



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

*Megaselia scalaris* (INSECTA, Diptera) un modelo  
potencial para evaluar daño genotóxico.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGO**

PRESENTA

HUGO ALBERTO RÍOS PÉREZ



Directora de Tesis: Dra. Patricia Ramos Morales

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

División de Estudios Profesionales

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

*Megaselia scalaris* (INSECTA, Diptera) un modelo potencial para evaluar  
daño genotóxico.

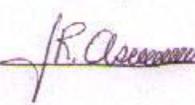
realizado por Ríos Pérez Hugo Alberto

con número de cuenta 09807707 - 6 , quien cubrió los créditos de la licenciatura en  
Biología

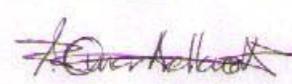
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Tutor (a) Propietario Dra. Patricia Ramos Morales. 

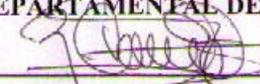
Propietario M. en C. Adriana Muñoz Hernández. 

Propietario M. en C. Alicia Rojas Ascencio. 

Suplente Dra. Marcela Esperanza Aguilar Morales. 

Suplente Biol. Rodolfo Omar Arellano Aguilar. 

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, D.F., a 12 de marzo del 2007  
CONSEJO DEPARTAMENTAL DE Biología

  
Dr. Zenón Cano Santana

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

## **AGRADECIMIENTOS.**

Quisiera agradecer a mi tutora de tesis Dra. Patricia Ramos Morales, por su valiosa aportación académica a mi vida, por su tolerancia y amistad, la cual despertó un gran interés por la genética y la biología en general. A mis sinodales por sus aportaciones a este trabajo: M. en C. Adriana Muñoz Hernández por su tolerancia durante este tiempo y la ayuda técnica en la obtención de material fotográfico, estaría perdido!!!; Biol. Rodolfo Omar Arellano Aguilar, por tus comentarios y amistad brindada; M en C Alicia Rojas Ascencio, por tus enseñanzas sobre los insectos, te lo agradezco; Dra. Marcela Esperanza Aguilar Morales porque me mostraste lo grandioso que es la biología del desarrollo.

También quisiera agradecer a los maestros que forman parte del Laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental, al M. en C. Armando Muñoz Moya mi maestro y gran amigo, gracias por todo, eres admirable, al Biol. Hugo Rivas Martínez por compartir tus conocimientos y por tu incisiva visión hacia la vida... a la Biol. Blanca Rosa Hernández Bernal por tus comentarios hechos y el lomo de fin de año. A Linda Muñoz por tu paciencia, amistad y buenos comentarios.....ahora sigues tu...A Lety, Diana, Ramsés, Tania, Yaneli, Ariadna, Netzi, Erick y los compañeros del laboratorio en general, gracias....

Agradezco enormemente a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme la oportunidad de crecer dentro de ella, reconociendo así su gran potencial como formadora de profesionistas. Y por ultimo quisiera agradecer a toda la gente que creyó en mí y que por alguna extraña o clásica situación ya no están conmigo...gracias. Esta tesis se realizó con el apoyo del proyecto PAPIME: EN206803, DGAPA, UNAM. El material biológico utilizado fue proporcionado por el Banco de Moscas de la Facultad de Ciencias, UNAM .

## **DEDICATORIA.**

Este trabajo esta dedicado a mis padres el Biol. Basilio Luis Ríos Ramírez mi excepcional padre, el biólogo más grande que conozco... sigo tus pasos; la Enf. Juana Pérez Venero eres mi mejor ejemplo y te admiro; sin ellos nada de esto sería posible, mejores padres no me pudieron haber tocado, espero a llegar ser como ustedes y esto es para ustedes, de mi parte..... Saben cuanto los quiero.....

También es para mis hermanitos, un gran ejemplo de vida, para ti Anny por tu cariño y amistad desde que nos conocimos, y a Juan Luis eres incansable y gracias por todo, los quiero a ambos... A mi gran familia Ríos, a los primos y a los sobrinos.

También quisiera dedicar este trabajo a mis mejores amigos de la preparatoria, a Eduardo Meléndez y a Roberto Gómez los estimo y gracias por acompañarme desde que nos conocimos, estamos en las buenas y en las malas.

A mis amigos de la Facultad con los que viví grandes aventuras yendo de aquí para allá.....para ustedes **Edgardo, Fede, Dorian, Ramces**, Uli, Miriam, Erick, Vero, Liz, Luis, María, Chema, Itzel, Salazar, Itzel T, espero que sigamos juntos. A mis casi cuates Pablo y Tulio nos divertimos bastante.....

A mis antiquísimos amigos de mi cuadra, nos conocimos desde hace mucho y pasamos buenos momentos de diversión insana.... al Tibu, al Miguel, al Beni, al Mati, al Cona, al Fer, a Daniel, al Chema, gracias por creer en mí....

.....GRACIAS TOTALES.....

## ÍNDICE

1. Resumen.....	3
2. Introducción.....	4
2.1 Biomonitores y biomarcadores.....	4
2.2 Modelos <i>in vivo</i> y análisis sub-letal.....	5
2.3 Los Dípteros como un grupo potencial para pruebas de genotoxicidad.....	10
2.4 Metamorfosis y Teratogénesis.....	12
2.4.1 Discos imagales.....	13
2.4.2 Control hormonal de la metamorfosis.....	14
2.4.3 Teratogénesis.....	15
2.5 <i>Drosophila melanogaster</i> , un modelo para la prueba de teratogénesis (DTT).....	16
2.6 Generalidades de la Familia Phoridae.....	17
2.6.1 Distribución y diversidad.....	18
2.6.2 Clasificación Taxonómica.....	18
2.6.3 Generalidades de <i>Megaselia scalaris</i> .....	18
2.6.4 Dimorfismo sexual.....	23
2.6.5 Determinación del sexo.....	23
3. Justificación.....	24
4. Objetivos.....	25
5. Hipótesis.....	26
6. Materiales y Métodos.....	26
6.1 Cepa.....	26
6.2 Ciclo de vida.....	26
6.3 Compuestos químicos.....	27

6.4 Manejo y obtención de larvas.....	29
6.5 Tratamiento sub-crónico.....	30
6.6 Registro de resultados.....	31
7. Resultados.....	33
7.1 Griseofulvina (GF).....	33
7.2 Colchicina (CO).....	40
8. Discusión.....	52
9. Conclusiones.....	57
10. Referencias.....	58

## 1. Resumen

Los sistemas experimentales sensibles a contaminantes ambientales son una herramienta importante para realizar estudios de biomonitorio, se han descrito diversos ensayos utilizando una gran variedad de organismos los cuales han mostrado diversos niveles de sensibilidad. Los modelos *in vivo* son una alternativa confiable debido a que permiten analizar el daño en el organismo completo y no únicamente en un parámetro propuesto. Entre estos modelos, *Drosophila melanogaster* ha sido el organismo por excelencia para estudiar a través de distintas metodologías el daño en el material genético inducido por factores físicos y químicos; una de ellas es la prueba de teratogénesis en *Drosophila* (por sus siglas en inglés DTT), la cual determina la inducción de fenotipos semejantes a los producidos por genes (fenocopias) como consecuencia de la exposición de los organismos a ciertos compuestos o factores. No obstante, debido a la gran variedad de ambientes así como a las restricciones biológicas de cada especie, es necesario desarrollar estrategias similares que involucren a otros organismos. *Megaselia scalaris* (Phoridae) es otro díptero que muestra similitudes con *D. melanogaster* sin embargo la diversidad de ambientes que ocupa es mayor. En el presente trabajo se caracterizó la actividad teratogénica inducida por dos teratógenos de referencia: la griseofulvina (GF) y la colchicina (CO) en *M. scalaris*. Los compuestos se administraron mediante un tratamiento sub-crónico vía alimentación en el tercer estadio larvario, a través de diluciones sucesivas a partir de 0.0125 mM hasta 0.00003 mM y recobrando los organismos en etapa adulta. Como indicadores de efecto se determinaron: el Índice de sobrevivencia (IS), Índice sexual (ISx) y la Frecuencia de alteraciones. Los marcadores encontrados en *Megaselia* como evidencias de daño morfológico fueron muy similares a los reportados para *D. melanogaster*, *D. virilis* y *D. hydei* evidenciando la alta conservación de los patrones corporales incluso a distinto nivel taxonómico. *Megaselia scalaris* puede ser utilizada de manera confiable como biomonitor de actividad teratogénica.

## **2. Introducción**

### **2.1 Biomonitores y biomarcadores**

Los sistemas experimentales sensibles a contaminantes ambientales de origen distinto son una herramienta importante para realizar estudios de biomonitoreo ambiental (Ramos *et al.*, 2000). Un organismo puede mostrar cambios en su morfología, conducta, longevidad, capacidad reproductiva, etc., como consecuencia de la exposición a factores ambientales diversos. La caracterización de las alteraciones en los organismos expuestos a factores que dañan su salud sirve de base para la determinación de la capacidad de los factores ambientales para alterar a los sistemas biológicos, en otras palabras, el componente biótico de un ecosistema constituye un biomonitor de la calidad de éste.

Con la finalidad de analizar el daño genético inducido por los contaminantes se han desarrollado metodologías con distintos organismos que son utilizados como biomonitores, no obstante, la gran diversidad de los ambientes restringe el uso de un mismo tipo de organismo para evaluar diversos ambientes.

Para realizar biomonitoreo de calidad es necesario que el modelo (organismo) que se utilice cubra ciertas características con respecto a los aspectos biológicos del organismo y a cuestiones económicas. De acuerdo al primer aspecto, además de ser sensible a los cambios en el ambiente, el organismo debe tener un ciclo de vida relativamente corto, numerosa progenie y dimorfismo sexual evidente, de manera que la presencia de alteraciones inducidas por factores ambientales ocurra poco tiempo después de la exposición y se manifieste con diferente intensidad en los organismos expuestos, dependiendo de la cercanía de éstos a la fuente de emisión del contaminante. La alerta temprana de cambios en las condiciones ambientales contribuye a identificar y controlar al contaminante o fuente de emisión de éste antes de que el daño a la población se haga extensivo. El conocimiento de otros aspectos de los organismos como los relacionados

con conducta, metabolismo, desarrollo, genética, y otros, son fundamentales para interpretar de manera más confiable la forma en la que reaccionan ante la exposición a agentes contaminantes. Aunado a lo anterior, una característica deseable en los sistemas utilizados en el biomonitoreo es que su aplicación tenga un costo razonablemente bajo.

Con la finalidad de disponer de alternativas válidas para diferentes ambientes, se exploran continuamente las ventajas y limitaciones de incorporar en estudios de biomonitoreo a organismos como metazoarios inferiores, insectos, peces, anfibios y plantas, entre otros (Butterworth *et al*, 2001). Teniendo el biomonitor adecuado para el ambiente que se quiere analizar, es necesario determinar los biomarcadores o las estructuras blanco, incluyendo los órganos, tejidos, tipo celular, niveles de proteínas, enzimas y otras sustancias que muestren variaciones con respecto a los niveles de los mismos en organismos no expuestos, de manera que puedan ser utilizados para determinar cambios en la calidad del ambiente; en otras palabras, pueden ser biomarcadores de exposición o de efecto a diferentes niveles. Estas alteraciones son producto de la interacción entre las partículas tóxicas y el material genético del organismo expuesto o bien, de la interferencia en la regulación de la expresión de éste.

## **2.2 Modelos *in vivo* y análisis sub-letal**

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, fue el primer organismo utilizado para desarrollar una metodología para estudiar cambios inducidos en el material genético. Muller (1927, 1928 y 1929), en experimentos con rayos X utilizando a *Drosophila* obtuvo evidencia de que se podían inducir alteraciones en el ADN (mutaciones, rompimientos, translocaciones) que posteriormente comprobó citológicamente.

A partir de entonces, se le ha utilizado como organismo base de muchas metodologías con las que es posible establecer la capacidad de factores ambientales físicos, químicos o biológicos para alterar el material genético (actividad genotóxica); en otras es posible establecer el mecanismo por el que ocurre el daño inducido. De manera alternativa es posible evaluar la capacidad de los factores ambientales para

ocasionar daño en las células germinales, cuyos efectos se harán manifiestos en la ó las generaciones posteriores a la exposición de los organismos al factor con actividad genotóxica. Con respecto a las células somáticas, las consecuencias pueden agruparse en dos grandes categorías: inducción de mutación y recombinación somática, que se asocian con el desarrollo de procesos malignos como el cáncer y alteración en la regulación genética durante el desarrollo, que se relaciona con la presencia de malformaciones en los organismos afectados (efecto teratogénico) (Yu, 2000).

Para evaluar la actividad teratogénica de los factores ambientales se requiere idealmente de organismos en los que la duración del desarrollo permita la exposición aguda, semicrónica o crónica al posible teratógeno. Por otro lado, la complejidad en la regulación del organismo seleccionado debe permitir evaluar diferentes niveles de organización. Entre las alternativas más utilizadas por su accesibilidad se encuentran los modelos *in vitro*, en los que la expresión de marcadores celulares como algunos factores tumorales constituyen la evidencia de la actividad teratogénica. Schwengberg y colaboradores (2005) utilizaron células troncales de embriones de ratón para realizar pruebas de embriotoxicidad, con monómeros de resinas dentales, observando que algunos componentes de éstos tienen efecto teratogénico y embriotóxico, utilizando el ensayo MTT, el cual consiste en una prueba calorimétrica para medir la actividad metabólica de las células viables; y cuantifica la proliferación celular y citotoxicidad utilizando la sal 13-(4, 5dimetiltiazol-2)-2, 5-difenil bromuro de tetrazolio. De los compuestos probados el bisfenol A glicidilmetacrilato (BisGMA) resultaron positivos en la prueba citada.

Las metodologías basadas en cultivos *in vitro* tienen la ventaja de que permiten la realización de numerosos ensayos en poco tiempo, sin embargo, por lo general son costosas, además de que sólo pueden ser consideradas una primer aproximación debido a que los sistemas celulares carecen de la regulación y complejidad que se presenta en los sistemas completos o *in vivo*.

Entre los sistemas *in vivo*, se han preferido los basados en mamíferos y constituyen la primera elección por su cercanía con los seres humanos. En 2006 Kransler y colaboradores utilizaron modelos mamíferos

como hamsters, ratas y cerdos de Guinea para comparar la actividad teratogénica de la 2, 3, 7, 8-Tetraclorodibenzo-p-dioxin (TCDD) el cual es un contaminante que se encuentra de manera persistente en el ambiente que causa gran variedad de daño en la salud de los humanos, incluyendo desarrollo anormal. Actualmente son pocos los estudios desarrollados con mamíferos debido al alto costo y largo tiempo requerido para su realización.

Otros modelos utilizados se basan en vertebrados como aves, peces y en otros organismos, los cuales también tienen una demanda considerable de infraestructura, costo y tiempo para su ejecución. Blankenship y colaboradores en 2003 demostraron que la 2, 3, 7, 8-Tetraclorodibenzo-p-dioxin (TCDD) ocasiona malformaciones y muerte en los embriones de gallinas blancas. Loucks y Carvan III en 2004 probaron etanol en pez cebra (*Danio reiro*) obteniendo alteraciones a nivel neurocranial y craneofacial y demostraron que el desarrollo anormal depende de la sensibilidad de la cepa utilizada, así como de la dosis, concluyendo que la perturbación en el desarrollo está fuertemente influenciada por factores genéticos. En 2006 Casarini y colaboradores utilizaron el ensayo de teratogénesis en embriones de ranas de *Xenopus* (FETAX assay) utilizando embriones en estado de gástrula para identificar sustancias que pueden poner en riesgo el desarrollo en humanos; como es el caso de la toxina marina ácido okadaico (OA).

En la actualidad se ha hecho énfasis en la relevancia de explorar las ventajas que pueden tener los modelos biológicos no mamíferos para el estudio de las bases celulares y moleculares de la toxicidad y la genotoxicidad, cuyos resultados podrían sugerir un impacto similar para el ser humano (Ballatori & Villalobos, 2002). Aunque los hallazgos obtenidos a partir de sistemas animales no pueden ser extrapolados para el hombre, han servido como modelos experimentales complementarios, como también ha sido el caso de los modelos *in vitro*; ya que una de las desventajas de éstos, que es considerada primordial, es la falta de similitud a nivel genómico y su menor complejidad, comparados con las de los sistemas *in vivo* (Duffus, 1983).

No obstante, los resultados obtenidos a través de ensayos *in vitro* constituyen una aproximación en el conocimiento del efecto de genotóxicos en sistemas *in vivo*. En este sentido, es deseable que los resultados *in vitro* se confirmen utilizando modelos *in vivo*, especialmente para corroborar aspectos críticos y particularmente, en la toma de decisiones relacionadas con el ambiente (Mothersill & Austin, 2003). De esta manera, se recomienda:

- Determinar los indicadores relevantes con respecto a los puntos críticos de concentraciones en pruebas *in vitro* para explorar el efecto *in vivo*.
- Determinar las interrelaciones entre lo que se sabe del potencial tóxico de una sustancia *in vivo* y los resultados obtenidos en una prueba *in vitro*.
- Demostrar la calidad de la información *in vitro* por evaluación del protocolo, repetibilidad intra-laboratorio, reproducibilidad inter-laboratorio, número y tipo de químicos usados y adherencia a los estándares de GLP (Good Laboratory Practice) (Código de Regulación Federal, 1998 en Mothersill & Austin, 2003).
- Para un factor ambiental del cual no hay registros previos, es necesario validar la información obtenida en un sistema *in vitro* a través de un sistema *in vivo*.
- Definir el rango de concentraciones en las que el uso del factor ambiental es seguro o bien, el riesgo ecotoxicológico es mínimo, dependiendo del tipo de aplicación del que se trate.

Por su parte, los modelos *in vivo* ofrecen diversas ventajas con respecto a otro tipo de metodologías. El uso de organismos vivos permite analizar el efecto de posibles genotóxicos en todo el organismo y no sólo en una estructura o con referencia a alguna función en particular, por esta razón es primordial conocer diversos aspectos de la biología de los organismos utilizados y no únicamente su acción sobre una parte del organismo o un tipo de efecto particular.

Medidas de toxicidad como la dosis o la concentración a la que muere el 50 % de los organismos expuestos ( $LD_{50}$  ó  $LC_{50}$ , respectivamente), tiene una aplicación limitada (Fig. 1) y depende, en todos los

casos, del nivel de complejidad del organismo utilizado, por ejemplo: establecer rangos de exposición a un factor ambiental utilizando ratas para predecir un efecto similar (letalidad) en humanos (Duffus, 1983). La letalidad es una medida muy general de la respuesta tóxica y se restringe a la valoración de la exposición de organismos a concentraciones sumamente altas. En general, los organismos en el ambiente son expuestos a concentraciones menores que las ocupadas en los ensayos de toxicidad pero, por períodos más prolongados. El modelo clásico de dosis-respuesta para la determinación de toxicidad no es informativo del daño sub-letal que se pueda haber ocasionado en los organismos expuestos que no murieron en el tratamiento.

Por lo anterior, el estudio de los efectos sub-letales provocados por agentes potencialmente peligrosos puede dar información valiosa y ser una herramienta sensible para detectar la presencia de éstos a concentraciones bajas y establecer el rango de concentraciones o la intensidad de la exposición a partir de la que se incrementa la probabilidad de que los organismos expuestos puedan resultar dañados.

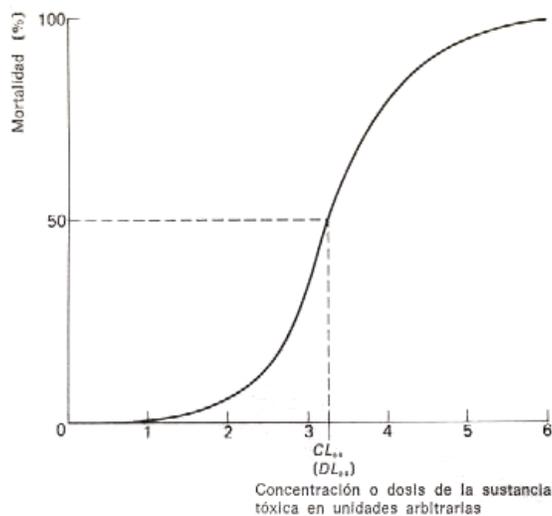


Fig. 1 Se presenta la relación típica entre mortalidad y concentración de la sustancia tóxica, o dosis, después de una exposición continua de los organismos durante un tiempo fijo, de ordinario 48 o 96 horas (Duffus, 1983).

### 2.3 Los Dípteros como un grupo potencial para pruebas de genotoxicidad

Los insectos son el grupo más diverso de todo el reino animal, se calcula que el número de especies va entre uno a 10 millones, además de que fueron los primeros animales en colonizar el ambiente terrestre (Eisner & Wilson, 1977). La gran mayoría de los insectos son terrestres, por lo que ocupan una gran variedad de hábitats; se estima que esta Clase abarca alrededor de 876, 000 especies extintas, clasificadas en 32 Órdenes y alrededor de 939 Familias; actualmente los Órdenes más diversos son: Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera y Diptera (Daly *et al.*, 1998) (Fig. 2).

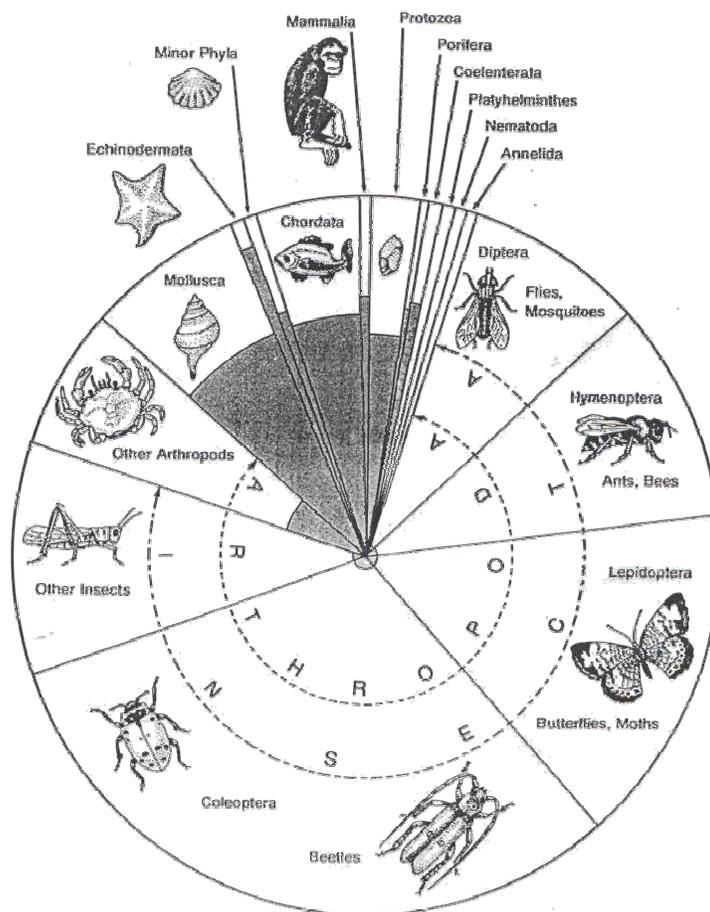


Fig. 2. El diagrama muestra la gran diversidad de insectos, particularmente de los órdenes: Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, y Lepidoptera. (Eisner & Wilson, 1977).

El Orden Diptera, es uno de los más grandes, los miembros de este grupo se caracterizan por ser insectos muy abundantes. La mayoría de los dípteros pueden ser reconocidos fácilmente porque poseen un par de alas membranosas (mesotorácicas) y las alas posteriores (metatorácicas) se encuentran reducidas a dos pequeñas protuberancias llamadas halterios o balancines que están relacionadas con la conservación del equilibrio durante el vuelo. La mayoría de los dípteros tienen un tamaño relativamente pequeño, cuerpo blando (cutícula medianamente esclerosada), las partes bucales modificadas siendo de tipo picador-suctor o lamedor y en muy pocas especies, las piezas bucales están pobremente desarrolladas o no son funcionales. Las patas presentan un par de uñas en el pretarso y entre ellas una estructura llamada empodio que les permite sujetarse a superficies planas. Presentan también ojos compuestos formados por numerosas omatidias, en la parte posterior-superior de la cabeza presentan ocelos, Las antenas pueden ser de distintas formas, siendo las más frecuentes de tipo aristada (Borror *et al.*, 1989).

Algunos organismos dentro de este Orden tienen ciclos de vida relativamente cortos y progenie abundante; en cuanto al desarrollo postembrionario, éste puede ser de tipo epimórfico (el número de segmentos permanece constante en estadios juveniles y en el adulto), metamórfico (de tipo completo), holometábolo, que implica pasar por una fase larvaria posterior a la eclosión del huevo seguida por una fase pupal hasta llegar a un imago o adulto (Daly *et al.*, 1998).

Existe una metamorfosis verdadera en Diptera que implica principalmente la destrucción de los tejidos larvarios y su reemplazamiento por una población de células diferentes (Gilbert, 2003). Este tipo de desarrollo post-embionario constituye una ventaja para realizar estudios de toxicología, ya que permite analizar el efecto de la exposición a algún compuesto en estadios larvarios y evaluar el daño producido de forma constitutiva y hasta la formación del adulto.

Algunas especies de dípteros se han podido adaptar a las condiciones de laboratorio y han sido utilizados como modelos para evaluar agentes tóxicos, entre ellas se encuentran algunas pertenecientes a la Familia Drosophilidae como *D. melanogaster*, *D. virilis* y *D. hydei*, que han mostrado sensibilidad a la

exposición de algunos compuestos y una especie de la Familia Phoridae como es el caso de *Megaselia scalaris* (Cuadro 1).

Organismo	Compuesto		Referencia
	Colchicina	Griseofulvina	
<i>D. melanogaster</i>	? <sup>1</sup>	? <sup>2</sup>	<b>Muñoz-Hernández A (1997)<sup>1</sup> Arellano-Aguilar O. (1995)<sup>2</sup></b>
<i>D. virilis</i>	?	?	<b>Bautista-Hernández D (2005)</b>
<i>D. haydei</i>	?	?	<b>Bautista-Hernández D (2005)</b>

Cuadro 1. Los compuestos probados para *D. melanogaster*, *D. virilis* y *D. hydei* fueron positivos en un tratamiento Sub-crónico.

## 2.4 Metamorfosis y Teratogénesis

El desarrollo de un insecto holometábolo, se puede dividir en dos etapas: la primera etapa es el desarrollo embrionario, en el que se establecen las principales regiones del organismo y culmina con la eclosión de una larva; la segunda es el desarrollo post-embrionario que deriva en la formación de las estructuras del imago o adulto, esta etapa es de gran importancia para la evaluación de toxicidad.

*Drosophila melanogaster* es el organismo mejor conocido, especialmente a nivel genético. Es un invertebrado que ha tenido un enorme impacto en el entendimiento de las bases genéticas del desarrollo de los vertebrados (Wolpert *et al.*, 2002). Durante el desarrollo post-embrionario de *Drosophila* se forman compartimentos que delimitan parasegmentos y segmentos. En el blastodermo celular, se aprecia la definición de los parasegmentos en cada región del cuerpo de la futura mosca. A las diez horas de la formación, aparecen los segmentos en el embrión, el cual se considera que presenta el mapa del desarrollo

del organismo ya que se ha establecido qué zonas del embrión darán origen a regiones específicas en el adulto; se distinguen tres segmentos torácicos y ocho abdominales. En todo este proceso, los genes homeóticos determinan la formación de los diferentes segmentos del cuerpo de la mosca (Zurita, 2002). Una vez que termina la primera fase del desarrollo, se lleva a cabo la eclosión del huevo. En dípteros y en otros organismos holometábolos, la forma juvenil se llama larva. La larva eclosionada pasa por una serie de mudas para aumentar su tamaño. Los estados entre estas mudas larvarias se conocen como estadios (Gilbert, 2003).

#### **2.4.1 Discos Imagales**

En los insectos holometábolos, la transformación de la forma juvenil al adulto ocurre dentro de la cutícula pupal. La mayoría del cuerpo larvario es sistemáticamente destruida por muerte celular programada, mientras que los órganos del adulto se desarrollan a partir de cúmulos indiferenciados de células imagales. En el soma de la larva se reconocen básicamente dos distintas poblaciones celulares: las células larvarias, que son utilizadas para las funciones del estadio juvenil; y miles de células imagales, las cuales se encuentran en letargo aguardando la señal para diferenciarse (Gilbert, 2003).

Tres tipos de estructuras contienen células imagales (Fig 3):

1. Los discos imagales, son células que van a formar estructuras cuticulares como las alas y además dan origen a patas, antenas, ojos, cabeza, tórax y placa genital.
2. Los histoblastos, son racimos de células imagales que darán origen al abdomen del adulto.
3. Racimos de células imagales dentro de órganos como el intestino y los tubos de Malpighi, los cuales proliferan para formar el órgano del adulto respectivo cuando el órgano de la larva degenera.

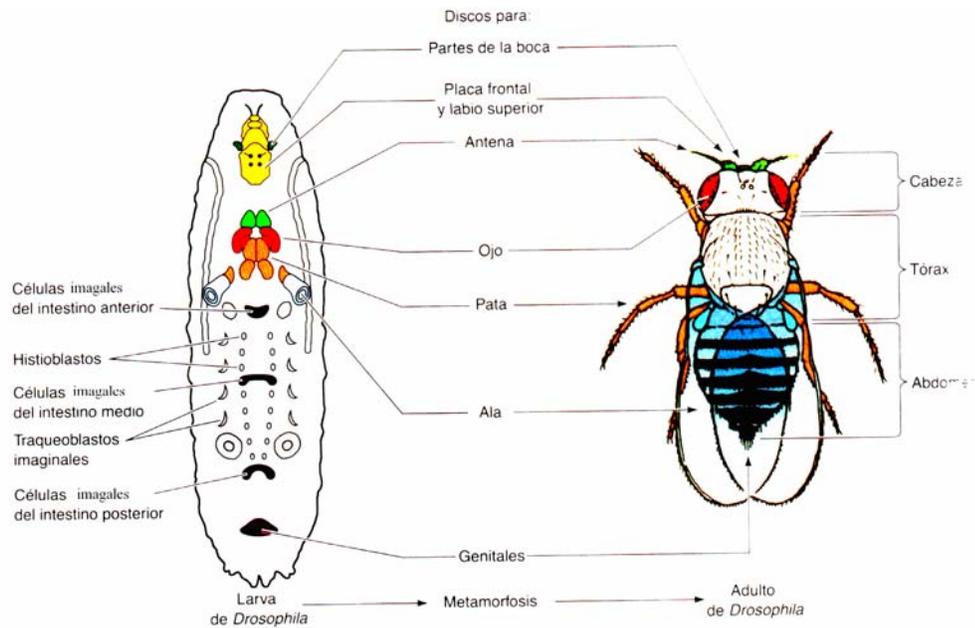


Fig. 3. Células imágales, en *D. melanogaster* (Gilbert, 2003)

#### 2.4.2 Control hormonal de la metamorfosis

Ahora está claramente establecido que los cambios de las mudas y de la metamorfosis son regulados por tres hormonas: la hormona protorácica (PTTH) proveniente de las células neurosecretoras del cerebro, la hormona ecdysona (ecdysteroides) a partir de las glándulas protorácicas y la hormona juvenil, a partir de los *corpora allata* (Nation, 2002).

La ecdysona (esteroide) y la hormona juvenil (lípido) son las hormonas efectoras que controlan este proceso de mudas y metamorfosis. El proceso inicia en el cerebro, cuando las células neurosecretoras liberan hormona protorácica (PTTH) en respuesta a señales neuronales, hormonales o del ambiente. La PTTH (péptido) estimula la producción de ecdysona actuando sobre las glándulas protorácicas. La ecdysona es modificada en los tejidos periféricos para llegar a ser la forma activa de la hormona de muda, 20- hidroxiecdysona (20E). Cada muda es iniciada por uno o más disparos hormonales de 20E, los cuales estimulan a las células de la epidermis para sintetizar enzimas que digieren y reciclan a los componentes de la cutícula. Las células secretoras del *corpora allata* que liberan la hormona juvenil (JH) están

activadas durante el proceso de muda pero se encuentran inactivadas durante el inicio de la muda metamórfica. Por lo tanto, la presencia de la JH y los pulsos de la 20E resultan en un nuevo estadio larvario. Cuando los niveles de JH decaen por acción del nervio medio del cerebro que actúa sobre los *corpora allata* y por el aumento de la capacidad para degradar a esta hormona en el resto del cuerpo, ocurre un disparo en la liberación de la PTTH que actúa sobre las glándulas protorácicas liberando ecdysona que se va a transformar a su forma activa 20E y el resultado de la 20E en ausencia de la JH, lleva a las células de la epidermis al desarrollo pupal (Gilbert, 2003). En *D. melanogaster* este mecanismo está bien estudiado (Fig. 4).

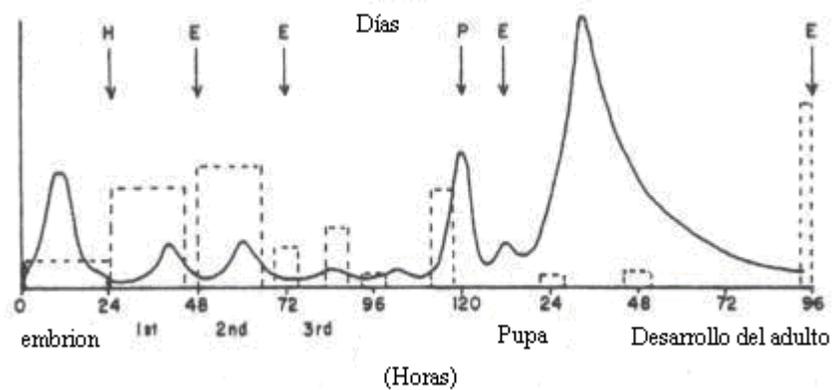


Fig. 4. Disparos de ecdysona y hormona juvenil a lo largo del desarrollo de *D. melanogaster*. En línea punteada la JH y en línea continua la ecdysona (H, huevo; E, ecdysis; P, pupación) (Nation, 2002)

### 2.4.3 Teratogénesis

Las complicadas series de eventos durante el desarrollo de un organismo, ofrecen una variedad de blancos tiempo-específicos para la toxicidad de un compuesto (WHO, 1984). Los contaminantes ambientales con actividad genotóxica modifican el material genético de cualquier tipo de célula, ya sea causando mutaciones, induciendo lesiones precancerosas o interfiriendo en la diferenciación de organismos en desarrollo, actividad teratogénica. Este último tipo de daño, si bien no es heredable, reduce

la expectativa del desarrollo de manera importante. Así, las anomalías causadas por agentes exógenos son llamadas **disrupciones** y los agentes responsables de estas disrupciones son llamados teratógenos (Gilbert, 2003). La exposición a estos agentes lleva a la aparición de fenotipos semejantes a los producidos por genes en organismos no portadores y son denominadas fenocopias.

Los teratógenos incluyen drogas y otros compuestos químicos, sin embargo los virus, la radiación, la hipertermia y condiciones metabólicas en la madre pueden también actuar como teratógenos. Muchos de los químicos pueden causar defectos en el nacimiento y se encuentran en el ambiente por causas naturales (yacimientos minerales, actividad ígnea, etc) o como producto de la actividad antropogénica (uso industrial, agrícola, etc). El alcohol y la quinina son sustancias derivadas de plantas y pueden causar disrupciones en el desarrollo. La ingesta de quinina en el embarazo puede causar sordera y el alcohol puede causar retraso físico y mental en el infante (Gilbert, 2003).

### **2.5 *Drosophila melanogaster*, un modelo para la prueba de teratogénesis (DTT)**

La prueba de teratogénesis en *D. melanogaster*, es una herramienta que permite evaluar el daño ocasionado por agentes extraños (teratógenos) en poco tiempo y a bajo costo. La prueba se basa en exponer a larvas de tercer estadio por vía alimentación al compuesto a probar, de manera que la actividad tóxica de éste, interfiera con los procesos de regulación de la segunda fase del desarrollo (metamorfosis) del organismo. Lynch *et al.* (1991), mediante la exposición a partir de huevos a agentes teratógenos, cuantificaron las alteraciones morfológicas evidentes en la fase adulta, las cuales consistieron en diferentes estructuras alteradas, sin embargo, con base en la respuesta observada de acuerdo con la concentración administrada, sólo consideraron confiable el efecto en dos biomarcadores: la presencia de sedas humerales tipo *bent* (sedas dobladas en un ángulo de  $45^{\circ}$ , en contraposición a las sedas rectas de las moscas no expuestas), y alas tipo *Notch* (alas que muestran una muesca en el borde de la hoja del ala). La

aparición de este tipo de alas recuerda mucho a las producidas por el gen *Bd<sup>s</sup>* (*Beaded- Serrate*) (Lindley & Grell, 1972). De esta manera, las alas tipo *Notch* son una fenocopia, inducida por la exposición a teratógenos (Lynch *et al.*, 1991; Muñoz *et al.*, 2003).

El uso del tercer estadio larvario para la administración del compuesto tóxico permite al organismo continuar con su desarrollo debido a que la respuesta hormonal es muy baja y se asegura que el organismo pueda entrar a la siguiente fase de su ciclo de vida, la pupación y es posible evaluar el daño en los biomarcadores expresados en la fase adulta. Los agentes con actividad teratogénica no necesariamente causan lesiones al ADN pero si interfieren con la regulación y expresión de los genes que actúan en la diferenciación de la fase adulta (células imagales), recobrando fenocopias.

## **2.6 Generalidades de la familia Phoridae**

Moscas pequeñas, alrededor de 0.5-5.5. mm de largo; de color negrusco, marrón o amarillento. Con gran número de sedas en la cabeza patas y en otras partes del cuerpo. El tórax a menudo con apariencia jorobada. Alas por lo general largas, comúnmente café claro, rara vez con marcas oscuras, venación distintiva (el margen costal (C) marcado extendiéndose cerca de la mitad de la longitud del ala; la vena escutelar (Sc) usualmente corta y en algunos casos ausente;  $R_1$  y  $R_{4+5}$  atestadas cerca del margen costal,  $R_s$  simple o con una bifurcación anterior; las venas restantes  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $CuA_1$ ,  $A_1+CuA_2$  son delgadas y no muy marcadas, las venas mediales se encuentran libres y usualmente no llegan al borde del ala; la vena anal (A) es simple; en la figura 5B se muestra la venación de *M. scalaris*). En algunas especies, la hembra presenta alas cortas o ausentes; algunas hembras son ápteras (Mc Alpine *et al.*, 1981).

### 2.6.1 Distribución y Diversidad

La Familia se encuentra dividida en 6 subfamilias, tres de las cuales aparecen en la región Neártica. Alrededor de 225 géneros y más de 2500 especies de Phoridos son conocidos en la fauna mundial. En Norte América existen aproximadamente 356 especies reconocidas, distribuidas en 48 géneros. Cerca de 1250 spp se encuentran incluidas en el gigantesco y cosmopolita género *Megaselia* (Mc Alpine *et al.*, 1981).

**2.6.2 Clasificación taxonómica** (Se tomó de McAlpine *et al.* 1981-1987 en Borror *et al.*, 1989).

Phylum. Arthropoda.

Clase. Insecta.

Subclase. Neoptera.

Infraclasse. Endopterygota.

Orden. Diptera.

Suborden. Brachycera.

Familia. Phoridae.

Genero. *Megaselia*.

Especie. *Megaselia scalaris*. (Loew, H)

### 2.6.3 Generalidades de *Megaselia scalaris*

El color del cuerpo es amarillento, el cual se oscurece al pasar el tiempo viéndose más pardo. En la región del abdomen, presenta pigmentación oscura en cada segmento. Presentan gran cantidad de sedas en la

cabeza, en la región del noto del tórax, y en las patas; en éstas se observa un gran desarrollo muscular sobre todo en el fémur y en la tibia; presenta antenas aristadas, la venación de las alas se caracteriza por ser paralela, la forma de las antenas es aristada (Fig. 9 A, B, C). Son moscas muy activas, rápidas, se mueven a saltos; se encuentran en sitios con gran humedad, o cerca de muchos tipos de plantas en descomposición o animales, incluyendo cadáveres (Greenberg & Wells, 1998). Existen reportes de casos relacionados con la myasis, o parasitismo de órganos o tejidos de vertebrados de sangre caliente por estos organismos los cuales se introducen al cuerpo a través de heridas y llevan a cabo su desarrollo larvario alimentándose de los tejidos del hospedero (Hira *et al.*, 2004). Otra característica de *Megaselia* es que puede crecer en gran variedad de medios, incluyendo carne en descomposición (Harrison & Cooper, 2003), razón por la que se les utiliza en medicina forense como indicadores de tiempo.

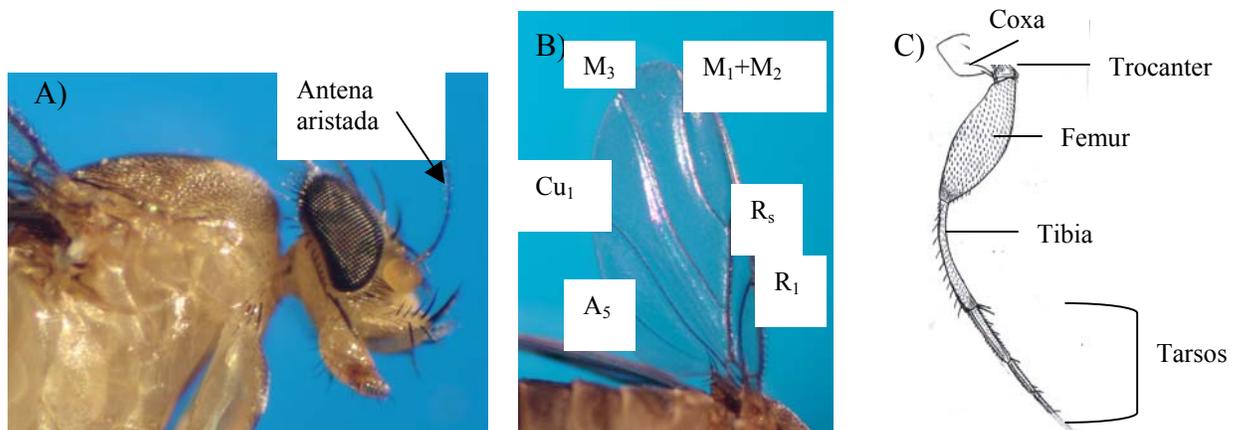


Fig 5. A) Cabeza, antena aristada; B) Venación característica del ala; C) pata del mesotórax.

### - Larva

Se reconocen tres estadios larvarios. Las larvas se caracterizan por tener forma cilíndrica, que disminuye hacia la cabeza (acron). La región cefálica está formada por dos lóbulos. Las antenas tienen forma de

domo o cúpula con seis papilas sensoriales localizadas a los lados de las antenas, cuatro están asociadas en grupo y dos no están asociadas. El complejo del palpo maxilar, presenta seis papilas más o menos distribuidas en forma de arco. Los ganchos bucales aparecen cada uno como lóbulos semicirculares con un margen periférico con apariencia de sierras, estos presentan cambios mínimos a través de los estadios larvarios (Boonchu *et al.*, 2004). Las diferencias entre los tres estadios larvarios radican en el tamaño, número y localización de los espiráculos y en la forma del labium.

Además, las larvas presentan un comportamiento diferente a las de *D. melanogaster*; al exponer a larvas de *M. scalaris* a una solución de levadura al 2% llegan a formar burbujas de aire en el tubo digestivo para flotar en el medio acuoso. Se ha propuesto la hipótesis de que ésta es una adaptación relacionada con los ambientes acuáticos en los cuales también se puede desarrollar la fase larvaria (Harrison & Cooper, 2003).

### **1er estadio larvario.**

Mide aproximadamente 750  $\mu\text{m}$  de longitud. Presenta un labrum tuberculado localizado entre las bases de los ganchos bucales poco desarrollados, mientras que el labium aparece aplanado, de estructura bilobulada que se curva centralmente; tiene un par de antenas que se encuentran en la parte dorsal de cada lado de la región cefálica (Fig 6). Presenta también espinas rudimentarias en la parte dorsal y lateral del cuerpo y espiráculos discoidales posteriores localizados en la parte dorsal del segmento caudal. Cada uno de estos espiráculos discoidales sostiene dos aberturas rectas que se unen ventralmente (Boonchu. *et. al.*, 2004).

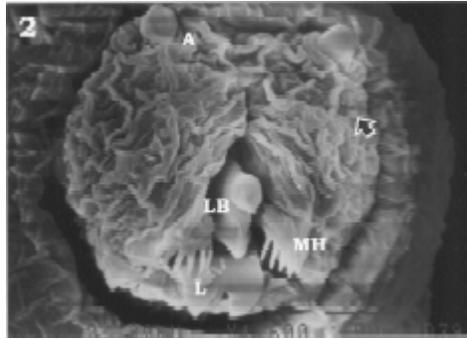


Fig 6. Región cefálica del 1er. estadio larvario. Se muestran las antenas (A), labrum (LB) ganchos bucales (MH) y el labium (L) la flecha señala los complejos de los palpos maxilares. Fotografía de microscopía electrónica. Tomada de Boonchu *et al.*, 2004

## 2° estadio larvario.

La morfología de este estadio es muy similar a la del primer estadio, se observa un aumento de tamaño mide alrededor de 2 mm y una coloración más blanquecina, La cavidad oral es más desarrollada y evidente que la de la larva de primer estadio. Los ganchos bucales se observan más desarrollados y el labium aparece con forma triangular y se curva centralmente (Fig 7). Cada espiráculo protorácico es una estructura papiliforme circular que contiene dos aberturas rectas que se fusionan en una sola. A la inversa, los espiráculos discoidales posteriores aparecen delgados y fusionados a la mitad. La terminación extendida de la placa del espiráculo contiene dos aberturas rectas. Por último, los espiráculos protorácicos aparentemente están ausentes en la larva de 1er estadio (Boonchu. *et al.*, 2004).

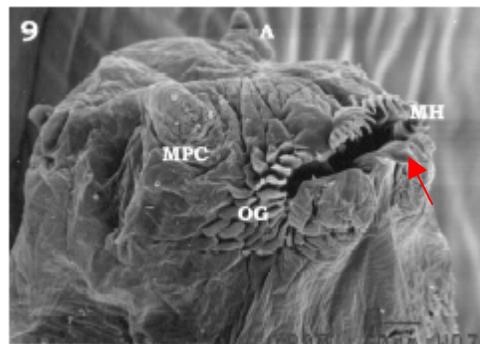


Fig. 7. Región cefálica del 2 ° estadio larvario. Se muestran la antena (A), los ganchos bucales (MH), el complejo de los palpos maxilares (MPC) y los surcos orales (OG) y el labium señalado con una flecha. Fotografía de microscopía electrónica. Tomada de Boonchu *et al.*, 2004

### 3er estadio larvario.

Se observa de color crema-blanco, mide aproximadamente 4mm de longitud. El labium, es de forma triangular, más o menos alargada (Fig. 8). Los espiráculos anteriores están localizados en cada borde latero-posterior del protórax. Un par de espiráculos posteriores sobresalen dorsalmente en el segmento 12. Cada uno aparece como en forma de plato alargado, el cual está constreñido centralmente (Sukontason *et al.*, 2002).

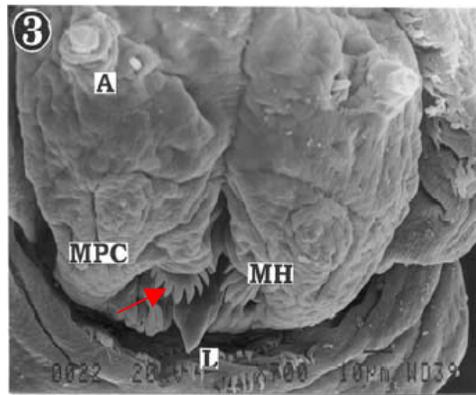


Fig. 8. Región cefálica del tercer estadio larvario. Se muestran las antenas (A), el complejo de los palpos maxilares (MPC), el labium (L), los ganchos bucales (MH) y los surcos orales (OG) señalados con una flecha. Fotografía de microscopía electrónica. Tomada de Sukontason. *et al.*, 2002

### Pupa.

Ocurre al finalizar el tercer estadio, es su última muda en la que la cutícula se endurece y se vuelve rojiza. Tiene forma oval, algo puntiaguda en el final porque los extremos de la larva siguen relativamente inalterados, es convexa en la parte dorsal y algo convexa ventralmente y aplanada. Con un par de órganos respiratorios (cuernos), localizados dorsalmente en el segundo segmento abdominal (Mc Alpine *et al.*, 1981).

#### 2.6.4 Dimorfismo sexual.

El dimorfismo sexual es positivo hacia la hembra, siendo ésta de mayor tamaño que el macho, también es posible observar con mínimo detalle los cambios estructurales en la parte posterior del abdomen para determinar el sexo fenotípico en la placa genital (Fig. 10). Otra característica que la distingue claramente de *Drosophila melanogaster* es que el dimorfismo sexual es evidente a partir del segundo estadio larvario, así como en la pupación, siendo el tamaño de las larvas y pupas hembras, claramente de mayor tamaño que las de sexo masculino, esta característica es de gran importancia para analizar el efecto de los tratamientos durante el desarrollo de hembras y machos.



Fig. 9. Dimorfismo sexual de *M. scalaris*, mostrando las diferencias en la placa genital.

#### 2.6.5 Determinación del sexo

*M. scalaris* presenta tres cromosomas homomórficos pareados, incluyendo a los cromosomas sexuales, que corresponden al segundo par. El sexo es determinado por la presencia o ausencia de un factor

determinante de machos, el cual se produce por la acción de un gene epistático y dado que este factor determinante de machos puede saltar de cromosoma en cromosoma no hay un ligamiento al sexo clásico, sino sólo un ligamiento parcial del sexo (Crew, 1970), esto se refiere a que la determinación del sexo no está dada por una compensación de dosis de cada progenitor como ocurre en otros organismos. Se han reportado cuatro casos en los cuales la función del determinante primario de machos ha sido transferido del cromosoma original Y a un nuevo locus en uno de los autosomas e incluso al cromosoma X original, presumiblemente por una transposición (Traut, 1994).

### **3. Justificación**

El estudio de las perturbaciones ambientales, producidas por factores de origen natural o antropogénico, hace necesario caracterizar sistemas *in vivo* alternativos con la finalidad de cubrir mayor variedad de ambientes ya que un sólo organismo no es suficiente debido a las limitantes inherentes a sus características biológicas. El uso de insectos como sistemas se prueba ha sido una alternativa que muestra un gran potencial para la evaluación de genotoxicidad. Sin embargo es imprescindible poder correlacionar la respuesta obtenida en diferentes modelos para poder cubrir un rango mayor de posibilidades sobre el impacto de las perturbaciones ambientales. *D. melanogaster* es uno de los organismos mejor estudiados que ha mostrado ser sensible ante diversos genotóxicos. Es prioritario determinar si la respuesta a la exposición de agentes genotóxicos mostrada por este díptero puede estar presente también en otros dípteros, lo que ampliaría el abanico de opciones que podrían ser utilizadas en diversos ambientes.

## 4. Objetivos

### Generales:

- Determinar la actividad teratogénica, causada por la griseofulvina (GF) y colchicina (CO) (teratógenos de referencia) en *Megaselia scalaris*
- Obtener evidencias de la utilidad de la prueba de teratogénesis realizada en *M. scalaris* para identificar los efectos de actividad genotóxica durante el desarrollo larvario.

### Particulares:

- Identificar los biomarcadores de respuesta a la actividad teratogénica en *M. scalaris*
- Proponer a *Megaselia scalaris* como un biomonitor de efecto, alternativo a *D. melanogaster*.

## 5. Hipótesis

Con base en la alta conservación de los genes que disparan la formación de los diversos patrones corporales a lo largo del desarrollo en los diferentes grupos de animales, se espera que los organismos de *M. scalaris* al ser expuestos a compuestos con actividad genotóxica probada (teratogénesis) muestren biomarcadores similares a los descritos para *D. melanogaster*, *D. hydei* y *D. virilis* (Arellano-Aguilar, 1995; Muñoz, 1997; Bautista, 2005), mostrando así una sensibilidad característica de los biomonitores y aportando evidencia de la alta conservación de las cascadas de expresión génica para la formación de estructuras corporales.

De igual forma, mediante el indicador de efecto, el Índice de Supervivencia (IS) se comparará el efecto de los agentes seleccionados a concentraciones sub-letales con el organismo de referencia, *D. melanogaster*.