--------------|----------|
| | F1 | F2 | F3 | Total | N F1-F3 | TxT % malf | α | F1 | F2 | F3 | Total | N F1-F3 | TxNT % malf | α | F1 | F2 | F3 | Total | N F1-F3 | NTxT % malf | α | T/[] | ΣN | % total malf | α |
| Test | 0 | 0 | 0 | 0 | 6753 | 0.00 | - | 0 | 0 | 0 | 0 | 7273 | 0.00 | - | 0 | 0 | 0 | 0 | 5781 | 0.00 | - | 0 | 19807 | 0.000 | - |
| 1.72E-04 | 1 | 0 | 6 | 7 | 6927 | 0.10 | * | 1 | 2 | 2 | 5 | 7111 | 0.07 | * | 0 | 3 | 1 | 4 | 6273 | 0.06 | * | 16 | 20311 | 0.079 | * |
| 6.86E-04 | 1 | 0 | 6 | 7 | 6514 | 0.11 | * | 2 | 0 | 2 | 4 | 6653 | 0.06 | * | 0 | 1 | 0 | 1 | 6257 | 0.02 | - | 12 | 19424 | 0.062 | * |
| 2.74E-03 | 0 | 0 | 2 | 2 | 6136 | 0.03 | - | 0 | 0 | 0 | 0 | 5831 | 0.00 | - | 1 | 0 | 3 | 4 | 6583 | 0.06 | * | 6 | 18550 | 0.032 | - |
| 1.10E-02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6928 | 0.00 | - | 1 | 0 | 3 | 4 | 5804 | 0.07 | * | 0 | 0 | 0 | 0 | 5900 | 0.00 | - | 4 | 18632 | 0.021 | - |
| 4.39E-02 | 2 | 1 | 1 | 4 | 6620 | 0.06 | * | 2 | 0 | 2 | 4 | 5928 | 0.07 | * | 0 | 2 | 6 | 8 | 6012 | 0.13 | * | 16 | 18560 | 0.086 | * |
| 1.76E-01 | 1 | 0 | 0 | 1 | 5787 | 0.02 | - | 3 | 0 | 3 | 6 | 6308 | 0.10 | * | 0 | 1 | 1 | 2 | 5322 | 0.04 | - | 9 | 17417 | 0.052 | * |
| 7.03E-01 | 0 | 1 | 1 | 2 | 6712 | 0.03 | - | 0 | 0 | 1 | 1 | 6847 | 0.01 | - | 0 | 0 | 1 | 1 | 4688 | 0.02 | - | 4 | 18247 | 0.022 | - |
| 2.81E+00 | 0 | 0 | 2 | 2 | 6234 | 0.03 | - | 0 | 0 | 0 | 0 | 7154 | 0.00 | - | 0 | 1 | 3 | 4 | 7547 | 0.05 | * | 6 | 20935 | 0.029 | - |

F₁, alteraciones morfológicas en la F₁; F₂, alteraciones morfológicas en la F₂; F₃, alteraciones morfológicas en la F₃; N F₁-F₃, Número total de moscas obtenidas durante las tres generaciones según el esquema de cruza; T/[], Total de alteraciones morfológicas por concentración; ΣN , Suma total de moscas; α , prueba de Kastenbaum-Bowman; El * indica diferencias estadísticamente significativas p<0.05.

La incidencia de alteraciones morfológicas se mantuvo a lo largo de las tres generaciones, en los diferentes sistemas de cruza y en todas las concentraciones. La mayor incidencia de alteraciones se presenta durante la F₃ (Tabla 6) sin asociación a un esquema de cruza particular. De las 19,807 moscas que se recobraron en el testigo, no se observó ninguna alteración, lo que nos refiere un daño ocasionado por el 2,4-D. Como se mencionó anteriormente, se utilizó agua destilada como disolvente y testigo negativo.

En la cruza TxT se encontraron diferencias significativas en las concentraciones 1.72x10⁻⁴, 6.86x10⁻⁴ y 4.39x10⁻² mM, lo que refleja un mayor daño en las concentraciones más bajas (Fig. 23). En la cruza TxNT se detectaron diferencias significativas en las concentraciones 1.72x10⁻⁴, 6.86x10⁻⁴, 1.10x10⁻², 4.39x10⁻² y 1.76x10⁻¹ mM, siendo la cruza en donde hay más daño (Fig. 23). En la cruza NTxT las diferencias significativas se encontraron en las concentraciones 1.72x10⁻⁴, 2.74x10⁻³, 4.39x10⁻² y 2.81 mM (Fig. 23).

En la cruza TxNT se recuperaron más organismos con alteraciones morfológicas, esto podría explicar por qué en la progenie promedio hay una tendencia a recuperar menos progenie en comparación con el testigo (Fig. 18). Puede que el daño haya sido tal que en algunos organismos fue letal y por eso se recupera menos progenie.

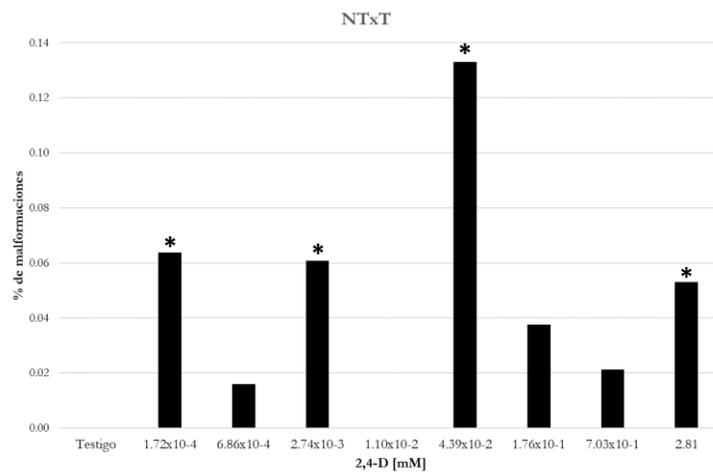
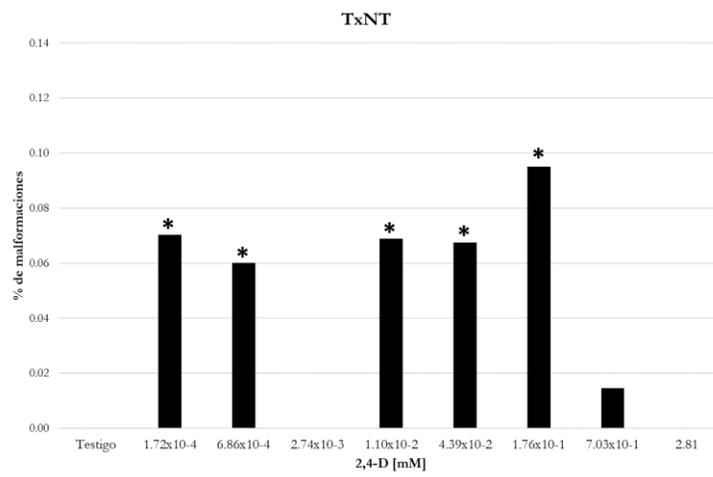
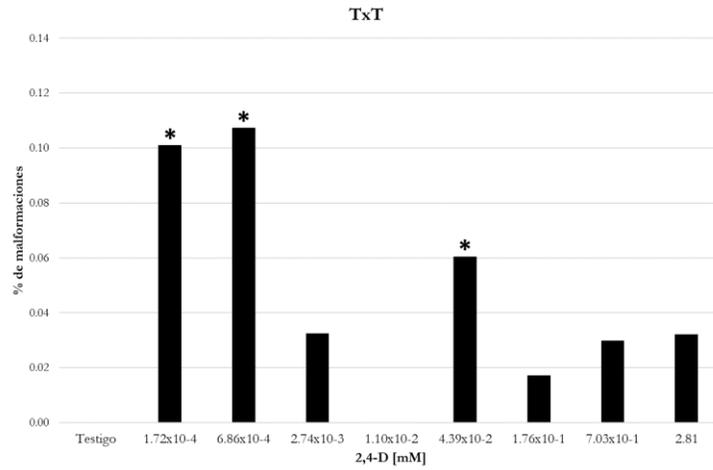


Fig. 23 Porcentaje de alteraciones morfológicas en cada esquema de cruce. El * indica diferencias significativas con respecto al testigo ($P < 0.05$).

Con la finalidad de estimar el impacto a nivel poblacional se obtuvo el total de alteraciones/concentración, sumando el número de alteraciones recobradas a lo largo de las tres generaciones, en los tres esquemas de cruce (Fig. 24). Se obtuvieron diferencias significativas en las dos concentraciones más bajas (1.72×10^{-4} y 6.86×10^{-4} mM) y en las concentraciones medias (4.39×10^{-2} y 1.76×10^{-1} mM).

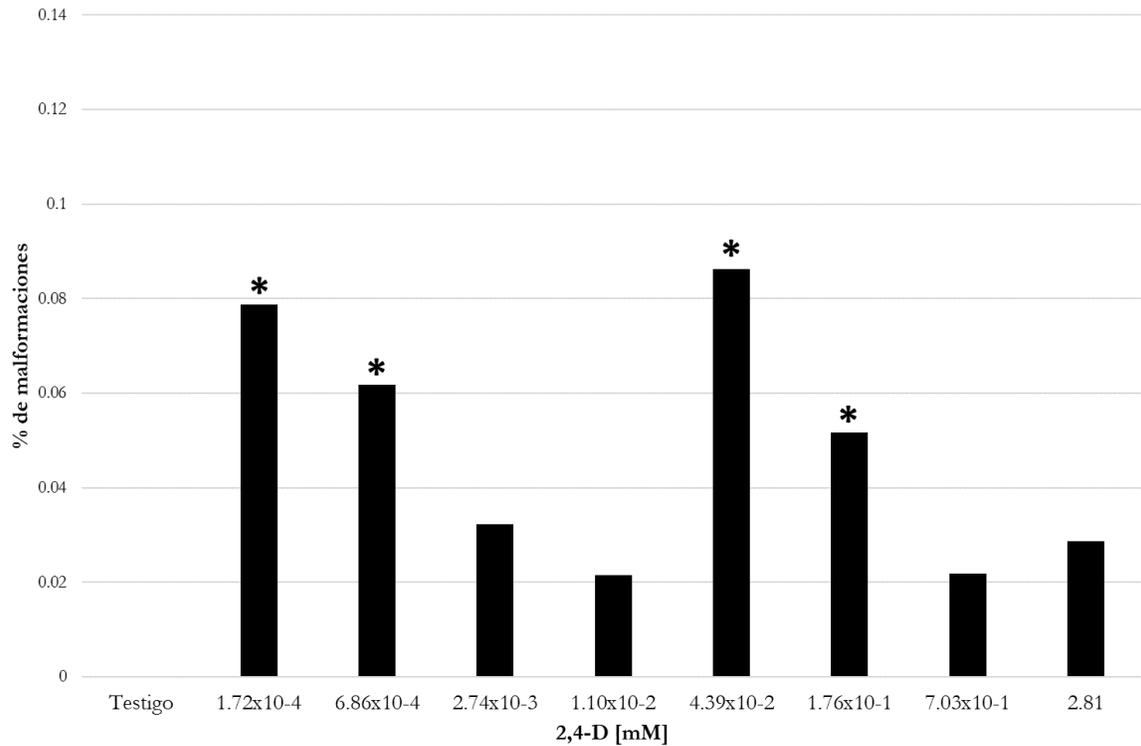


Fig. 24 Porcentaje de alteraciones morfológicas totales a nivel poblacional y transgeneracional. El * indica diferencias significativas con respecto al testigo ($P < 0.05$).

IV. Discusión

Los seres vivos estamos en constante exposición a una gran variedad de compuestos químicos y/o agentes físicos que son potencialmente dañinos, poniendo en riesgo nuestra integridad y la de los descendientes.

El modelo clásico de estudio dosis-respuesta plantea que la relación entre la concentración de un compuesto y su efecto sobre un organismo sigue un comportamiento creciente y lineal, iniciando por el origen y una región en donde los efectos no son medibles hasta llegar a una región de respuesta máxima o letal (en algunos casos), lo que quiere decir que mientras mayor sea la dosis, mayor será el efecto (Peña *et al.*, 2001). Sin embargo, este modelo no contempla lo que sucede en las concentraciones bajas, en donde no hay un efecto observable o, por el contrario, existe un mayor efecto que a concentraciones altas. Este aspecto es importante, pues podría estarse ignorando un posible daño al material genético heredable en los sobrevivientes.

En este trabajo se evaluó el efecto generado después de una única exposición de moscas al 2,4-D. Para esto, se evaluó el cambio de diferentes biomarcadores: sobrevivencia (S), progenie promedio (P), proporción sexual (PS) y fertilidad (F).

IV.1. Toxicidad del 2,4-D

La sobrevivencia es un biomarcador que nos ayuda a determinar la toxicidad de un compuesto de manera general. Al exponer a las larvas al 2,4-D, se observó que en las concentraciones más bajas se recupera mayor número de moscas que en el testigo, aunque no se confirman diferencias estadísticamente significativas. Este tipo de respuesta se denomina hormesis.

La hormesis se refiere a una respuesta de dosis bifásica a un agente ambiental caracterizado por una estimulación a dosis baja o un efecto “beneficioso” y un efecto tóxico o inhibitorio a dosis altas. Es una respuesta adaptativa de las células y los organismos a un estrés moderado. Como resultado, las células aumentan su producción de proteínas citoprotectoras y restauradoras, incluidos los factores de crecimiento, enzimas antioxidantes y las proteínas chaperonas. La respuesta de la célula u organismo a la dosis baja de la toxina se considera un proceso compensatorio adaptativo después de una interrupción inicial en la homeostasis (Mattson, 2008).

Como en todos los organismos, en *Drosophila* no todas las larvas logran llegar al estado adulto. Teniendo en cuenta esto, sabemos que el número de larvas que completan el desarrollo hasta imagos es menor al 100%. Determinados compuestos inductores de estrés en las larvas provocan que su metabolismo se active y el porcentaje de larvas que llegan a imagos es mayor que el que se obtiene si el estímulo no logra activar la respuesta metabólica asociada con la desintoxicación, así, el efecto de una concentración baja puede llegar incluso a ser letal.

A partir de la concentración 1.72×10^{-4} mM, hasta la 1.10×10^{-2} mM, el 2,4-D no parece tóxico para las larvas y el estrés inducido provoca que un porcentaje mayor que en el testigo logre

culminar su ciclo de vida hasta convertirse en imagos. La concentración de 1.12×10^1 mM resultó ser letal para los organismos.

La determinación sexual en *D. melanogaster* indica que la probabilidad de obtener una hembra o un macho es de 0.5. Teniendo esto en cuenta, si el tratamiento no afecta este biomarcador, podría haber fluctuaciones dentro de este rango. En la proporción sexual de los organismos tratados, se recuperaron más machos que hembras, a excepción del testigo y en las concentraciones 1.72×10^{-4} y 7.03×10^{-1} mM, a partir de las cuales se recuperaron ligeramente más hembras que machos. Existe una tendencia a recuperar más machos, lo que nos indica que el tratamiento podría estar estimulando la sobrevivencia de los machos. Esta tendencia evidencia que el tratamiento tiene un efecto diferencial sobre alguno de los dos sexos.

No se observaron diferencias significativas en la fertilidad de los organismos tratados, todos se mantienen iguales o similares al testigo. El 2,4-D no muestra efecto sobre la fertilidad de los organismos en las concentraciones probadas.

IV.2. Efecto reprotóxico y transgeneracional.

Cuando hablamos de herencia, o de los caracteres que se pueden transmitir de una generación a las siguientes durante la reproducción, inmediatamente pensamos en el mecanismo de herencia clásica o herencia mendeliana, en donde la información (genes) se transmiten sin cambios de los padres a su descendencia, por lo que estos patrones de herencia son muy predecibles. Clásicamente, estos mecanismos pueden ser monogénicos o digénicos y siguen patrones de herencia autosómico dominante, autosómico recesivo y ligado al cromosoma X. Ahora sabemos que existen mecanismos de herencia no clásicos, que además de no seguir el patrón de herencia descrito por Mendel, son el resultado de diferentes mecanismos moleculares y pueden ser multifactoriales (Klugman, 2019).

Estos mecanismos de herencia no clásica pueden estar influenciados por la regulación epigenética (metilación del DNA, modificaciones en las histonas, estructura de la cromatina y RNA no codificante) e incluir alteraciones de la impronta genómica, disomía uniparental, mosaicismo, repeticiones de satélites y enfermedades mitocondriales (Hanson & Skinner, 2016; Klugman 2019).

La toxicidad de un compuesto, además de afectar la sobrevivencia, puede tener efectos a otros niveles. Puede afectar la capacidad de reproducción, generando alteraciones en los procesos fisiológicos relacionados con el apareamiento, la diferenciación, maduración sexual, producción de gametos y la fecundación (Repetto & Repetto, 2009).

En la cruce TxT, no se observó ninguna alteración en la cantidad de progenie que tienen los organismos a lo largo de tres generaciones, pero el efecto se hizo evidente a nivel morfológico ya que se recuperaron organismos con malformaciones de diferente tipo.

En la cruce 'TxNT' se observa una tendencia que muestra como el 2,4-D está alterando y modificando de manera negativa la cantidad de progenie que se obtiene en generaciones siguientes a una única exposición.

En la cruce NTxT se observó el mayor efecto (con respecto a la cantidad de progenie) del 2,4-D. En la F₁ siempre se recuperó mayor cantidad de progenie con respecto al testigo. Al llegar a la F₂, en la concentración 1.72x10⁻⁴ mM se obtuvo una mayor cantidad de progenie y fue estadísticamente significativo; sin embargo, en las concentraciones restantes se reflejó una disminución gradual en el número de progenie conforme aumenta la concentración a la que fue expuesto el macho parental. Al llegar a la F₃ el número de progenie continuó disminuyendo hasta ser estadísticamente significativo en tres concentraciones (1.10x10⁻², 1.76x10⁻¹ y 7.03x10⁻¹).

La tendencia de obtener un menor número de progenie conforme aumenta la concentración sugiere que en la concentración más alta será en donde se obtenga un menor número de progenie. Los resultados reflejan algo diferente a lo esperado, ya que en dos de las concentraciones más altas (1.76x10⁻¹ y 7.03x10⁻¹ mM) comienza a disminuir el número de progenie, pero al llegar a la concentración 2.81 mM (que fue la más alta que se probó para el efecto transgeneracional), invariablemente se observó un incremento. Este efecto se observó durante las tres generaciones.

Se observó un patrón en la cantidad de progenie que se recupera en la cruce NTxT. A excepción de la concentración más baja (1.72x10⁻⁴ mM), en todas las concentraciones disminuyó la cantidad de progenie conforme se avanza en el tiempo. A medida que pasan las generaciones el número de progenie que se obtuvo es menor.

La cantidad de progenie se vio alterada cuando se expuso al macho. En la primera generación aumentó hasta llegar a ser significativa, y en las generaciones siguientes hubo una disminución en la cantidad de progenie que llegó a ser significativa.

Los resultados de las cruces TxNT y NTxT explican por qué en la cruce TxT no se muestra un efecto aparente con respecto a la cantidad de progenie. Cuando únicamente la hembra es tratada, el número de progenie es menor, pero cuando solamente el macho es el tratado, la tendencia es recuperar más progenie. El efecto que tiene el 2,4-D en el macho y en la hembra se está enmascarando cuando ambos organismos son tratados.

El 2,4-D no mostró tener un efecto en la fertilidad de la F₁ y F₂, se mantuvo igual o similar al testigo en los tres esquemas de cruces. En un panorama general, la fertilidad no se vio afectada por el 2,4-D.

Al evaluar la proporción sexual, no se observaron diferencias significativas. Estos resultados indican que no hay un efecto sobre la proporción sexual durante el desarrollo. El 2,4-D no presentó un efecto sobre estos dos marcadores (fertilidad y proporción sexual).

En un estudio desarrollado por Mesak *et al.* (2018) se menciona que el 2,4-D tiene un impacto en diferentes organismos bioindicadores de la calidad ambiental provocando diversos cambios en su abundancia (Mesak *et al.*, 2018). Esto coincide con los resultados obtenidos, pues se observaron fluctuaciones en la cantidad de progenie que se logró recuperar a lo largo de las

generaciones con respecto al testigo, siendo este último, una referencia del número de progenie habitual que se obtuvo cuando no hay una exposición al 2,4-D.

Con esto sabemos que el 2,4-D no provoca esterilidad en las moscas, pero afecta los gametos masculinos y femeninos, pues la progenie se ve afectada. Se ha observado en estudios con vertebrados, que cuando son expuestos al 2,4-D, existe un efecto directo sobre el desarrollo del tejido testicular (de Castro Marcato *et al.*, 2017; Marouani *et al.*, 2017), problemas en la espermatogénesis (Marouani *et al.*, 2017), astenospermia (Harada *et al.*, 2016), necrospermia (Harada *et al.*, 2016) y teratospermia (Harada *et al.*, 2016). Estos resultados se relacionan con la disminución en el número de progenie que se obtuvieron cuando se trató únicamente al macho (NTxT), ya que el 2,4-D podría estar afectando directamente la cantidad de espermatozoides viables que producen los machos y con ello una posible disminución en la progenie.

IV.3. Alteraciones morfológicas

Estudios previos registran que en organismos como el sapo argentino (*Rhinella arenarum*) y en embriones de pez cebra, el 2,4-D provoca una reducción en el tamaño y longitud de los organismos expuestos (Aronzon *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2017). En este trabajo, los organismos expuestos al 2,4-D no presentaron ningún tipo de malformación, pero en sus descendientes hubo una incidencia en la reducción del tamaño de las moscas, tanto en hembras como en machos. Su tamaño se redujo hasta una tercera parte de su tamaño promedio.

LaChapelle (2007) describe cómo el 2,4-D bloquea la maduración meiótica *in vitro* e inhibe la maduración del ovocito en *Xenopus* (LaChapelle *et al.*, 2007). En la Fig. 22 se aprecia una hembra con la placa genital evertida y huevos en diferentes estados de maduración que están sueltos en la cavidad abdominal, siendo un posible efecto del 2,4-D lo que está ocasionando que los huevos no maduren de manera correcta, evitando que puedan ser ovopositados.

Barik & Mishra (2018) definen a los teratógenos como factores externos (químicos, físicos y biológicos) que interfieren el proceso de desarrollo si se ingieren durante el período de desarrollo prenatal y los efectos se mantienen durante toda la vida del organismo. Las alteraciones causadas por los teratógenos pueden ser anatómicas, morfológicas, fisiológicas o conductuales, que son efectos combinados de alteraciones moleculares, celulares y bioquímicas (Barik & Mishra, 2018).

A pesar de que la exposición al 2,4-D no fue durante la etapa prenatal, existió un efecto sobre el desarrollo de las moscas, en donde se ve afectada la anatomía del organismo y hay alteraciones morfológicas que persisten en más de una generación. Teniendo esto en cuenta, el 2,4-D presentó un efecto similar a un teratógeno. En el estudio desarrollado por Ngo *et al.* (2010), se sugiere que la exposición paterna al agente naranja puede estar asociada con un mayor riesgo a padecer malformaciones en su descendencia (Ngo *et al.*, 2010).

Sin importar el tipo de cruce, durante la F₃ fue en donde se observó un mayor número de alteraciones morfológicas. El efecto del 2,4-D prevaleció en las tres generaciones, no disminuyó ni se diluyó conforme avanza el tiempo, todo lo contrario, hubo un mayor número de individuos

con alteraciones morfológicas. Esto significa que el efecto no solo prevaleció durante la F₁, F₂ y F₃, también muestra una acumulación del daño conforme pasa el tiempo.

Al comparar los resultados de los tres diferentes esquemas de cruce (Fig. 6.10) es posible ver que cuando únicamente se expuso a la hembra (TxNT) al 2,4-D, las alteraciones morfológicas se presentaron en un mayor número de concentraciones.

Como hemos venido discutiendo, podemos decir que la herencia no consiste únicamente en la secuencia de nucleótidos de los genes contenidos en el DNA, ya que existen mecanismos (epigenéticos) que regulan la expresión de estas secuencias nucleotídicas y que también se heredan de los padres a los descendientes.

El número total de alteraciones morfológicas para cada esquema de cruce es el mismo, hay un total de 25 para la cruce TxT, 24 para la cruce TxNT y 24 para la cruce NTxT. En primer lugar, esto nos sugiere que existe un posible daño epigenético que se está transmitiendo hasta una tercera generación. Todo parece indicar que el daño producido por el 2,4-D, a nivel morfológico, no se ve afectado por el origen parental, no importa si la hembra es la única expuesta o, por el contrario, el macho es el único expuesto, numéricamente ambos transmiten el mismo daño en la descendencia.

El origen parental del daño dependerá de la concentración, que se interpreta como una sensibilidad diferencial para cada concentración. En ambas cruces (TxNT y NTxT) hubo una sensibilidad a la concentración más baja (1.72×10^{-4} mM). En las siguientes dos concentraciones (2.74×10^{-3} y 1.10×10^{-2} mM) ocurrió un efecto interesante, mientras que en la cruce TxNT no se encontró ninguna alteración morfológica en la concentración 2.74×10^{-3} mM, en la cruce NTxT se observó un daño significativo. Por el contrario, en la concentración 1.10×10^{-2} mM, no se detectó ningún daño en la cruce NTxT, mientras que en la cruce TxNT sí lo hubo.

Aparentemente, cuando el macho es el único expuesto (NTxT), es sensible a la concentración más alta (2.81 mM) ya que fue la única cruce en donde se encontraron diferencias significativas en esa concentración. Esta respuesta es interesante debido a que los efectos parecen disminuir gradualmente conforme aumenta la concentración, pero al llegar a la concentración 2.81E+00 mM, se elevó drásticamente el efecto, obteniendo diferencias significativas que se observan tanto en el análisis morfológico como en el número de progenie. Aumentó el número de descendencia, pero en esa descendencia también incrementó el número de alteraciones morfológicas.

Podría esperarse que existiese un daño mayor cuando ambos parentales son expuestos (TxT), pero al parecer esto no ocurre así, pues no se detectó un efecto acumulativo del daño. Siendo este esquema de cruce el que refleja un número menor de alteraciones morfológicas. Una posible explicación es que el daño sea tan severo que la mayoría de los organismos alterados no logran sobrevivir y solo un pequeño número de organismos alterados logran llegar a adultos y son los pocos que observamos.

Al evaluar el efecto que generó el 2,4-D a nivel poblacional y transgeneracional se observa un umbral de efecto en la población. En la toxicología se le conoce como LOAEL (lowest observed adverse effect level) al punto en la concentración más baja donde tenemos efectos adversos observables. A partir de este punto, los efectos no se deben a efectos aleatorios, sino que se

deben a la sustancia tóxica suministrada (Peña *et al.*, 2001). Las primeras concentraciones llegan a ser tan bajas que no son detectadas por el organismo y no logran activar los mecanismos de desintoxicación y reparación en las moscas, lo que refleja un efecto significativo en las concentraciones 1.72×10^{-4} y 6.86×10^{-4} mM. Al aumentar la concentración, se llega a un umbral en donde se activan los mecanismos de desintoxicación, lo que ayuda a que el efecto provocado por el 2,4-D sea menor y, por lo tanto, no existan diferencias significativas. Al llegar a la concentración 4.39×10^{-2} mM, el efecto puede ser tal que los mecanismos de desintoxicación y reparación en las moscas ya no sean suficientes, motivo por el cual vuelven a existir diferencias significativas. Nuevamente, el efecto del 2,4-D deja de ser significativo en las concentraciones más altas, lo que podría significar que, si el daño es tan grande, son pocos los organismos que logran sobrevivir con alguna alteración morfológica.

Existen reportes en donde se muestra que en el desarrollo activo de órganos durante los períodos fetales tardíos y postnatales tempranos existe una programación crítica del epigenoma y el transcriptoma asociado con la diferenciación celular y la organogénesis (Skinner, 2008).

Diversas pruebas sugieren que el citoplasma ejerce influencia sobre el material genético, dando lugar a una transcripción diferencial en momentos concretos del desarrollo. Se sugiere un elemento extracromosómico que puede afectar el fenotipo. Por ello, la herencia de componentes citoplásmicos juega un papel regulador importante en el desarrollo (Klug *et al.*, 2013). En *Drosophila* existen diferencias entre los gametos. Se ha visto que, al finalizar la ovogénesis, el citoplasma del ovocito maduro contiene un depósito de mRNA, proteínas, mitocondrias, ribosomas y otros organelos celulares, siendo de mayor tamaño que el espermatozoide. Por su parte, durante la espermatogénesis, ocurre una reorganización de las mitocondrias de los espermatozoides y se promueve una degradación del DNA mitocondrial; se sustituyen las histonas por protaminas, lo que da una mayor compactación del material genético. Los espermatozoides maduros se transfieren a las hembras junto con el fluido seminal, que contiene diversas proteínas (Yamashita, 2018).

Cuando se lleva a cabo la fecundación en *D. melanogaster*, además de espermatozoides, se ha visto que el macho aporta una gran cantidad de componentes en el líquido seminal. Tales componentes desempeñan funciones que determinan el éxito reproductivo al competir con otros machos. Los machos que transfieren péptido sexual en la eyaculación, aumentan la puesta de huevos en hembras vírgenes y disminuye su disposición para volver a aparearse, asegurando así el éxito reproductivo (Fricke, 2009).

Teniendo esto en cuenta, el efecto diferencial entre los tres diferentes esquemas de cruce que se observan en el número de progenie y en la incidencia de alteraciones morfológicas puede estar directamente relacionado con los diferentes componentes que se transmiten durante la fecundación, pues no solo se transmite el material genético, también se transmite una gran cantidad de componentes proteicos, RNA y organelos que afectan directamente en el desarrollo de los organismos. La capacidad de un factor ambiental (por ejemplo, un disruptor endocrino) para reprogramar la línea germinal y promover un estado de enfermedad transgeneracional, tiene implicaciones significativas para la biología evolutiva y etiología de la enfermedad (Anway *et al.*, 2005).

La crucea NTxT fue más sensible al tratamiento, esto se evidencia con el biomarcador del número de progeñie. Se observan grandes fluctuaciones a lo largo del tiempo. Durante la F₁ y F₂ el macho estimula a la hembra para aumentar la puesta de huevos lo que se traduce en un mayor número de progeñie.

Con base en lo anterior, se propone que el mecanismo a través del cual el 2,4-D afecta a las moscas, involucra regulación epigenética.

La reprogramación de la línea germinal facilita la totipotencia del cigoto. Se requiere reprogramación para eliminar las firmas epigenéticas adquiridas durante el desarrollo, o impuestas por el medio ambiente, de modo que la elaboración posterior del plan corporal en el embrión refleje adecuadamente el modelo genético característico de cada especie. Si falla la reprogramación de la línea germinal, las marcas epigenéticas pueden conservarse y podrían transmitirse de una generación a la siguiente como un efecto transgeneracional. Al igual que con las mutaciones clásicas (es decir, la secuencia de DNA), la mayoría de las marcas epigenéticas son neutras o perjudiciales (Heard, 2014).

En *Drosophila* se ha reportado un ejemplo importante de paramutación que se mantiene durante más de 50 generaciones. Las paramutaciones se definen como la interacción entre dos alelos de un solo locus que resultan en cambios heredables de uno de los alelos implicados (Heard, 2014).

En las paramutaciones, un alelo afecta hereditariamente a otros alelos de generaciones futuras, incluso si el alelo causante de los cambios no es transmitido. Lo que son transmitidos son patrones de metilación del ADN o ARNs como piRNAs, siRNAs, miRNAs u otros ARNs reguladores. De esta forma, las paramutaciones pueden hacer que dos organismos isogénicos presenten fenotipos distintos (Bošković, 2018; Heard, 2014).

En nuestro modelo, el número de moscas que se recuperaron con alguna alteración morfológica no corresponde a un modelo clásico de herencia mendeliana, la proporción y frecuencia fenotípica de organismos afectados sería mayor a la que se obtiene, con esto suponemos que el mecanismo por el cual se ve afectada la morfología de las moscas no es por un proceso mutagénico. En cambio, como se explicó anteriormente, los componentes epigenéticos funcionan como mecanismos auxiliares en la regulación génica y en las interacciones genotipo-fenotipo. Dos organismos con el mismo genotipo, pueden presentar diferencias fenotípicas que pueden estar influenciadas por factores ambientales, además de que estas diferencias fenotípicas tienen la capacidad heredarse a través de la línea germinal (Bošković, 2018).

Otro factor a tomar en cuenta y por el cual proponemos un mecanismo epigenético, es debido a que la frecuencia y la reproducibilidad de la mayoría de estos fenotipos no regulares son tales que las mutaciones del DNA probablemente no estén involucradas. La frecuencia de una mutación en el DNA, generalmente es muy baja. La reproducibilidad de que la misma mutación ocurra es altamente improbable. Sin embargo, la reproducibilidad y frecuencia de la mayoría de los fenotipos anormales es significativamente mayor y se puede reproducir. La frecuencia de las enfermedades epigenéticas transgeneracionales es alta (Skinner, 2008). El experimento consistió en dos replicas y en ambas fue reproducible recobrar las alteraciones morfológicas observadas en las moscas.

V. Conclusión

Fue posible evaluar la toxicidad del 2,4-D por medio de la sobrevivencia de los organismos que fueron expuestos, en donde la concentración 11.241 mM fue letal. El tratamiento tuvo un efecto que estimuló la sobrevivencia de lo organismo en las concentraciones medias (6.86×10^{-4} a 1.76×10^{-1}) favoreciendo a los machos. Es importante evaluar el efecto posterior a la exposición, puesto que hubo un efecto negativo en los organismos que sobrevivieron al tratamiento.

Una única exposición de la F_0 al 2,4-D tuvo un efecto en la capacidad reproductora de los organismos tratados y su descendencia (efecto reprotóxico), este efecto prevaleció a lo largo de tres generaciones (efecto transgeneracional) y la exposición de uno o ambos progenitores contribuyó de manera diferencial en el efecto inducido por el 2,4-D.

La respuesta de los organismos al tratamiento puede evaluarse a diferentes niveles. Cuando las hembras son las expuestas, el efecto en su descendencia a nivel morfológico es mayor, ya que se cuantifica un mayor número de organismos alterados. Los machos tratados son más sensibles a tener cambios en el número de progenie a lo largo de las tres generaciones.

Cuando moscas son expuestas al 2,4-D, el efecto prevalece a lo largo de 3 generaciones. Este hecho es relevante, dado que algunas veces se ignora el efecto que puede tener la gran cantidad de compuestos que son utilizados y permanecen en el medio ambiente, afectando así a organismos no blanco.

El efecto que tiene el tratamiento después de una única exposición no disminuye a lo largo de las generaciones, mientras se avanza en el tiempo, las fluctuaciones en el número de progenie y el efecto en la incidencia de alteraciones morfológicas incrementa.

Por lo anterior, consideramos que el efecto que tiene o puede tener un determinado compuesto sobre un organismo no solo debe medirse en una respuesta bifásica de muerte - sobrevivencia, pues el efecto potencial de un compuesto sobre los organismos que logran sobrevivir no siempre es inocuo, además de que este efecto puede prevalecer en las siguientes generaciones aun sin haber estado expuestas.

Por esto concluimos que el efecto causado por un compuesto debe ser evaluado no solo en los organismos expuestos, pues es importante conocer si existe un efecto/daño sobre los organismos no expuestos de las siguientes generaciones, todo esto para comprender completamente su alcance.

El uso descontrolado de pesticidas puede tener y está teniendo un efecto negativo no solo en el ser humano sino también en la diversidad y abundancia de los organismos no blanco de los pesticidas, trayendo consigo un desbalance en el ecosistema. Es de suma importancia entender que el uso indiscriminado de pesticidas que permanecen en el ambiente, puede causar efectos en la línea germinal y promover daños transgeneracionales, ya que puede ser el origen de diversas enfermedades en la actualidad.

Rachel Carson en su libro “Primavera silenciosa”, publicado en 1962, menciona que cerca de 500 nuevos productos químicos son creados por el hombre cada año. La humanidad ha estado

expuesta a una infinidad de compuestos químicos que, en su mayoría son liberados y perduran en el ambiente. Siempre se ha ignorado el efecto transgeneracional provocado por la exposición a estos compuestos. Los estudios transgeneracional podrían abrir una nueva ventana para entender el origen y la aparición de diversas enfermedades, ya que la respuesta podría estar varios años e incluso generaciones atrás, motivo por el que estaría pasando desapercibido.

VI. Referencias

- Anway, M. D., Cupp, A. S., Uzumcu, N., & Skinner, M. K. (2005). Toxicology: Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*, *308*(5727), 1466–1469. <https://doi.org/10.1126/science.1108190>
- Aronzon, C. M., Sandoval, M. T., Herkovits, J., & Pérez-Coll, C. S. (2010). Stage-dependent toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic on the embryonic development of a South American toad, *Rhinella arenarum*. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, *9*(7), 14247–14253. <https://doi.org/10.1002/tox>
- Barik, B. K., & Mishra, M. (2018). Nanoparticles as a potential teratogen: a lesson learnt from fruit fly. *Nanotoxicology*, *0*(0), 1–27. <https://doi.org/10.1080/17435390.2018.1530393>
- Beira, J. V., & Paro, R. (2016). The legacy of *Drosophila* imaginal discs. *Chromosoma*, *125*(4), 573–592. <https://doi.org/10.1007/s00412-016-0595-4>
- Bošković A, Rando OJ. Transgenerational Epigenetic Inheritance. *Annu Rev Genet*. 2018 Nov 23;52:21-41. doi: 10.1146/annurev-genet-120417-031404. Epub 2018 Aug 30. PMID: 30160987.
- Brusick, D. (1987). Fundamentals of Genetic Toxicity. In: Principles of Genetic Toxicology. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1980-9_2
- de Castro Marcato, A. C., de Souza, C. P., & Fontanetti, C. S. (2017). Herbicide 2,4-D: A Review of Toxicity on Non-Target Organisms. *Water, Air, and Soil Pollution*, *228*(3). <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3301-0>
- Deans, C., & Maggert, K. A. (2015). What do you mean, "epigenetic"?. *Genetics*, *199*(4), 887–896. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.173492>
- Fricke, C., Wigby, S., Hobbs, R. And Chapman, T. (2009), The benefits of male ejaculate sex peptide transfer in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology*, *22*: 275-286. doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01638.x
- Garabrant, D. H., & Philbert, M. A. (2002). Epidemiology and Toxicology. *Metabolism Clinical And Experimental*, *32*(4), 233–257. Retrieved from file:///Users/Eric/Dropbox/Papers2
- Goodman, J. E., Loftus, C. T., & Zu, K. (2017). 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and non-Hodgkin's lymphoma: results from the Agricultural Health Study and an updated meta-analysis. *Annals of Epidemiology*, *27*(4), 290--292.e5. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2017.01.008>
- Guerrero, V. (2009). Epigen del cambio. *¿Cómo Ves?* Retrieved from <http://www.comoves.unam.mx/assets/revista/133/epigenetica-la-esencia-del-cambio.pdf>
- Hanson, M. A., & Skinner, M. K. (2016). Developmental origins of epigenetic transgenerational inheritance. *Environmental Epigenetics*, *2*(1), dvw002. <https://doi.org/10.1093/eep/dvw002>
- Harada, Y., Tanaka, N., Ichikawa, M., Kamijo, Y., Sugiyama, E., Gonzalez, F. J., & Aoyama, T.

- (2016). PPAR α -dependent cholesterol/testosterone disruption in Leydig cells mediates 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced testicular toxicity in mice. *Archives of Toxicology*, 90(12), 3061–3071. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1669-z>
- Heard E, Martienssen RA (2014). Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell*. Mar 27;157(1):95-109. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.045.
- Horikoshi, S., Miura, T., Kajitani, M., & Serpone, N. (2008). Microwave discharge electrodeless lamps (MDEL). III. A novel tungsten-triggered MDEL device emitting VUV and UVC radiation for use in wastewater treatment. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 7(3), 303–310. <https://doi.org/10.1039/b715774f>
- Kastenbaum, M. A., & Bowman K. O. (1970). Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res*, 9, 527–549.
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., & Palladino, M. A. (2013). *Conceptos de genética: Décima edición*, 992.
- Klugman S., Rabin-Havt S. (2019). Chapter 2 - Non-Mendelian Genetics, Editor(s): Mary E. Norton, Jeffrey A. Kuller, Lorraine Dugoff, Perinatal Genetics, Elsevier, Pages 11-19, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-53094-1.00002-3>.
- Kramer, P. J. (1998). Genetic Toxicology. *J. Pharm. Pharmacol.*, 50, 395–405. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1998.tb06879.x>
- LaChapelle, A. M., Ruygrok, M. L., Toomer, M. E., Oost, J. J., Monnie, M. L., Swenson, J. A., ... Stebbins-Boaz, B. (2007). The hormonal herbicide, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, inhibits *Xenopus* oocyte maturation by targeting translational and post-translational mechanisms. *Reproductive Toxicology*, 23(1), 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.08.013>
- Lee, W. R., Abrahamson, S., Valencia, R., von Halle, E. S., Würgler, F. E., & 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. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(83\)90025-8](https://doi.org/10.1016/0165-1110(83)90025-8)
- Li, K., Wu, J. Q., Jiang, L. L., Shen, L. Z., Li, J. Y., He, Z. H., ... He, M. F. (2017). Developmental toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. *Chemosphere*, 171, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.032>
- Marouani, N., Tebourbi, O., Cherif, D., Hallegue, D., Yacoubi, M. T., Sakly, M., ... Ben Rhouma, K. (2017). Effects of oral administration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on reproductive parameters in male Wistar rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(1), 519–526. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7656-3>
- Mattson, M. P. (2008). Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.08.007>
- Mesak, C., de Oliveira Mendes, B., de Oliveira Ferreira, R., & Malafaia, G. (2018). Mutagenic assessment of *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to the 2,4-D herbicide in a simulated realistic scenario. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(15), 15235–15244. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1979-1>

- Morgan, T. H. (1910). Sex limited inheritance in drosophila. *Science*, 32(812), 120–122. <https://doi.org/10.1126/science.32.812.120>
- Ngo, A. D., Taylor, R., & Roberts, C. L. (2010). Paternal exposure to Agent Orange and spina bifida: A meta-analysis. *European Journal of Epidemiology*, 25(1), 37–44. <https://doi.org/10.1007/s10654-009-9401-4>
- Nöthinger, R. (1970). Sucrose density separation a method for collecting large numbers of *Drosophila* larvae, (February), 1970.
- Ong, C., Yung, L. Y. L., Cai, Y., Bay, B. H., & Baeg, G. H. (2015). *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. *Nanotoxicology*, 9(3), 396–403. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.940405>
- Peña, Carlos E., Carter Dean E., A.-F. F. (2001). Toxicología ambiental. *Clinical Infectious Diseases*, 22, 1–94. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8824972
- Qurratu, A., & Reehan, A. (2016). A review of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) derivatives: 2,4-D dimethylamine salt and 2,4-D butyl ester. *International Journal of Applied Engineering Research*, 11(19), 9946–9955.
- Rajak, P., Khatun, S., Dutta, M., Mandi, M., & Roy, S. (2018). Chronic exposure to acephate triggers ROS-mediated injuries at organismal and sub-organismal levels of *Drosophila melanogaster*. *Toxicology Research*, 7(5), 874–887. <https://doi.org/10.1039/C8TX00052B>
- Ramos, P., Abundis, H., Gaytán, J., Ordaz, Ma. Orozco, P., Maldonado, J., & Hernández, J., Gonzales, E., Reyes, P., Galicia, E., M. J. (1993). Manual de laboratorio de genética para *Drosophila melanogaster*.
- Repetto, M., & Repetto, G. (2009). *Toxicología Fundamental. Cuarta Edición*.
- Reyes, E. R. (2016). *Estudio De Casos De Toxicidad. Introducción a la toxicología*. Retrieved from <https://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/publicaciones/libros/cbiologicas/libros/Toxico-ago18.pdf>
- Rosso, S. B., Cáceres, a O., de Duffard, a M., Duffard, R. O., & Quiroga, S. (2000). 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid disrupts the cytoskeleton and disorganizes the Golgi apparatus of cultured neurons. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 56(1), 133–140. <https://doi.org/10.1093/toxsci/56.1.133>
- Sharifi Pasandi, M., Hosseini Shirazi, F., Gholami, M. R., Salehi, H., Najafzadeh, N., Mazani, M., ... Niapour, A. (2017). Epi/perineural and Schwann Cells as Well as Perineural Sheath Integrity are Affected Following 2,4-D Exposure. *Neurotoxicity Research*, 32(4), 624–638. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9777-y>
- Skinner, M. K. (2008). What is an epigenetic transgenerational phenotype?. F3 or F2. *Reproductive Toxicology*, 25(1), 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.09.001>
- Stellman, J. M., & Stellman, S. D. (2018). Agent Orange During the Vietnam War: The Lingering Issue of Its Civilian and Military Health Impact. *American Journal of Public Health*, 108(6), 726–728. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2018.304426>

- Timbrell, J. (2002). *Introduction to Toxicology*.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1201/9780367806590>
- Vega-Celedón, P., Canchignia Martínez, H., González, M., & Seeger, M. (2016). Revisión bibliográfica Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias REVIEW BIOSYNTHESIS OF INDOLE-3-ACETIC ACID AND PLANT GROWTH PROMOTING BY BACTERIA. *Cultivos Tropicales*, 37, 33–39.
<https://doi.org/10.13140/RG.2.1.5158.3609>
- Venkov, P., Topashka-Ancheva, M., Georgieva, M., Alexieva, V., & Karanov, E. (2000). Genotoxic effect of substituted phenoxyacetic acids. *Archives of Toxicology*, 74(9), 560–566.
<https://doi.org/10.1007/s002040000147>
- Yamashita, Y. M. (2018). Subcellular specialization and organelle behavior in germ cells. *Genetics*, 208(1), 19–51. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300184>