

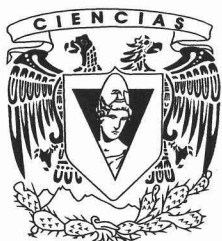


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Comparación de la respuesta teratogénica  
en tres especies del Género *Drosophila*

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:  
DORIAN ANTONIO BAUTISTA HERNÁNDEZ



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM



DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA RAMOS MORALES

2005

0349674



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Comparación de la respuesta teratogénica en tres especies del Género Drosophila".

realizado por BAUTISTA HERNANDEZ DORIAN ANTONIO

con número de cuenta 09814242-6 , quien cubrió los créditos de la carrera de: **BIOLOGIA**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
 Propietario Dra. Patricia Ramos Morales

Propietario Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Propietario M. en C. Adriana Muñoz Hernández

Suplente Dra. Cristina Cramer Hemkes

Suplente Dra. Patricia Guevara Fefer

Consejo Departamental de **BIOLOGIA**

M. en C. Juan Manuel Rodríguez-Chávez

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS**



**UNIDAD DE ENSEÑANZA  
 DE BIOLOGIA**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi directora de tesis Dra. Patricia Ramos por haberme guiado y convertirse en parte importante en mi formación académica, a mis sinodales por sus valiosas observaciones.

A todos los maestros del laboratorio, M. en C. Adriana Muñoz por la paciencia y tolerancia, al M. en C. Armando Muñoz por los consejos y parrilladas hechas, al Biol. José de Jesús Bazán por sus contribuciones, al Biól. Omar Arellano por sus consejos y demás personal que contribuye a las actividades del laboratorio Hugo, Blanca, Maju.

A todos los compañeros del taller, con los que conformamos un buen ambiente en el laboratorio, espero que esto sea el inicio de varias tesis más. A los cuates de la carrera el Fede, el Uli, el Hugo y el Josu (alias las cabronas) con los que pasamos muchas aventuras.

A mi padre Francisco Bautista Zúñiga, por su apoyo económico, moral y por ser un gran ejemplo de vida, creo que juntos hemos aprendido muchas cosas, a Carmen y Paco por su aprecio.

A toda la familia Bautista, donde quiera que se encuentren, en los Ángeles, San Miguel, Mérida y el DF, todos mis tíos y primos, mi abuelita en el cielo y al abuelo siempre fuerte, por el cariño y ejemplo. Mi tía Yolanda y mi tío-hermano Edgar por las palabras de aliento y el aprecio.

A toda la familia Hernández por su apoyo y el ejemplo dado, a mis tías y tíos, a todos mis primos, a mi abuelita en el cielo y a mi abuelo hasta las montañas, quienes me han ayudado mucho.

A la más grande y hermosa Universidad de esta vida, la UNAM por ser un canal importante y único para mi desarrollo personal. 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

A Paulina por su amor y apoyo, en todos los momentos.

A mi Mamá Sonia Ivonne Hernández Hernández, este logro es tuyo, yo soy solamente la vía. Te mereces todo lo mejor, esto es el inicio de muchas cosas buenas para los dos.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Dorian Antonio  
Bautista Hernández

FECHA: 08 de noviembre del 2009

FIRMA: [Firma manuscrita]

# ÍNDICE

	Pág.
<b>RESUMEN</b> .....	4
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	5
1.2 Monitoreo Ambiental.....	5
1.3 Biomonitores y Biomarcadores.....	6
1.31 Biomonitores centinelas de posible actividad genotóxica.....	8
1.4 Dípteros.....	10
1.5 Conservación del patrón general del desarrollo.....	11
1.7 <i>Drosophila melanogaster</i> como Biomonitor.....	16
1.8 Prueba de teratogénesis <i>in vivo</i> de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	17
1.9 Colchicina.....	20
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b> .....	23
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	24
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	24
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	25
<b>VI. RESULTADOS</b> .....	32
<b>VII. DISCUSIÓN</b> .....	33
<b>VIII. CONCLUSIONES</b> .....	52
<b>IX. REFERENCIAS</b> .....	61

## RESUMEN

En este trabajo se comparó el efecto de la exposición a un teratógeno de referencia (colchicina) en tres especies de dípteros del género *Drosophila*: *D. virilis*, *D. hydei* y *D. melanogaster* (Drosophilidae), para evaluar su uso como indicadores *in vivo* de daño teratogénico. Se usaron 14 concentraciones obtenidas por diluciones sucesivas a partir de la mayor concentración probada (0.125, 0.0625, 0.0325, 0.0156, 0.0078, 0.0039, 0.0019, 0.00097, 0.00048, 0.00024, 0.00012, 0.00006, 0.00003 mM); como disolvente y testigo negativo se usó agua destilada. El tratamiento se administró por alimentación-contacto a larvas de  $72 \pm 4$  h para *D. melanogaster* y  $96 \pm 4$  h para *D. hydei* y *D. virilis*.

De acuerdo a su susceptibilidad, las especies respondieron de esta manera; de mayor a menor grado: *D. hydei* > *D. virilis* > *D. melanogaster*, en las dos últimas, la  $LC_{50}$  es muy similar y no mostró diferencias significativas en el Índice de Supervivencia (IS) recobrado ( $p > 0.05$ ). Los marcadores para cada región corporal en las tres especies fueron recurrentes, aunque se presentaron con una frecuencia diferente entre éstas. Entre los factores que pudieron influir en la respuesta de cada especie están: la sensibilidad a las condiciones iniciales de exposición, en particular la edad de las larvas y una actividad diferencial de desintoxicación.

Se concluye que los principios básicos del desarrollo animal permiten utilizar diversos organismos para el biomonitoreo, ampliando las expectativas para alcanzar metodologías aplicables al monitoreo *in situ*.

# INTRODUCCIÓN

## Monitoreo ambiental

El monitoreo ambiental del agua basado en el análisis de sus contenidos y parámetros físicoquímicos, ha aportado información del tipo de sustancias presentes en diversos cuerpos de agua, así como del rango de concentraciones en el que se presentan. El cambio significativo en los parámetros reportados como característicos de ambientes acuáticos particulares como ríos, lagunas y lagos, entre otros, sirve de base para detectar la perturbación ambiental provocada por la presencia de agentes contaminantes. Sin embargo, la determinación de la lista de contaminantes presentes en el agua resulta limitada para predecir el impacto de su presencia hacia los seres vivos, ya que la determinación de los contaminantes individuales no aporta información de las interacciones que se presentan entre éstos, así como con otros factores del ambiente como la temperatura, el pH y otros (Butterworth *et al.*, 2000).

La determinación del porcentaje de organismos que mueren al exponerse a una muestra ambiental es un indicador objetivo de su toxicidad y permite establecer comparaciones entre diferentes muestras de agua, pero no es informativo de su efecto en los organismos sobrevivientes. Por ejemplo, si la exposición afecta selectivamente a ciertos organismos con atributos en común (sexo, edad o genotipo), a órganos particulares (hígado, piel, riñón), a funciones básicas como la reproducción o inclusive, si el o los agentes contaminantes son capaces de dañar a los organismos expuestos o a sus descendientes, por un efecto de tipo transgeneracional (Ramos-Morales *et al.*, 2000).

Una estrategia alternativa en el estudio de la calidad del ambiente es el uso de bioindicadores, biomarcadores y biosensores a través de los cuales, los cambios

en los parámetros poblacionales característicos son utilizados en la vigilancia de los ecosistemas (terrestre, acuático y aéreo) (Butterworth *et al.*, 2000).

En el monitoreo, el uso de organismos en el ambiente alerta directamente de los cambios provocados por la presencia de agentes genotóxicos, sin embargo, es un hecho que los organismos se encuentran asociados a ambientes específicos, por ejemplo, en el estado de Minesota en USA, alrededor de 1993 se alertó de la presencia de diversas malformaciones en las extremidades en las ranas, posteriormente este efecto se reportó también en sapos y salamandras en los lagos de este estado y sus alrededores. En apariencia, el agente causante de las alteraciones se encontraba asociado con los cuerpos acuáticos y, a partir de entonces se desarrollaron gran cantidad de investigaciones para tratar de esclarecer la razón de dichas alteraciones, sin alcanzar, hasta la fecha, resultados contundentes. No se encontró información complementaria a partir de las fases terrestre o aérea (Bruner *et al.*, 1998).

### **Biomonitores y Biomarcadores**

Generalmente, un **biomonitor** es un sistema basado en el análisis de cambios en el comportamiento característico de organismos completos en respuesta a variaciones ambientales que son cuantificables a través de parámetros como: viabilidad, metabolismo, conducta, ubicación geográfica y daño genético, entre otras causas. El análisis del efecto puede realizarse con base en aspectos específicos derivados de subsistemas de un organismo, biomarcadores, como: niveles de expresión de proteínas como glutatión, metalotioneínas, alcohol deshidrogenasa y muchas otras. Finalmente, un biosensor es un sistema biológico



en el que se asocia la detección ó respuesta de la exposición con una manifestación química o física (Butterworth *et al.*, 2000).

Los biomonitores y biomarcadores ambientales, también llamados marcadores biológicos, constituyen herramientas valiosas en la ecotoxicología, para evaluar el riesgo y el grado de daño provocado en los organismos por la acción de agentes contaminantes. Un parámetro importante del diagnóstico es la respuesta de los organismos más sensibles que alertan acerca del riesgo que implica la exposición a ciertos contaminantes antes de que los efectos de la contaminación se extiendan al resto de los organismos de las poblaciones bajo riesgo: esta señal permite establecer medidas de prevención (Evenden y Deplege, 1997).

Los marcadores biológicos son variados y se suelen clasificar por el tipo de marcador: de Efecto ó Exposición. Por el nivel de organización, como específicos, en los niveles más básicos de organización (órganos a moléculas) y no específicos como análisis fisiológicos, conductuales y ecológicos (organismos completos a ecosistemas) (Arellano, 2002).

Varios parámetros bioquímicos, fisiológicos y genotóxicos han sido usados como biomarcadores de la salud del ecosistema. El futuro papel de los biomarcadores deberá ser la determinación precisa de los efectos biológicos en los organismos expuestos; los procedimientos basados en una sola prueba no son apropiados para todas las circunstancias. Una batería de pruebas podría abarcar más eficientemente los requerimientos de análisis para circunstancias reales, generalmente más complejas (Bolognesi *et al.*, 1999).

## **Biomonitores centinelas utilizados en la evaluación de posible actividad genotóxica**

Se ha definido a la **Ecotoxicología genética** como "el estudio de los cambios inducidos por químicos o radiación en el material genético de la biota natural. Cambios que pueden ser alteraciones directas en genes y expresión genética o tener efectos selectivos de la frecuencia génica" (Kleinjans y Van Schooten, 2001). Una de las formas más directas en el monitoreo es recurrir a los sistemas biológicos ya presentes en el ambiente, llamados organismos centinelas (Butterworth *et al.*, 2000).

Para estudiar los efectos de la exposición a genotoxinas ambientales en las especies de vida silvestre, se ha implementado el uso de marcadores como los derivados, entre otros, de protocolos de evaluación de riesgo de cáncer en humanos y que comprenden la identificación de modificaciones químicas del ADN (mutación), detección de aductos del ADN, marcadores de efectos citogenéticos como aberraciones cromosómicas y micronúcleos.

El análisis de marcadores de efectos genotóxicos en células somáticas y germinales pueden elucidar si la presencia de mutágenos en el ambiente ha tenido un impacto en la biodiversidad y en la oportunidad de sobrevivencia, debido a la inducción de cambios en las frecuencias alélicas de la población, y/o seleccionando loci, críticos para la sobrevivencia a altos niveles de contaminación ambiental; la información derivada de esta práctica ha contribuido significativamente a la evaluación del riesgo de impacto ecológico (Kleinjans y Van Schooten, 2001).

De esta manera se pueden señalar tres modalidades de aplicación de estrategias experimentales: modelos de laboratorio con condiciones controladas en las que la muestra problema se transporta al laboratorio para ser analizada con modelos calibrados ahí mismo; aquellas en las que el modelo biológico es llevado al sitio de emisión y después de una exposición de cierta duración, los organismos expuestos son regresados al laboratorio para su análisis y; en una tercera categoría se encuentran aquellas que utilizan biomarcadores *in situ* que son llevados al laboratorio para su identificación o análisis. La operatividad de las dos últimas depende de la compatibilidad del modelo a utilizar y del ambiente a evaluar, por ejemplo peces de agua dulce para establecer el impacto de un derrame de petróleo en una plataforma marina; o bien, la distribución geográfica de la especie a utilizar (en algunas regiones puede no existir la especie seleccionada como modelo experimental).

Es en este último aspecto que no existe un biomonitor *in situ* de efecto que indique actividad genotóxica en organismos nativos que sea informativo de perturbación sin necesidad de llevarlo al laboratorio. Comúnmente nos enfrentamos al problema de que un solo organismo resulta poco o no representativo de algún hábitat en particular, debido principalmente a aspectos como: adaptación, distribución, ciclo de vida, metabolismo y otros. Un factor fundamental para optimizar la inversión en tiempo y recursos en el biomonitoreo, es estudiar a los organismos que están participando de lleno en la cadena trófica del lugar y de éstos, utilizar a aquellos que puedan ser identificados rápidamente y sin ambigüedad.

Los avances en el conocimiento de la formación de patrón y la regulación del desarrollo de los organismos han evidenciado la conservación de principios

básicos que sustentan la validez del uso de organismos que pertenecen a niveles de organización similares para el estudio del impacto ambiental. Por su amplia distribución, los insectos pueden ser utilizados como organismos centinelas del ambiente.

## **Dípteros**

Los insectos son los organismos más diversos y dispersos del Reino Animal. Entre éstos, los pertenecientes a los órdenes Neuroptera, Meleoptera, Raphidioidea, Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, son considerados los más abundantes y diversos, además de mostrar un desarrollo holometábolo, es decir, llevan a cabo metamorfosis completa. Los dípteros, además de reunir una gran cantidad de especies, tienen una distribución cosmopolita.

De manera general, en el ciclo de vida de un holometábolo, la etapa juvenil que eclosiona del huevo es una larva, la cual pasa por una serie de mudas, que permiten el crecimiento, con pequeños cambios morfológicos en apéndices bucales y estigmas. La última muda metamórfica es utilizada para la formación de la pupa. Durante esta etapa el organismo no ingiere alimento, su energía proviene de los cuerpos grasos almacenados en el cuerpo de la larva y de la lisis del tejido larvario. Durante este periodo se diferencian las estructuras del adulto, que reemplazan a las de la larva (Gilbert, 2000). Los primordios celulares que darán origen a las estructuras del adulto, al salir del huevo, son de apenas unas 30-40 células (Martinez y Stewart, 2002; García-Bellido y Merriam, 1971a) y cada una se encuentra formando un saco de células que prolifera continuamente durante toda la fase larvaria para su posterior diferenciación en la pupa.

La mayoría de las larvas de los Díptera suelen desarrollarse en medios acuosos, lo cual es muy importante para su uso como bioindicadores centinelas.

Diptera es el tercer orden más grande de los insectos, que incluye entre las familias cosmopolitas a la familia Drosophilidae, de la cual el 56% de sus especies pertenecen al género *Drosophila*; algunas especies de este género han sido ampliamente estudiadas en diversos aspectos (herencia, especiación, sistemática, biología del desarrollo, toxicología, etc) (Wheeler, 1981).

### **Conservación del patrón básico del desarrollo**

En el reino animal, se conservan aproximadamente el mismo número de genes centrales –alrededor de 12 000- que codifican a los componentes de las rutas bioquímicas básicas y las funciones celulares compartidas evolutivamente (Martínez y Stewart, 2002). Desde los años 70's se ha reunido evidencia experimental de que muchos de los productos de la diferenciación celular especializada como las hemoglobinas, insulinas, hormonas esteroides y otras, se comparten ampliamente entre los metazoarios (Duboule y Wilkins, 1998).

Los constantes avances en la genética y en la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la expresión de los genes que regulan el desarrollo de los organismos, han comprobado la conservación de programas genéticos en los seres vivos pertenecientes a diferentes niveles de complejidad en los cuales, no solo la secuencia de los genes involucrados es muy similar, sino también el tiempo en el que éstos se expresan y las funciones para las que codifican, constituyendo así una red de genes y proteínas que operan en el interior de las células y en la comunicación entre éstas. Los programas están escritos en regiones reguladoras

del genoma y determinan la secuencia del patrón de la expresión genética característica de cada organismo. La maquinaria molecular que lo interpreta está, asimismo, determinada por estos programas. Hay un despliegue progresivo asociado con los diferentes niveles de complejidad y organización (Eizinger, *et al* 1999; Martínez y Stewart 2002). Estas redes de proteínas funcionan en la emisión, recepción y transducción de señales químicas, mientras que otras actúan como blancos y efectores para esas señales (Chouard y Yaniv, 1981). Los mecanismos de regulación y sus moléculas clave permanecen ampliamente constantes entre los metazoarios (maquinaria molecular, reguladores transcripcionales y sistemas de transducción de señales) (Duboule y Wilkins, 1998).

La naturaleza universal de estos mecanismos y redes moleculares, implica un aspecto fundamental de unidad molecular, según el cual todos los organismos tienen un conjunto similar de proteínas altamente conservadas que pueden ser organizadas en clases. Estas proteínas son capaces de procesar la información y actuar como elementos de un microprocesador. Las diferencias entre los organismos recaen en los programas, en la secuencia de expresión genética característica de cada organismo y en cómo se organiza su desarrollo en espacio y tiempo. Los mismos eventos de señalización pueden producir diferentes resultados dependiendo del contexto, por ejemplo si se trata de hembra o macho (Martínez y Stewart, 2002).

En gran medida la diversificación evolutiva del desarrollo parece haber fluido de una utilización diferencial de los mismos genes en diferentes patrones de expresión, ya sea en tiempo y espacio. En los eucariontes existen familias génicas, producidas por series de duplicaciones de la secuencia de ADN, algo que parece haberse promovido durante la evolución, creándose con esto nuevas

capacidades en la mezcla de funciones de los mismos componentes. El hecho de que los productos génicos sean aparentemente empleados en más de una ocasión y afectando diferentes sitios durante el desarrollo de los organismos, parece ser la regla (Doboule y Wilkins, 1998, Eizinger, *et al.*, 1999).

Además, muchos de los sistemas moleculares conservados tienen funciones similares en la formación del patrón y organogénesis en los animales, que tienen claramente sistemas de desarrollo diferentes y una morfología cuando adulto, también diferente (Duboule y Wilkins, 1998). Un grupo de genes relacionados entre sí, los llamados genes **Hom** en invertebrados y los genes **Hox** en vertebrados, dirigen aspectos similares del diseño corporal en todos los embriones animales.

Como se ha demostrado con *Drosophila melanogaster* y se ha confirmado en otros organismos como peces, aves, mamíferos y nematodos la función normal de los genes homeóticos es conferir a las células identidades espaciales (o posicionales) específicas. Estas identidades tienen sentido solo en tiempo y espacios particulares, de manera que las coordenadas espaciales asignadas por los genes homeóticos se interpretan de diversa forma en distintos momentos del desarrollo embrionario temprano (Mc Ginnis y Kuziora, 1994).

El orden lineal que presentan los genes en el cromosoma, corresponde exactamente con el orden de las regiones corporales que dichos genes especifican a lo largo del eje anteroposterior del embrión. La mosca del vinagre y otros invertebrados siguen un desarrollo muy diferente, pero en los primeros estadios comparten con los vertebrados un patrón de expresión común de los genes homeóticos. Tal descubrimiento revela que, pese a diferencias en el

aspecto final de los animales, éstos usan genes estrechamente emparentados para especificar partes del cuerpo a lo largo del eje anteroposterior.

Estos genes son miembros de la familia génica con secuencia homeótica. Esta caja homeoética, es una secuencia de ADN que contiene las instrucciones para la síntesis de un grupo emparentado de homeodominios, regiones protéicas de 60 aminoácidos aproximadamente. Este grupo de proteínas se unen al ADN en las zonas reguladoras de los genes. La combinación apropiada de estas proteínas enlazadas a un elemento regulador del ADN señalará la actividad o la represión de un gen. Parece probable que las proteínas HOM designen diversas posiciones a lo largo del eje anteroposterior, regulando la expresión de lo que quizá sean grandes grupos de genes subordinados (genes blancos). Esta estrategia reguladora ha sido conservada durante la evolución animal y adaptada a contextos de desarrollo muy diferentes (Denell *et al.*, 1996; Mc Ginnis y Kuziora, 1994; White *et al*, 2000).

Buena parte de la especificidad funcional de las proteínas HOM (aunque no toda), reside en las pequeñas diferencias existentes dentro del homeodominio o en regiones adyacentes. En los mamíferos, los genes **Hox** se agrupan en cuatro grandes complejos localizados en diferentes cromosomas. En cuanto a su organización y sus patrones de expresión embrionaria, los genes de los complejos **Hox** comparten un asombroso parecido con los genes del complejo **Hom** de *Drosophila melanogaster* (Mc Ginnis y Kuziora, 1994). En la siguiente figura se presentan los complejos homeóticos de *Drosophila melanogaster* y ratón, así como las homologías entre estos.



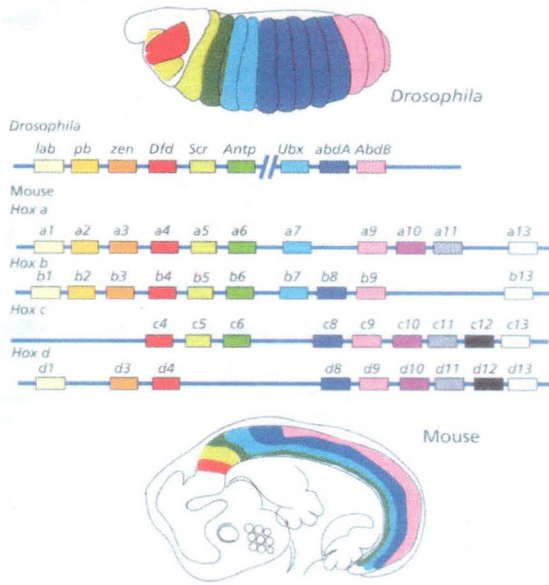


Fig. 1 Complejos homeóticos homólogos en *Drosophila melanogaster* y ratón (Martinez y Stewart, 2002).

Se ha propuesto que cambios en la expresión de los genes Hox han acompañado la diversidad morfológica de los insectos (Warren y Carroll, 1995). En la información disponible para otras especies de *Drosophila* se sugiere que la mayoría de las características de *Drosophila melanogaster* son típicas del género en general, con respecto a los eventos principales del desarrollo (Denell *et al.*, 1996, Sathe y Harte 1995; Lynch y Desplan 2003; Tillib *et al.*, 1995). Por lo que podríamos suponer que este patrón de desarrollo general descrito para *Drosophila melanogaster* puede ser considerado muy similar al que regula el desarrollo en otras especies de este género.

De esta manera, las evidencias señalan que en el reino animal se conservan los aspectos básicos involucrados en la formación de un organismo, lo que apoya el uso de modelos biológicos con diferente nivel de complejidad en el estudio de los principios del desarrollo, así como para identificar a factores químicos, físicos o

biológicos con la capacidad de interferir en la cascada de expresión génica (teratógenos).

En la actualidad se ha enfatizado la importancia de explotar las ventajas que modelos biológicos no mamíferos pueden tener para el estudio de las bases celulares y moleculares de toxicidad, con resultados que podrían sugerir un impacto similar para el ser humano (Ballatori y Villalobos, 2002).

### ***Drosophila melanogaster* como biomonitor**

La mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* es uno de los organismos eucariontes más estudiados en la biología. En lo que respecta a la genética toxicológica se han calibrado en laboratorio pruebas para determinar el efecto de diversas genotoxinas en células somáticas y germinales (Ramos-Morales *et al.*, 2000). Además, se han calibrado metodologías usando a *Drosophila melanogaster* como modelo de actividad teratógena (Lynch *et al.*, 1991; Muñoz-Hernández *et al.*, 2003). Diferentes aspectos genéticos pueden ser explorados a través de metodologías particulares como la inducción de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo, pérdida parcial y total de cromosomas sexuales, translocaciones cromosómicas, perturbación en la maquinaria del huso, e integridad cromosómica en células germinales; pero también mutación, deleción, intercambio cromosómico y no disyunción en células somáticas. (Ramos-Morales *et al.*, 2000).

*Drosophila melanogaster* tiene una organización eucariótica; el costo de su mantenimiento es moderado y requiere espacios reducidos; comparada con otros organismos de laboratorio tienen un ciclo de vida corto (10 días a 25°C con 60% de humedad) y en cada generación produce numerosa progenie. *Drosophila melanogaster* posee actividad metabólica dependiente de diversos sistemas

enzimáticos, de éstos, la actividad de las enzimas dependientes del sistema de citocromos P450 es muy similar a la mostrada por la fracción enzimática S-9 del hígado de mamíferos (Feyereisen, 1999), por lo que es capaz de transformar una gran variedad de xenobióticos, característica por la que es considerada un valioso modelo *in vivo* para evaluar compuestos con actividad genotóxica.

*Drosophila melanogaster* es sensible a la exposición a tóxicos administrados por diferentes rutas de exposición, la vía alimentación-contacto es la más común, pero también pueden emplearse las rutas de inhalación e inyección. Otra ventaja de este modelo biológico es que la extensión del ciclo de vida hace posible comparar el efecto de la exposición: aguda (<8h), semicrónico, crónica (todo el ciclo de vida), habiendo la posibilidad de combinar protocolos, lo que permite una gran versatilidad en cuanto al protocolo deseado (Vogel 1988, Ramos-Morales *et al.*, 2000).

Numerosos tipos de químicos particulares, mezclas complejas y otros factores ambientales como las radiaciones han sido estudiados para determinar su potencial mutagénico en *Drosophila melanogaster*. La concordancia entre los resultados obtenidos con este modelo biológico y aquellos obtenidos a partir de sistemas bacterianos, ratones, plantas y células en cultivo, soportan que *Drosophila melanogaster* es un sistema *in vivo* confiable para estudios de mutagenicidad (Ramos-Morales *et al.*, 2000).

### **Prueba de teratogénesis *in vivo* de *Drosophila melanogaster* (DTT)**

Un teratógeno actúa preferentemente durante la organogénesis, en las células de los tejidos en desarrollo, provocando alteraciones que se expresan como

malformaciones congénitas las cuales, aunque no son heredables, alteran el desarrollo de los organismos, llegando incluso a ser letales (WHO, 1984).

La prueba de teratogénesis en *Drosophila melanogaster*, es una metodología sensible a diferentes tipos de genotóxicos, es de corta duración y tiene bajo costo. Se basa en exponer vía alimentación-contacto a larvas de tercer estadio (en esta edad, la larva alcanza la máxima expresión de su actividad metabólica) al compuesto, de manera que la incorporación del posible genotóxico interfiera con la cascada de expresión génica que regula el proceso de desarrollo (metamorfosis) del adulto, en el que se evalúa la variable de respuesta. Debido a que las larvas son expuestas sólo en el último tercio de la fase larvaria, las malformaciones recobradas en las moscas adultas no pueden asociarse con cambios en el ADN, sino con la interferencia en la expresión de los genes en un patrón relacionado con el tiempo de diferenciación de los discos imagales que durante la metamorfosis formarán: ojos, alas, patas, placas anal y genital; o con la alteración en el control de la simetría bilateral, retraso en el desarrollo, y otros más. La interferencia en la cascada de expresión conduce a la aparición de organismos que muestran alteraciones morfológicas asociadas con genes mutantes, por ejemplo, el tamaño reducido de los ojos, sin embargo, genéticamente las moscas que muestran estas malformaciones no llevan en su genotipo mutaciones asociadas con éstas.

En 1991, Lynch et al., propusieron utilizar a *Drosophila melanogaster* como modelo para evaluar teratógenos. Mediante la exposición de larvas a agentes inductores de malformaciones, cuantificaron las alteraciones morfológicas inducidas en el adulto, las cuales consistieron en la modificación en la forma del ojo, de redondo a lobulado y la reducción en su tamaño; la presencia de sedas humerales tipo

“bent”, alteración en la que las sedas humerales, normalmente rectas y en número de 2, se doblan en un ángulo de 45° y pueden aparecer 1 o 3 de éstas; abdomen con terguitos colapsados y/o faltantes, alas tipo “Notch”, en las que se aprecia una o varias muescas en el borde de las alas, de manera similar a las producidas por el gen *Beadex-Serrate (Bd<sup>S</sup>)*, alteraciones en el número de segmentos en el cuerpo, ausencia de 1 o las 2 alas o los halterios y otras más, concluyendo que sólo la frecuencia de aparición de las sedas tipo “bent” y las alas tipo “Notch” se encuentra asociada con la concentración del teratógeno utilizada.

Muñoz et al., (2003), encontraron en moscas expuestas durante el estadio larvario, un intervalo de actividad a concentraciones bajas y una fracción de los organismos particularmente sensibles, además de otras variables de respuesta,. Esta respuesta mostró ser órgano blanco específico, dependiendo del compuesto utilizado.

Con relación al uso de vertebrados, las pruebas de laboratorio más usadas son en embriones de rana FETAX (Dumont *et al.*, 1983; Bruner *et al.*, 1998) y en embriones de pez zebra (Hallare *et al.*, 2005) han mostrado tener sensibilidad a las presencia de muestras ambientales, aunque confiables estas metodologías son más costosas y complicadas. En relación al uso de otros peces como *Fundulus heteroclitus*, hay resultados de aparente insensibilidad a concentraciones altas de teratógenos (Boudreau, *et al* 2005).

Entre los diferentes compuestos que se han reportado con actividad teratogénica en diferentes organismos, se encuentra la colchicina.

-

## Colchicina (CO)

La CO es un derivado tropolone, con tres anillos; un anillo aromático (A) con tres grupos metoxy, un anillo de siete carbonos (B) con un grupo amino sustituido, y otro anillo tropolone (C) de siete carbonos con un grupo oxígeno y un grupo metoxy. La estructura tridimensional de la molécula muestra el anillo planar A, y un anillo enrollado B, hay tres grupos metoxidos en el anillo A: podofilotoxina, el cual se sabe llega a unirse al mismo sitio de la molécula de tubulina (Ávila, 1990).

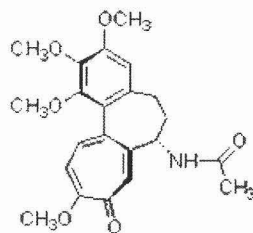


Fig. 2 Estructura química de la colchicina.

Se sabe que su blanco principal en la célula son los microtúbulos (MTs). Las células más susceptibles a CO, son las células en división, debido probablemente a condición dinámica de los MTs y condiciones de permeabilidad (Ávila 1990).

Se ha estudiado ampliamente los aspectos bioquímicos de la interacción de la CO con los MTs, se sabe que su acción se relaciona a los extremos finales de los filamentos, uniéndose a la tubulina, en una reacción que lleva varias fases (Andreu *et al.*, 1991), que con lleva a la formación de un complejo tubulina-colchicina que actúa sobre la dinámica de los MTs afectando la polimerización y despolimerización de la tubulina (Skoufias y Wilson, 1992).

El proceso de desintoxicación que sufre en el organismo es vía desmetilación, sus metabolitos principales detectados en humanos son 2-desmetilcolchicina y 3-desmetilcolchicina. La droga parental y sus metabolitos son eliminados por excreción biliar y en menos medida por excreción urinaria (Dvorak *et al.*, 2002).

La isoforma 3A4 de Citocromo P450 ha sido identificada como la principal enzima involucrada en la biotransformación de la colchicina en humanos (Tateishi et al., 1997).

Se han desarrollado diferentes metodologías *in vivo* e *in vitro* para detectar el daño final en las células de mamíferos. En cuanto a su actividad, en células germinales de ratón se ha reportado alteración de la segregación cromosómica, causando aneuploidías (hiperploidias) en espermatoцитos; la inducción de arresto meiótico dependiente de la concentración, que conduce a la inducción de aneuploidías (Leopardi et al., 1993) y es un inductor débil de micronúcleos (MN), que en su mayoría contienen cromosomas completos (Kallio et al., 1995). También daña al complejo sinaptonémico, principalmente durante la profase meiótica temprana; aunque parte de las células con daño son eliminadas, algunas (probablemente con lesiones menores) progresan hasta el fin del paquiteno, siendo una fuente potencial de aneuploidias (Tepperberg et al., 1997).

En células somáticas se reportan la inducción de hiperplodia, poliploidia, micronúcleos (Leopardo et al., 1993; Lynch y Parry, 1993). Se considera que la no-disyunción es el daño prevaleciente, que involucra células principalmente con un ligero nivel de daño en el huso y que no produce efectos detrimentales sobre el ciclo celular, a bajas concentraciones de venenos del huso. (Zijno et al., 1996). Hay inducción de mitosis-c completas que se relaciona siempre a un arresto mitótico fuerte y con la inducción de poliploides (Sbrana et al., 1993).

En 1980, Yamamoto y Kikuchi demostraron que los MN inducidos por clastógenos son generalmente más pequeños que aquellos inducidos por venenos del huso (Ferguson et al., 1993). Los MN causados por la CO contienen cromosomas completos y no muestra ser un inductor potente de muerte celular. Se piensa que

después del tratamiento con CO la dinámica de los MTs podría ser capaz de recuperarse con el tiempo para evitar un arresto fatal, estudios indican que el complejo tubulina-colchicina reduce el rango de adición de tubulina pero no inactiva completamente el extremo (Kallio *et al*, 1995).

Existen algunas evidencias de una acción de la CO sobre los ácidos nucleicos. (Ávila 1990). Además se reportan efectos en la síntesis de RNA y DNA, biosíntesis de lípidos, metabolismo de nucleótidos cíclicos, metabolismo del glutatión y ATPasa transporte de  $Ca^{2+}$  dependiente de calmodulina (Jordan *et al*, 1985).

Como los microtúbulos juegan diversos papeles en varias funciones celulares, no siempre es fácil saber que efecto es mediado vía cambios en los microtúbulos. Recientemente entre estos efectos se han reportado: La redistribución o degradación de los receptores de membrana nuclear (Nishigaki *et al.*, 1998; Dvorak *et al*, 2005), actividad de flujo de iones de la mitocondria (Evtodienko *et al*, 1996), actividad enzimática, la liberación de productos de secreción (Thiébot *et al.*, 1999), además de provocar efectos en las rutas de señalización MAPK (Stone y Chambers, 2000).

En cuanto a sus efectos en otros organismos se reportan la inducción poliploidia en plantas, formación de tumores en raíces, alteraciones en el patrón regular hexagonal de la formación de la pared celular vegetal en el alga *Hydrodictyon*, así como en la formación de los estomas, es un veneno que actúa a nivel de sistema nervioso, varios efectos sobre la secreción hormonal han sido observados y malformaciones en embriones. (Ávila 1990).

Sieber *et al* (1978) recobro utilizando ratones hembra tratadas con CO antes de la gestación, malformaciones craneanas en la progenie incluyendo exencefalia, hidrocefalia, anoftalmia y microtia, además de malformaciones esqueléticas.



Muñoz en 1997 observó que en tratamientos a diferentes tiempos de exposición, con compuestos con actividad aneuploidogénica, incluyendo a la CO, se recobraban organismos con malformaciones en cabeza, ojos, apéndices bucales, tórax y abdomen. Estos datos confirman adicionalmente que *Drosophila melanogaster* sí es capaz de detectar aneuploidógenos y que estas sustancias son, además, fuertes teratógenos para la mosca, obteniendo como principal biomarcador en el desarrollo de los organismos una muesca en las alas.

## II. JUSTIFICACIÓN

Si las diferencias entre los organismos responde a programas de expresión genética característicos en tiempo y espacio, ¿resulta válido extrapolar los resultados obtenidos a partir de organismos como *Drosophila melanogaster* a otros de diferentes niveles de organización? Una estrategia para validar el uso de modelos alternativos como *Drosophila*, es determinar si presenta sitios de respuesta específicos para cierto tipo de compuestos y si éstos están presentes en organismos emparentados filogenéticamente. Por esta razón en este trabajo se seleccionó un representante de los dos principales grupos de especies del género *Drosophila*: *D. hydei* (grupo Repleta) y *D. virilis* (grupo Virilis), además de *Drosophila melanogaster*, a manera de referencia.

Muñoz en 1997 observó que en tratamientos a diferentes tiempos de exposición, con compuestos con actividad aneuploidogénica, incluyendo a la CO, se recobraban organismos con malformaciones en cabeza, ojos, apéndices bucales, tórax y abdomen. Estos datos confirman adicionalmente que *Drosophila melanogaster* sí es capaz de detectar aneuploidógenos y que estas sustancias son, además, fuertes teratógenos para la mosca, obteniendo como principal biomarcador en el desarrollo de los organismos una muesca en las alas.

## II. JUSTIFICACIÓN

Si las diferencias entre los organismos responde a programas de expresión genética característicos en tiempo y espacio, ¿resulta válido extrapolar los resultados obtenidos a partir de organismos como *Drosophila melanogaster* a otros de diferentes niveles de organización? Una estrategia para validar el uso de modelos alternativos como *Drosophila*, es determinar si presenta sitios de respuesta específicos para cierto tipo de compuestos y si éstos están presentes en organismos emparentados filogenéticamente. Por esta razón en este trabajo se seleccionó un representante de los dos principales grupos de especies del género *Drosophila*: *D. hydei* (grupo Repleta) y *D. virilis* (grupo Virilis), además de *Drosophila melanogaster*, a manera de referencia.

### III. OBJETIVOS

#### Generales

-Comparar la respuesta de tres especies de dípteros del género *Drosophila*: *D. virilis*, *D. hydei* y *D. melanogaster* (Drosophilidae) como indicadores *in vivo* de daño teratogénico a través del suministro de Co.

#### Particulares

-Establecer la sensibilidad y respuesta de dos sistemas alternativos *in vivo* (*Drosophila hydei*, *Drosophila virilis*) como modelos para la detección de compuestos teratógenos.

### IV. HIPÓTESIS

Los genes que participan en la organización del plano corporal de los organismos y su regulación génica se han conservado evolutivamente, aún en organismos con diferentes niveles de organización, encontrándose mayor similitud en los organismos cercanos filogenéticamente, por lo que al exponer larvas de dos especies de *Drosophila*: *D. virilis* y *D. hydei*, a un agente (colchicina) que interfiere con el desarrollo en *D. melanogaster*, la frecuencia y/o tipo de alteraciones en el desarrollo de estas especies será similar al observado en *D. melanogaster*.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas

#### Clasificación taxonómica

Las moscas de las especies de *Drosophila* utilizadas en este trabajo fueron proporcionadas por el Banco de Moscas de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Se confirmaron los caracteres taxonómicos distintivos de cada especie mediante la clave (Patterson, 1943).

Reino: Metazoa

Phylum: Artropoda

Superclase: Hexapoda

Clase: Insecta

Subclase: Neoptera

Infraclase: Endopterygota

Orden: Diptera

Suborden: Brachycera

Infraorden: Muscomorpha  
Schizophora -Acalytratae

Superfamilia: Ephydroidea

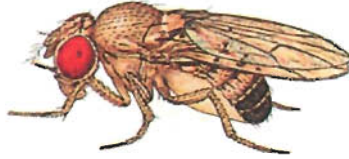
Familia: Drosophilidae      Subfamilia: Drosophilinae      Tribu: Drosophilini

Subtribu: Drosophilina      Infratribu: Drosophiliti

Género: *Drosophila*

Grupo artificial: Melanogaster

Especie: *Drosophila melanogaster*



Grupo artificial: Virilis

Especie: *Drosophila virilis*



Grupo artificial: Repleta

Especie: *Drosophila hydei*

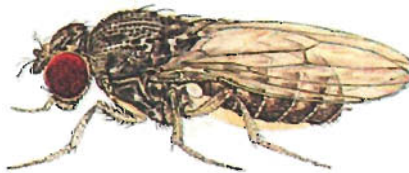


Fig. 3 Moscas utilizadas en este trabajo (Patterson, 1943).

### **Ciclos de Vida (Fig. 3)**

*-Drosophila melanogaster:* Huevo, un día; larva de primer estadio, un día; de segundo, un día y de tercero, dos días; pupa, 4.5 a 5 días. Así la duración del ciclo de huevo a adulto es de 9.5 a 10 días en condiciones controladas de temperatura y humedad relativa, 25°C y 60%, respectivamente. La duración del ciclo de vida es sensible a pequeños cambios en el ambiente. El imago o adulto inicia la cópula de 3 a 5 horas después de emerger de la pupa. En la naturaleza, la longevidad de los adultos es de 3 a 7 días (Demerec 1965).

*-Drosophila hydei:* huevo, un día; estado larval 6 a 7 días; pupa, 5 días. El ciclo de huevo a adulto es de 13 a 14 días. Suelen poner sus huevos apilados en alguna orilla del contenedor (Hess, 1976). Se desconoce su comportamiento reproductivo en la naturaleza, pero en condiciones de laboratorio, alcanza la madurez sexual aproximadamente a los 7 a 10 días después de emerger del pupario (Markow, 1996).

*-Drosophila virilis:* huevo, un día; estadio larval 6 a 6.5 días; pupa, 8 días. El ciclo reportado, de huevo hasta adulto, es aproximadamente de 18 días a 24° C (Alexander, 1976), aunque en la presente tesis, la duración del ciclo de vida a 25°C fue de 15 a 16 días. Después de emerger, el imago macho requiere un período de 6 días para la maduración de los testículos (Alexander, 1976.). Las hembras alcanzan su máximo punto de puesta de huevos en los primeros 10 días de adulto, con machos maduros (Aigaki & Ohba, 1984b). De igual manera, la mayor actividad de los machos se alcanza en las primeras dos semanas de vida, el 90% copula al menos una vez durante una hora y el 50% hasta tres veces en el mismo tiempo (Aigaki & Ohba, 1984a). Suelen poner sus huevos esparcidos por la superficie del medio de cultivo del contenedor.

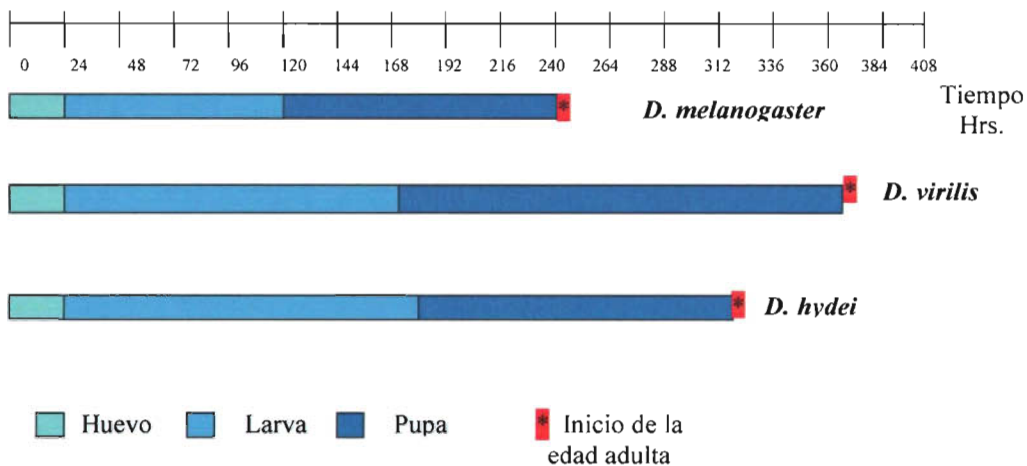


Figura 4. Cuadro comparativo de los ciclos de vida de huevo hasta adulto de las diferentes especies de *Drosophila*.

### Obtención de larvas

Las dos líneas se mantuvieron en laboratorio con medio de cultivo estándar para *Drosophila*. Para las líneas *D. hydei* y *D. virilis*, al emerger una camada de organismos se sembraron en otros frascos con medio fresco y levadura de pan para inducir la maduración de ovariolas, el tiempo en que maduraron antes de sincronizar fue de 6 a 7 días para *D. virilis* y de 4 a 5 para *D. hydei*. En *D. melanogaster*, el tiempo de maduración se alcanza al emerger y desde el primer día empiezan a poner muchos huevos y se mantiene prolífica hasta una semana y media después, sin reducir de manera significativa el número de huevos.

La sincronización de huevos se realiza pasando moscas maduras a frascos con medio fresco y levadura de pan, para recolectar huevos por un período de ocho horas, después de lo cual se retira a las moscas adultas. Los huevos continúan su

desarrollo y más adelante se dispone de una muestra de larvas que difieren en edad en  $\pm 4$  h.

### Compuesto químico

\* Colchicina, (CO) [CAS 64-86-8] (Index Merck, 1989). (Sigma, St. Louis MO)

El disolvente utilizado fue agua destilada, mismo que se empleó como testigo negativo.

### Tratamientos

La edad de las larvas de *Drosophila melanogaster* que son usadas para protocolos de mutagenicidad es el tercer estadio, que corresponde a las 72 h de edad (Clark, 1982); esta edad también ha mostrado ser apropiada para estudios de teratogénesis. La edad de las larvas al tratamiento para de *D. virilis* y *D. hydei* se determinó con base en el desarrollo de *D. melanogaster* (Fig. 3).

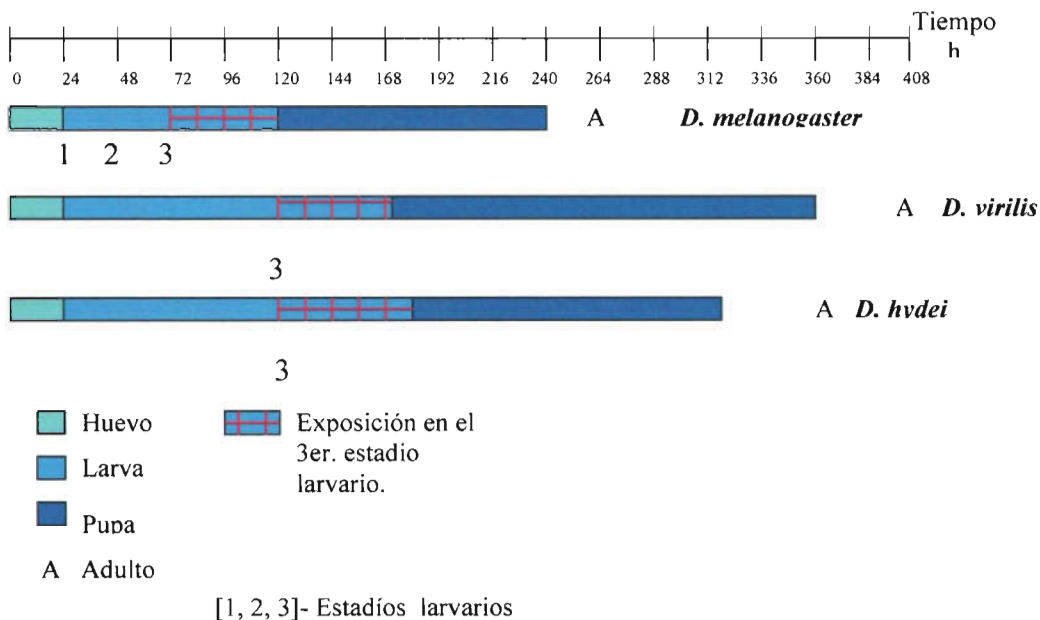


Figura 5. Ubicación del ultimo tercio del desarrollo de huevo a pupa para *D. virilis* y *D. hydei*.



Para las dos especies bajo estudio la edad de las larvas para tratamiento fue análoga al tercer estadio de *D. melanogaster*, es decir, se determinó con base en el tiempo que corresponde al último tercio de las fases huevo-pupa. Como el ciclo de los dos dípteros es muy similar, la edad al tratamiento fue la misma: 120 h después de la puesta de huevos. Se realizaron tratamientos piloto para determinar el rango de respuesta de los dípteros al compuesto a probar.

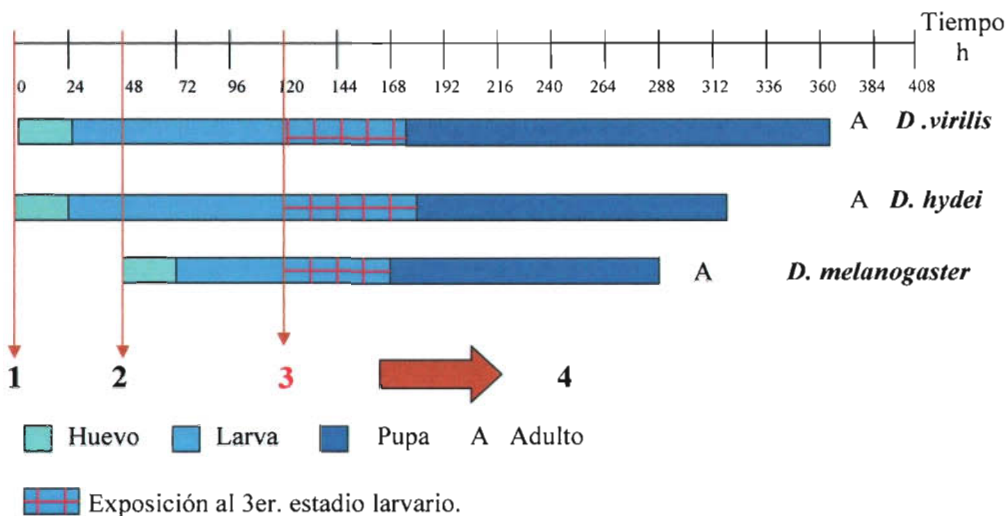
Llegado este tiempo se procedió según Nöthinger (1970) a separar las larvas del medio de cultivo por flotación, mediante una solución concentrada de sacarosa al 20%, se hizo pasar a las larvas por un embudo de separación de 4 mm de diámetro y se colectaron sobre una gasa fina de nylon. Con ayuda de una espátula se colectaron grupos de 100 a 150 larvas en tubos homeopáticos de 15 ml de capacidad que contenían 1g de medio instantáneo para mosca (Carolina Biological Supply Company, Burlington, NC) al que se agregó un volumen de 4 ml de las diferentes concentraciones del compuesto a probar. Los tubos se taparon con un tapón de hule espuma y se esperó a que los adultos emergieran.

En la figura 4 se presenta el procedimiento para el experimento que se realizó en paralelo con las tres especies de *Drosophila*.

Con base en estudios realizados con *D. melanogaster*, se seleccionó la concentración 0.125 mM como referencia, porque en estas moscas induce alteraciones en el desarrollo de manera significativa (Muñoz, 1997).

Se probaron 14 concentraciones, mismas que se obtuvieron por diluciones sucesivas: 0, Testigo (agua destilada), 0.00003, 0.00006, 0.00012, 0.00024, 0.00048, 0.00097, 0.0019, 0.0039, 0.0078, 0.0156, 0.03125, 0.0625, y 0.125 mM.

Para cada tratamiento, las diferentes concentraciones se evaluaron por triplicado y se realizaron al menos tres repeticiones



- 1.- Sincronización por 8 horas de *D. hydei* y *D. virilis*.
- 2.- Sincronización por 8 horas de *D. melanogaster*.
- 3.- Experimento paralelo con larvas de: *D. hydei* y *D. virilis*,  $96 \pm 4$  hrs.  
*D. melanogaster*  $72 \pm 4$  hrs.
- 4.- Obtención de moscas adultas

Figura 6. Protocolo general del experimento.

### Criterios de Registro

Posteriormente, las moscas recobradas se fijaron en alcohol etílico al 70 %. De cada tubo se registró el número de individuos por sexo y el número total de organismos recobrados. El índice de sobrevivencia (I.S) se estimó para el total de organismos recobrados/tubo, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de Sobrevivencia (IS)} = \frac{\sum_{i=1}^n \text{Experimental}}{\sum_{i=1}^n \text{Testigo}} \quad (\text{Arellano, 2000}).$$

Para cada concentración probada (x) se obtuvo el índice de sobrevivencia (promedio  $\pm$  error estándar) como el promedio de los tres tubos por concentración

de cada experimento, posteriormente los promedios obtenidos a partir de cada repetición se promediaron a su vez para obtener el valor de sobrevivencia final.

Para cada concentración, el índice sexual (promedio  $\pm$  error estándar) se obtuvo como el cociente del número de machos entre el número total de hembras y machos recobrados en esa concentración.

Se revisó la morfología de las moscas recobradas para identificar alteraciones en: simetría corporal, forma y número de las sedas de cabeza, tórax y abdomen; forma del ojo, alas, halterios y segmentos abdominales). La presencia de alteraciones en estas estructuras ha sido asociada a la exposición a teratógenos (Lynch et al., 1991; Muñoz et al., 2003).

### **Análisis de Resultados**

Para comparar el efecto en las concentraciones y las especies, con respecto a los índices de sobrevivencia y sexual (IS e ISx), se utilizó un ANOVA de dos vías para cada uno.

Para la comparación de la frecuencia de alteraciones entre las moscas testigo y las experimentales se utilizaron las tablas de Kastenbaun-Bowman ( $\alpha= 0.05$  ó  $\alpha= 0.01$ ); ó cuando fue necesario, la prueba de Z para proporciones ( $\alpha=0.05$ ).

## VI. RESULTADOS

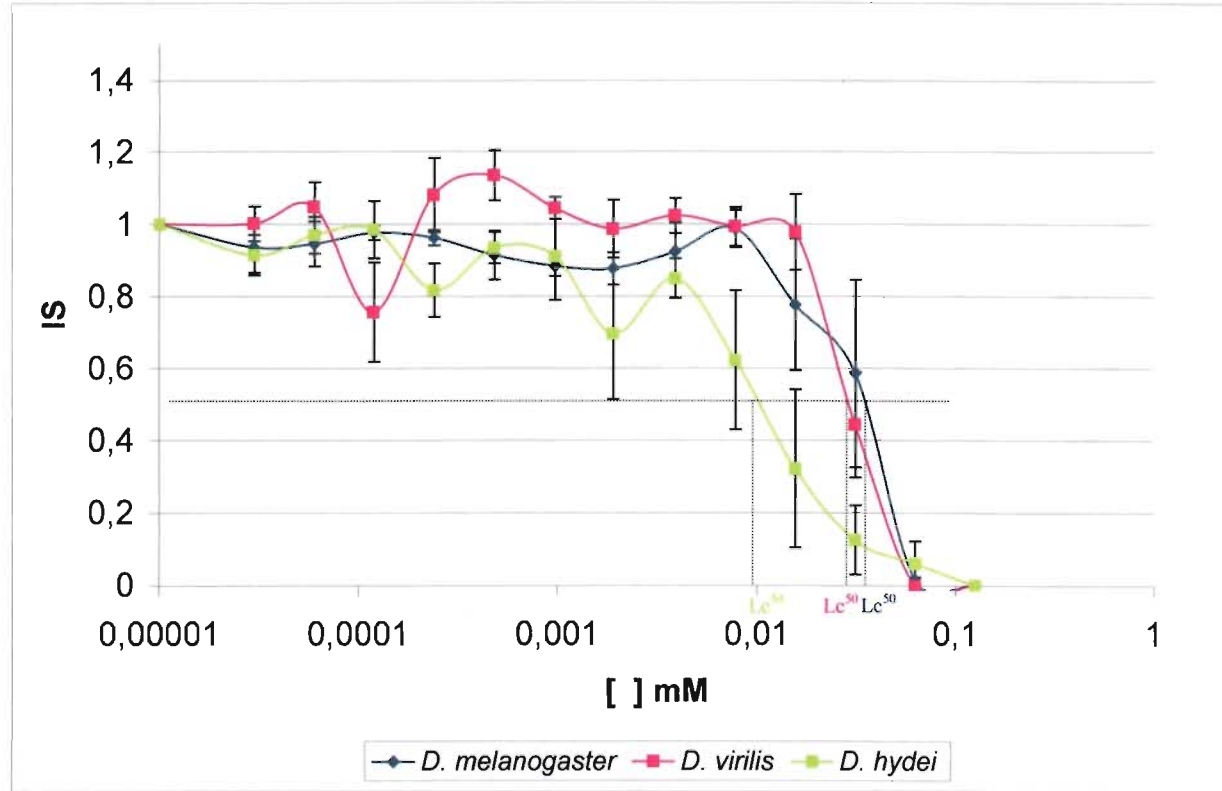
### Índice de sobrevivencia

En la tabla I y la figura 7 se muestra el Índice de sobrevivencia (IS) obtenido para cada especie en los diferentes tratamientos con CO.

Tabla I. Índice de sobrevivencia por especie (promedio  $\pm$  error estándar).  
\* Concentraciones entre las que se encuentra la  $L_c$  50

Colchicina [mM]	<i>D. hydei</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>D. virilis</i>
H <sub>2</sub> O Dest.	1.00 $\pm$ 0.0	1.00 $\pm$ 0.0	1.00 $\pm$ 0.0
0.00003	0.91 $\pm$ 0.05	0.93 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.04
0.00006	0.96 $\pm$ 0.05	0.94 $\pm$ 0.06	1.04 $\pm$ 0.06
0.00012	0.98 $\pm$ 0.07	0.97 $\pm$ 0.01	0.75 $\pm$ 0.13
0.00024	0.81 $\pm$ 0.07	0.96 $\pm$ 0.02	1.08 $\pm$ 0.10
0.00048	0.93 $\pm$ 0.04	0.91 $\pm$ 0.06	1.13 $\pm$ 0.06
0.00097	0.91 $\pm$ 0.12	0.88 $\pm$ 0.02	1.04 $\pm$ 0.02
0.0019	0.69 $\pm$ 0.18	0.87 $\pm$ 0.04	0.98 $\pm$ 0.08
0.0039	0.84 $\pm$ 0.05	0.92 $\pm$ 0.07	1.02 $\pm$ 0.04
0.0078	0.62 $\pm$ 0.19	0.98 $\pm$ 0.05	0.99 $\pm$ 0.05
0.0156	0.32 $\pm$ 0.21	0.77 $\pm$ 0.18	0.97 $\pm$ 0.10
0.03125	0.12 $\pm$ 0.09	0.58 $\pm$ 0.26	0.44 $\pm$ 0.14
0.0625	0.06 $\pm$ 0.06	0.014 $\pm$ 0.0	0.00 $\pm$ 0.00
0.125	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00

Figura 7. IS (promedio  $\pm$  ES) de las tres especies de *Drosophila*.



Se determinó, mediante un ANOVA de dos vías que no existen diferencias significativas en la proporción de sexos en cada una de las tres especies de moscas y entre las concentraciones, no así en el Índice de sobrevivencia ( $p < 0.05$ ). Mediante un ANOVA de dos vías se confirmaron diferencias significativas entre las especies y la concentración probada (Tabla II) y mediante la prueba de Turkey se identificaron diferencias entre especies (Tabla III).

Tabla II. Resumen del ANOVA de dos vías, para el Índice de Sobrevivencia vs. especie-concentración.

1-Especie, 2-Concentración						
	Grados de libertad Efecto	Cuadrado medio Efecto	Grados de libertad Error	Cuadrado medio Error	F	p
1	2	1.076008081	420	0.07447717	14.4474869	8.5498E-07
2	13	4.051332474	420	0.07447717	54.3969688	0
12	26	0.175416186	420	0.07447717	2.35530114	0.00024479

Tabla III. Comparación Múltiple de Turkey

	<i>Drosophila hydei</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Drosophila virilis</i>
<i>Drosophila hydei</i>		***	***
<i>Drosophila melanogaster</i>	***		ns
<i>Drosophila virilis</i>	***	ns	

\*\*\*  $p < 0.001$ ; ns, no significativo.

Tabla IV. Diferencias en el índice de sobrevivencia entre las moscas de las diferentes especies expuestas a CO.

<i>Drosophila hydei</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Drosophila virilis</i>
-------------------------	--------------------------------	---------------------------

Las relaciones entre los índices de sobrevivencia se muestran en la Tabla IV. Dos especies se encuentran unidas, cuando no se encuentran diferencias significativas entre ellas. El efecto del tratamiento en el IS fue similar entre *D. melanogaster* y *D. virilis*, mientras que en *D. hydei* mostró algunas diferencias. Sin embargo, en términos generales, se identificaron algunos aspectos comunes para las tres especies:

- La exposición a la concentración más alta (0.125 mM) fue letal para las tres especies.
- Las tres últimas concentraciones (0.125 - 0.0325 mM) produjeron diferencias significativas respecto a las otras, en sobrevivencia de las moscas expuestas a CO.
- La susceptibilidad al tratamiento fue diferente, siendo más sensible *D. hydei*, para la que la  $L_{C50}$  se ubicó sobre 0.0078 mM; seguida por *D. virilis*, con una  $L_{C50}$  sobre 0.0156 mM y, finalmente *D. melanogaster*, con una  $L_{C50}$  arriba de 0.3125 mM. En cuanto a los índices de sobrevivencia *D. hydei* fue la que mostró los menores; entre *D. virilis* y *D. melanogaster* no hubo diferencias significativas (Figura 7).

- En las tres especies se identificaron concentraciones en las que el IS de las moscas expuestas a una concentración baja es menor que el IS obtenido a concentraciones más altas.
- Las alteraciones en la morfología de las tres especies comprometieron estructuras similares.

#### Frecuencia de alteraciones

Las alteraciones observadas se clasificaron por región corporal en cabeza, tórax y abdomen. En cada región, el registro se realizó por estructuras (áreas), por ejemplo, en cabeza se revisaron los ojos, sedas ocelares y orbitales. La tabla V muestra los criterios con los que se identificaron las alteraciones.



Tabla V .- Tipo de alteraciones registradas por región del cuerpo en las tres especies de *Drosophila*.

**Región      Área                      Alteración puntual**

C A B E Z A	Ojos  Sedas Ocelares  Sedas Orbitales	ojos reducidos.  Tipo bent, bifurcadas, acortadas, dobladas, en número extra, reducidas, ausentes  Tipo bent, acortadas, dobladas, en número extra, reducidas, ausentes, cerdas suborbitales tipo bent.
T O R A X	Sedas Escutelares  Sedas Prescutelares y Lateroprescutelares  Sedas Humerales  Simetría Torax  Alas	Tipo bent, corta, doblada, de más, más chica, ausente, posición diferente.  Tipo bent, corta, de más, doblada, ausentes.  Tipo bent, bifurcadas, acortadas, en número extra, reducidas, ausentes.  simetría torax  venación alterada, plegadas, tipo notch
A B D O M E N	Abdomen mal fusionado  Sedas alteradas	

Los resultados en cuanto a la inducción de alteraciones para cada mosca se presentan por especie.

*Drosophila melanogaster* (Tablas VI y VII) mostró una respuesta al tratamiento claramente significativa en las tres regiones del cuerpo; siendo la cabeza y el tórax las regiones más afectadas. En la cabeza se observaron alteraciones en las sedas orbitales (cerdas más cortas que las moscas testigo y/o dobladas en ángulo de 45 °) y en los ojos, en los que el tamaño se mostró claramente reducido (a más del 50 % del tamaño normal). En el tórax, los principales sitios de respuesta fueron las sedas preescutelares (ausentes y/o de menor tamaño) pero el indicador más importante fue el ala tipo "Notch" (ala con muescas en el borde que simulan el fenotipo producido por el gen *Notch*). En el abdomen, aunque las categorías con efecto significativo fueron menos y la frecuencia de aparición muy baja, resaltó el efecto en la simetría del abdomen y la presencia de sedas bifurcadas (en contraste con una sola seda sencilla en las moscas testigo).

**Tabla VI. Frecuencia de alteraciones obtenida a nivel de región corporal a partir de larvas de *Drosophila melanogaster* expuestas a colchicina.**

[ ] mM	Hembras	Machos	Total	CABEZA		TORAX		ABDOMEN		Total alter.	Frec. alter
H2Odest	489	480	969	4 (0.0041)	ns	14 (0.0144)	ns	0 (0.0)	ns	18	0.019
0.00003	471	440	911	9 (0.0098)	ns	<b>28 (0.0307)</b>	**	0 (0.0)	ns	37	0.039
0.00006	458	455	913	9 (0.0098)	ns	23 (0.0251)	ns	1 (0.001)	ns	33	0.036
0.00012	472	474	946	11 (0.0116)	ns	<b>31 (0.0327)</b>	**	<b>6 (0.0063)</b>	**	47	0.05
0.00024	490	444	934	11 (0.0117)	ns	24 (0.0256)	ns	2 (0.0021)	ns	36	0.039
0.00048	451	442	893	<b>9 (0.0100)</b>	**	<b>24 (0.0268)</b>	**	1 (0.0011)	ns	31	0.035
0.00097	448	415	863	<b>18 (0.0208)</b>	**	<b>32 (0.0370)</b>	**	0 (0.0)	ns	50	0.058
0.0019	437	420	857	<b>11 (0.0128)</b>	**	<b>39 (0.0455)</b>	**	0 (0.0)	ns	47	0.055
0.0039	477	428	905	<b>14 (0.0154)</b>	**	<b>29 (0.0320)</b>	**	<b>6 (0.0066)</b>	**	49	0.054
0.0078	500	452	952	8 (0.0084)	ns	<b>37 (0.0388)</b>	**	<b>6 (0.0063)</b>	**	51	0.054
0.0156	335	376	711	<b>17 (0.0239)</b>	**	<b>30 (0.0421)</b>	**	<b>8 (0.0112)</b>	**	54	0.076
0.03125	227	286	513	<b>45 (0.0877)</b>	**	<b>93 (0.1812)</b>	**	<b>3 (0.0058)</b>	**	141	0.275
0.0625	4	9	13	<b>12 (0.9230)</b>	**	1 (0.0769)	ns	0 (0.0)	ns	13	1
0.125	0	0	0	0 (0.0)	ns	0	ns	0 (0.0)	ns	0	0

*Número de alteraciones (frecuencia); Análisis con base en la prueba de Kastenbaun-Bowman; \*\*, significativo  $p < 0.05$ ; ns, no significativo.*

**Tabla VII. Frecuencia de alteraciones obtenida de las principales áreas corporales afectadas y principales alteraciones puntuales presentes en estas, a partir de larvas de *Drosophila melanogaster* expuestas a colchicina.**

	CABEZA				TORAX				ABDOMEN			
[ ] Mm	Orbitales		Ojos		Preescutelares		Alas		cerdas bif		Segmentos sin fusionar	
0.00001	2 (0.0020)	ns	0 (0.0)	ns	2 (0.0020)	ns	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns
0.00003	3 (0.0032)	ns	0 (0.0)	ns	1 (0.0010)	ns	3 (0.0032)	ns	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns
0.00006	4 (0.0043)	ns	0 (0.0)	ns	5 (0.0054)	ns	1 (0.0010)	ns	0 (0.0)	ns	1 (0.0010)	ns
0.00012	<b>8 (0.0084)</b>	**	0 (0.0)	ns	<b>12 (0.0126)</b>	**	1 (0.0010)	ns	3 (0.0031)	ns	<b>3 (0.0031)</b>	***
0.00024	<b>8 (0.0085)</b>	**	0 (0.0)	ns	2 (0.0021)	ns	<b>6 (0.0064)</b>	**	0 (0.0)	ns	1 (0.0010)	ns
0.00048	7 (0.0078)	ns	0 (0.0)	ns	6 (0.0067)	ns	<b>4 (0.0044)</b>	**	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns
0.00097	<b>10 (0.0115)</b>	**	0 (0.0)	ns	<b>10 (0.0115)</b>	**	1 (0.0011)	ns	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns
0.0019	4 (0.0046)	ns	1 (0.0011)	ns	<b>15 (0.0175)</b>	**	<b>4 (0.0046)</b>	**	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns
0.0039	<b>10 (0.0110)</b>	**	0 (0.0)	ns	<b>8 (0.0088)</b>	**	<b>5 (0.0055)</b>	**	<b>4 (0.0044)</b>	**	2 (0.0022)	ns
0.0078	5 (0.0052)	ns	0 (0.0)	ns	4 (0.0042)	ns	4 (0.0042)	ns	<b>6 (0.0063)</b>	**	0 (0.0)	ns
0.0156	1 (0.0014)	ns	<b>12 (0.0168)</b>	**	3 (0.0042)	ns	<b>15 (0.0210)</b>	**	<b>7 (0.0098)</b>	**	0 (0.0)	ns
0.03125	<b>17 (0.0331)</b>	**	<b>26 (0.0506)</b>	**	<b>9 (0.0175)</b>	**	<b>72 (0.1404)</b>	**	2 (0.0038)	ns	0 (0.0)	ns
0.0625	<b>1 (0.0769)</b>	**	<b>9 (0.6923)</b>	**	0 (0.0)	ns	<b>1 (0.0769)</b>	**	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns
0.125	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns
Alteracion Puntual	Acortada y Tipo bent		Reducidos		Ausentes y Acortada		Tipo Notch					

**Número de alteraciones (frecuencia); Análisis con base en la prueba de Kastenbaun-Bowman; \*\* , significativo  $p < 0.05$ ; ns, no significativo.**

En *Drosophila virilis*, las regiones más afectadas fueron cabeza y tórax (Tablas VIII y IX), aunque en menor proporción que en *D. melanogaster*. Al considerar el total de alteraciones por región corporal el efecto resultó significativo sólo en pocas concentraciones pero, al desglosar los datos por áreas se observó efecto significativo en la frecuencia de alteraciones en las sedas ocelares [0.00024 mM] y los ojos reducidos [0.0156 y 0.03125 mM]; en el tórax se observaron efectos significativos en las sedas escutelares en dos rangos de concentración [0.00003 a 0.00012 y 0.0019 a 0.0078 mM] (sedas escutelares ausentes, dobladas o tipo "bent" y en diferente posición); sólo se detectó efecto positivo en la frecuencia de alas tipo "Notch" en 0.0156 mM. En el abdomen se presentaron alteraciones similares a las registradas en *D. melanogaster*, pero en una frecuencia no significativa.

**Tabla VIII. Frecuencia de alteraciones obtenida a nivel de región corporal a partir de larvas de *Drosophila virilis* expuestas a colchicina.**

[ ]mM	Hembras	Machos	Total	CABEZA	Z	TORAX	Z	ABDOMEN	Total Alter.	Frec. Alter.	
H <sub>2</sub> O dest.	468	490	958	251 (0.2620)	ns	173 (0.1805)	ns	0 (0.0)	ns	423	0.442
0.00003	477	474	951	179 (0.1882)	ns	186 (0.1955)	ns	1 (0.001)	ns	364	0.383
0.00006	494	470	964	156 (0.1618)	ns	213 (0.2209)	ns	0 (0.0)	ns	368	0.382
0.00012	313	345	658	119 (0.1808)	ns	<b>165 (0.2507)</b>	**	0 (0.0)	ns	283	0.43
0.00024	472	507	979	246 (0.2512)	ns	198 (0.2022)	ns	0 (0.0)	ns	444	0.454
0.00048	510	549	1059	169 (0.1595)	ns	157 (0.1482)	ns	2 (0.0018)	ns	327	0.309
0.00097	463	520	983	232 (0.2360)	ns	186 (0.1892)	ns	0 (0.0)	ns	418	0.425
0.0019	486	470	956	172 (0.1799)	ns	188 (0.1966)	ns	2 (0.0020)	ns	362	0.379
0.0039	488	491	979	187 (0.1910)	ns	223 (0.2277)	ns	2 (0.0020)	ns	412	0.421
0.0078	446	488	934	203 (0.2173)	ns	<b>250 (0.2676)</b>	**	0 (0.0)	ns	453	0.485
0.0156	423	453	876	151 (0.1723)	ns	153 (0.1746)	ns	0 (0.0)	ns	299	0.341
0.03125	176	167	343	38 (0.1107)	ns	57 (0.1661)	ns	1 (0.0029)	ns	93	0.271
0.0625	0	0	0	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns	0	0
0.125	0	0	0	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns	0	0

*Número de alteraciones (frecuencia); Análisis en base a la prueba de z en Cabeza y Torax, en el Abdomen prueba de kastenbaun-Bowman; \*\*, significativo p<0.05; ns, no significativo.*

**Tabla 22.- Frecuencia de alteraciones obtenida de las principales subregiones corporales afectadas y las principales alteraciones puntuales presentes en estas, a partir de larvas de *Drosophila virilis* expuestas a colchicina.**

	CABEZA			TORAX				
[ μmM	Ocelares		Ojos		Escutelares		Alas	
0.00001	83 (0.0866)	ns	0 (0.0)	ns	58 (0.0605)	ns	0 (0.0)	ns
0.00003	91 (0.0956)	ns	0 (0.0)	ns	<b>95 (0.0998)</b>	**	0 (0.0)	ns
0.00006	76 (0.0788)	ns	0 (0.0)	ns	<b>120 (0.1244)</b>	**	0 (0.0)	ns
0.00012	66 (0.1003)	ns	0 (0.0)	ns	<b>87 (0.1322)</b>	**	0 (0.0)	ns
0.00024	<b>131 (0.1338)</b>	**	0 (0.0)	ns	78 (0.0796)	ns	0 (0.0)	ns
0.00048	90 (0.0849)	ns	0 (0.0)	ns	67 (0.0632)	ns	2 (0.0018)	ns
0.00097	100 (0.1017)	ns	0 (0.0)	ns	73 (0.0742)	ns	2 (0.0020)	ns
0.0019	102 (0.1066)	ns	0 (0.0)	ns	<b>89 (0.0930)</b>	**	1 (0.0010)	ns
0.0039	88 (0.0898)	ns	0 (0.0)	ns	<b>119 (0.1215)</b>	**	1 (0.0010)	ns
0.0078	88 (0.0942)	ns	0 (0.0)	ns	<b>159 (0.1702)</b>	**	4 (0.0042)	ns
0.0156	85 (0.0970)	ns	<b>4 (0.0045)</b>	**	56 (0.0639)	ns	<b>5 (0.0057)</b>	**
0.03125	25 (0.0728)	ns	<b>3 (0.0087)</b>	**	29 (0.0845)	ns	0 (0.0)	ns
0.0625	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns
0.125	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns
Alteración puntual	Número extra	Reducidos		Ausente, "Bent" Posición dif.		Tipo Notch		

**Número de alteraciones (frecuencia); Análisis con base en la prueba de Kastenbaun-Bowman; \*\*, significativo  $p < 0.05$ ; ns, no significativo.**

Para *Drosophila hydei* (Tablas X y XI), el efecto siguió el siguiente orden: cabeza > tórax > abdomen. Al analizar por área, se encontraron alteraciones también similares a las de *D. melanogaster*, como sedas orbitales ausentes, más cortas y dobladas ó tipo “bent” [0.00024, 0.03125 y 0.0625 mM], sedas ocelares ausentes y/o reducidas [0.00003 a 0.00024 y 0.00097 a 0.0019 mM] y también se observó reducción en el tamaño de los ojos en las moscas expuestas a 0.0078, 0.03125 y 0.0625 mM; en el tórax, el efecto se encontró en la concentración 0.0019 mM; sólo un tipo de alteración puntual fue significativo (humeral bifurcada o extra) y la forma de las alas en 0.03125 mM. En el abdomen también se detectaron alteraciones en la simetría pero, al igual que en *D. virilis*, el efecto no fue significativo.



**Tabla X. Frecuencia de alteraciones obtenida a nivel de región corporal a partir de larvas de *Drosophila hydei* expuestas a colchicina.**

[ ]mM	Hembras	Machos	Total	CABEZA		TORAX	Z	ABDOMEN		Total Alter.	Frec. Alter.
0.00001	380	420	800	44 (0.055)	ns	311 (0.3887)	ns	0 (0.0)	ns	355	0.444
0.00003	374	382	756	55 (0.0727)	ns	275 (0.3637)	ns	0 (0.0)	ns	330	0.437
0.00006	360	411	771	<b>82 (0.1063)</b>	**	251 (0.3255)	ns	4 (0.0051)	ns	336	0.436
0.00012	382	412	794	<b>99 (0.1246)</b>	**	225 (0.2833)	ns	0 (0.0)	ns	324	0.408
0.00024	318	310	628	<b>108 (0.1719)</b>	**	185 (0.2945)	ns	1 (0.0015)	ns	293	0.467
0.00048	342	401	743	29 (0.0390)	ns	269 (0.3620)	ns	0 (0.0)	ns	298	0.401
0.00097	337	330	667	<b>86 (0.1289)</b>	**	234 (0.3508)	ns	0 (0.0)	ns	319	0.478
0.0019	247	269	516	<b>64 (0.1240)</b>	**	<b>233 (0.4515)</b>	**	1 (0.0019)	ns	297	0.576
0.0039	345	342	687	29 (0.0422)	ns	283 (0.4119)	ns	0 (0.0)	ns	312	0.454
0.0078	255	243	498	34 (0.0682)	ns	157 (0.3152)	ns	0 (0.0)	ns	191	0.384
0.0156	199	183	382	13 (0.0340)	ns	105 (0.2748)	ns	0 (0.0)	ns	118	0.309
0.03125	50	88	138	<b>66 (0.4782)</b>	**	42 (0.3043)	ns	0 (0.0)	ns	108	0.783
0.0625	32	33	65	<b>62 (0.9538)</b>	**	8 (0.1230)	ns	0 (0.0)	ns	70	1.077
0.125	0	0	0	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns	0	0

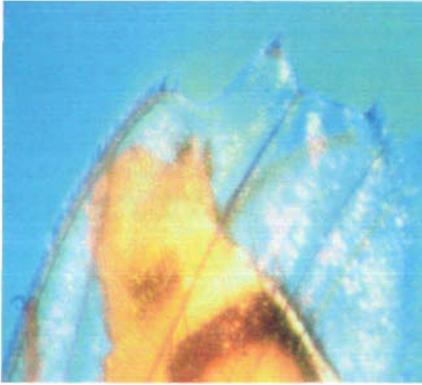
*Número de alteraciones (frecuencia); Análisis en base a la prueba de z, en Torax y prueba de Kastenbaun-Bowman en Cabeza y Abdomen; \*\*,significativo  $p < 0.05$ ; ns, no significativo.*

**Tabla XI. Frecuencia de alteraciones obtenida de las principales subregiones corporales afectadas y principales alteraciones puntuales presentas en estas, a partir de larvas de *Drosophila hydei* expuestas a colchicina.**

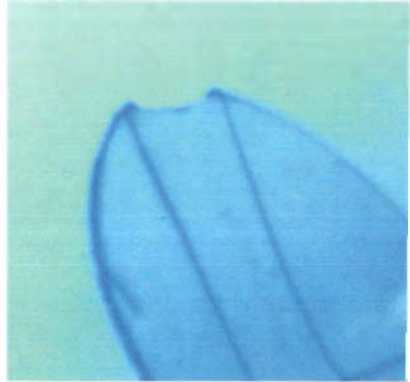
	CABEZA				TORAX			
[ μM]	Orb		Ocelar		Ojos		Alas	
0.00001	30 (0.0375)	ns	13 (0.0162)	ns	1 (0.0012)	ns	1 (0.0012)	ns
0.00003	14 (0.0185)	ns	<b>40 (0.0529)</b>	**	1 (0.0013)	ns	2 (0.0026)	ns
0.00006	40 (0.0518)	ns	<b>42 (0.0544)</b>	**	0 (0.0)	ns	1 (0.0012)	ns
0.00012	19 (0.0239)	ns	<b>80 (0.1007)</b>	**	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns
0.00024	<b>41 (0.0652)</b>	**	<b>67 (0.1066)</b>	**	0 (0.0)	ns	1 (0.0015)	ns
0.00048	17 (0.0228)	ns	12 (0.0161)	ns	0 (0.0)	ns	5 (0.0067)	ns
0.00097	18 (0.0269)	ns	<b>68 (0.1019)</b>	**	0 (0.0)	ns	2 (0.0029)	ns
0.0019	26 (0.0503)	ns	<b>38 (0.0736)</b>	**	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns
0.0039	22 (0.0320)	ns	7 (0.0101)	ns	0 (0.0)	ns	1 (0.0014)	ns
0.0078	23 (0.0461)	ns	6 (0.0120)	ns	<b>5 (0.01)</b>	**	2 (0.0040)	ns
0.0156	10 (0.0261)	ns	2 (0.0052)	ns	1 (0.0026)	ns	0 (0.0)	ns
0.03125	<b>51 (0.3695)</b>	**	0 (0.0)	ns	<b>15 (0.1086)</b>	**	<b>5 (0.0362)</b>	**
0.0625	<b>51 (0.7846)</b>	**	0 (0.0)	ns	<b>11 (0.1692)</b>	**	0 (0.0)	ns
0.125	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns	0 (0.0)	ns
Alteracion puntual	Ausente, Acortada, "bent"		Acortada, Ausente.		Reducidos		Bifurcadas Extra	

**Número de alteraciones (frecuencia); Análisis con base en la prueba de Kastenbaun-Bowman; \*\*, significativo  $p < 0.05$ ; ns, no significativo.**

A continuación se presentan imágenes de las principales alteraciones encontradas, Figura 8. En la Figura 9 se comparan los hallazgos en las regiones corporales afectadas para cada mosca.



Ala “Notch” – *Drosophila melanogaster*



Ala “Notch” – *Drosophila virilis*



Orbital “bent” – *Drosophila virilis*



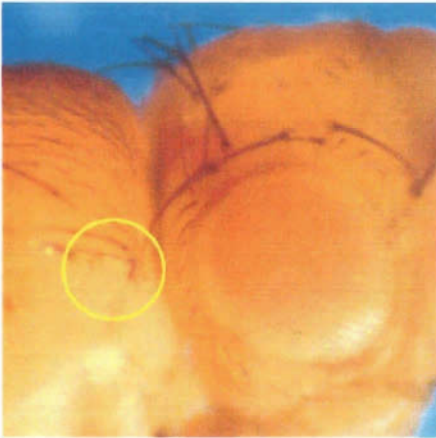
Orbital “bent” – *Drosophila hydei*



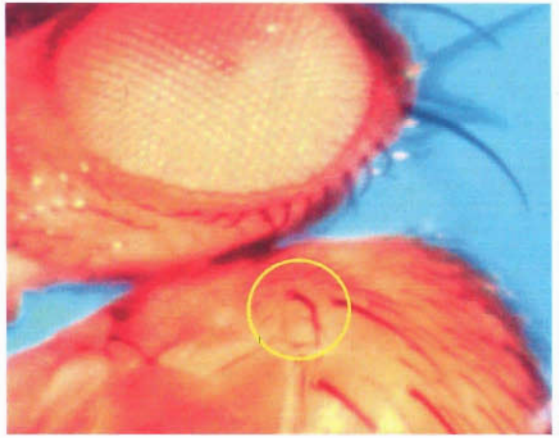
Abdomen mal fusionado  
*Drosophila melanogaster*



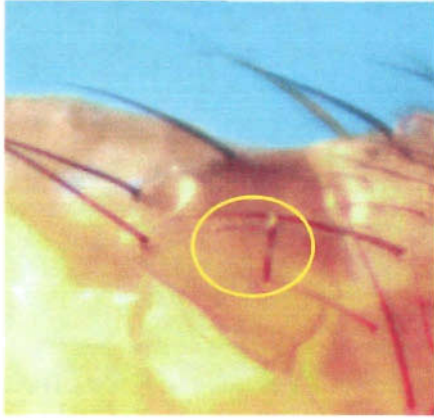
Abdomen mal fusionado  
*Drosophila virilis*



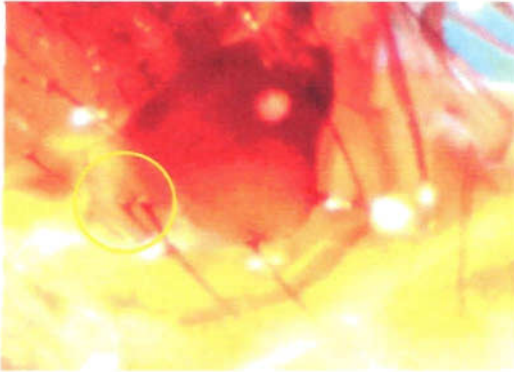
Humeral "bent" – *Drosophila melanogaster*



Humeral "bent" – *Drosophila virilis*



Escutelar “bent” – *Drosophila hydei*



Escutelar “extra” – *Drosophila hydei*

Figura 8. Principales alteraciones encontradas en la morfología de las moscas.

# Línea Efecto en Región corporal

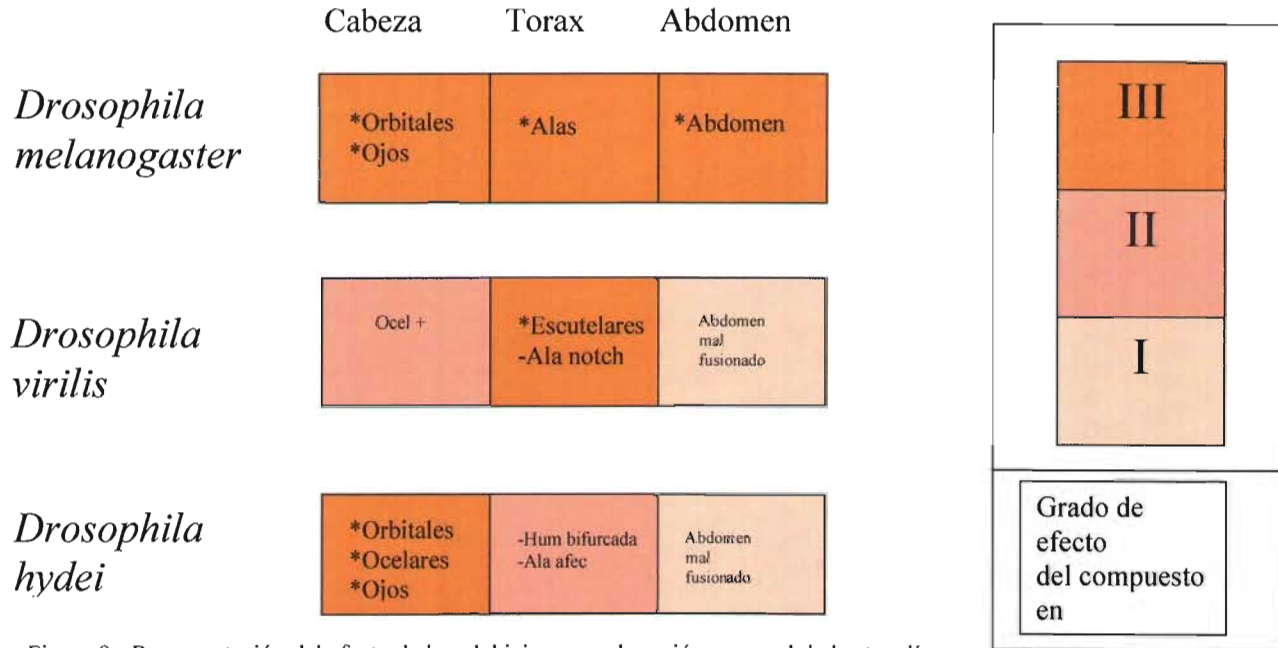


Figura 9.- Representación del efecto de la colchicina en cada región corporal de las tres líneas.

**I.-** Poco efecto, no hay significancia en Región, Área o alteración puntual; **II.-** Efecto medio donde en Región, una concentración es significativa ó en Área y Alteración puntual, un tipo o más de alteración también lo es; **III.-** Efecto fuerte donde en Región más de 2 concentraciones fueron significativas; en Área y Alteración puntual más de dos también lo son.

## VII. DISCUSIÓN

Debido a que no es posible utilizar a la misma especie en todos los ambientes ni en cualquier ubicación geográfica, la identificación de biomarcadores que informen de la condición ambiental es utilizada alternativamente. En este trabajo se buscó identificar biomarcadores de exposición comunes a tres especies del género *Drosophila*. Estos dípteros, son comunes en prácticamente todos los ecosistemas, sin embargo, es claro que en los diversos ecosistemas existen diferentes especies y aún, distintos géneros. No obstante, es relevante identificar si los biomarcadores expresados en una especie sumamente estudiada, como es la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, responden de una manera similar en otras especies del mismo género. Esta investigación se enmarca en un proyecto más amplio en el que la intención es identificar biomarcadores comunes cuya sensibilidad persista incluso a nivel de familia y orden filogenético.

Los resultados obtenidos mostraron similitudes en algunos aspectos, como la toxicidad del tratamiento para la sobrevivencia. Podemos clasificar a las especies utilizadas por su susceptibilidad de mayor a menor grado: *D. hydei* > *D. virilis* > *D. melanogaster*, en las dos últimas, la  $LC_{50}$  es muy cercana y no mostró diferencias significativas en el IS recobrado para las dos especies.

En humanos, el metabolismo de la colchicina involucra a la forma 3A4 de la familia de citocromos P450. Aunque ésta no ha sido reportada para *Drosophila melanogaster*, en insectos en general se conoce de la existencia de 6 familias (CYP6, 9, 12, 18 y 28) principalmente y el CYP4, que incluye secuencias compartidas con vertebrados (Feyereisen, 1999). Es probable que en el género *Drosophila*, una función asociada con la forma 3A4 sea llevada a cabo por otra

familia o por la acción conjunta de otras familias de citocromos P450, los cuales pueden actuar de manera cooperativa para metabolizar las toxinas, fenómeno que no sería raro, dado que se sabe de una alta plasticidad catalítica de estas enzimas.

No obstante, la multiplicidad genética de la superfamilia P450 en insectos (Frolov y Alatortsev, 1994; Dunkov *et al.*, 1996 y 1997), existe diferente actividad de familias de citocromos P450 en diferentes especies debido a los substratos en donde crecen las moscas del género *Drosophila* (Frank *et al.*, 1997). Al comparar la diversidad de los citocromos de moscas del desierto como *D. hydei* y *D. melanogaster* se ha encontrado que, si bien ambas especies de moscas son capaces de expresar prácticamente a los mismos citocromos, la proporción de algunos de ellos sí es diferente (Wilson, 2001).

Entonces, es factible suponer que en las especies del género *Drosophila* su susceptibilidad a la colchicina estará relacionada con la capacidad de estas mismas para activar diferentes familias de citocromos P450.

Lo anterior es un elemento importante para considerar la presencia de una actividad metabólica y de desintoxicación diferencial entre las tres especies. Específicamente, la respuesta ante un compuesto extraño, como en este caso la colchicina, es determinada por la historia adaptativa de cada especie. Cada especie de mosca esta adaptada a diferentes condiciones referentes a su distribución geográfica y hábitos alimenticios.

Una especie que es cosmopolita, muestra un amplio margen de actividad de las diferentes enzimas relacionadas con la desintoxicación para enfrentar la amplia gama de inductores a los que estará expuesto, como sería el caso de *Drosophila*



*melanogaster* que se reporta con una amplia distribución en diferentes ambientes y se alimenta de frutas en descomposición (TDSC, 2004). No así una especie restringida a un hábitat sumamente especializado, donde existirá especificidad en la respuesta que sea compatible para su nicho ecológico. Se han documentado estos casos para algunas moscas del género *Drosophila*, ya que algunas han evolucionado en el tiempo a una resistencia a toxinas, como las que han incorporado a su dieta especies de plantas con un alto contenido de toxinas, cuya ingesta puede resultar letal para otras especies (Wilson, 2001). Las especies cactofílicas de *Drosophila*, muestran una especialización en la descomposición química de tejidos de los cactus que contienen fitotoxinas naturales y varios tipos de alcaloides que actúan como veneno para aquellas otras especies que no la pueden metabolizar, Citocromos p450 están involucrados en esta especialización. Por ejemplo, en “moscas del desierto” expuestas a extractos de cactus con alcaloides, las familias CYP28 y CYP4 son inducidas significativamente (Wilson, 2001). La inducción de estas familias de citocromos juega un papel importante en la adaptación a los químicos de plantas y también ha sido fundamental en el desarrollo de resistencia a insecticidas (Feyereisen 1999).

*Drosophila hydei*, que pertenece al grupo Repleta, es un grupo de moscas con distribución en los desiertos de Norteamérica, se le encuentra en microclimas formados por el tejido de los cactus en descomposición y en su dieta ha incorporado a los alcaloides contenidos en éstos, de manera que, incluso para su conservación en condiciones de laboratorio, es necesario enriquecer al medio de cultivo con suplementos derivados de estas plantas. Esto nos habla de moscas especializadas a ambientes específicos, e incluso a compuestos específicos para

cada especie-planta, provocando la activación de familias de citocromos específicos y restringiendo en gran medida el posible uso de este recurso por las demás familias, es decir su plasticidad. Dado que la familia de alcaloides es muy diversa, una especialización en uno de ellos, no significa *per se* resistencia a otro tipo de alcaloides.

Si bien, *Drosophila virilis* es considerada cosmopolita, su presencia en ambientes urbanos es mucho menor que la de *D. melanogaster*. Tiene una distribución de ambientes holárticos en latitudes altas de Norte América y Asia, se le puede llegar a encontrar alimentándose principalmente de troncos en descomposición (TDSC 2004).

De esta manera se pueden explicar los resultados obtenidos de la sobrevivencia en las tres especies de moscas tratadas. La especie adaptada a un ambiente restringido mostró más susceptibilidad al daño por un agente tóxico que la cosmopolita y urbana que manifestó menor efecto, como se aprecia en la mayor sobrevivencia recobrada.

Otro aspecto que resultó similar para las tres especies fue la falta de una respuesta lineal en todos los aspectos evaluados. Las diferentes concentraciones se obtuvieron por diluciones sucesivas a partir de la mayor concentración probada. De esta manera, se garantiza que el contenido del compuesto de prueba es cada vez menor, conforme se realizan las diluciones.

En las curvas de sobrevivencia se observó que en algunas concentraciones, la sobrevivencia recobrada fue menor que en concentraciones más altas. La ausencia de una respuesta lineal es común de la exposición a concentraciones bajas de genotóxicos (Ramos, 2005), probablemente debido a la gradual inducción

de enzimas que participan en la respuesta de desintoxicación. Con respecto a la respuesta a bajas concentraciones de genotóxicos se considera que dos hipótesis son posibles, dependiendo de si la respuesta es lineal o si responde a umbrales. En el primer caso, el efecto sería detectado por aumentos graduales en la frecuencia del evento estudiado, que dependería del incremento en el estímulo aplicado, por ejemplo, la exposición a concentraciones mayores o más prolongadas; de esta manera, la respuesta sería lineal y el efecto del tratamiento sería detectado una vez que la frecuencia en la variable de respuesta alcanzara diferencias significativas. Nuestros resultados muestran que la respuesta no es lineal y más bien se identifican concentraciones o rangos de concentraciones en los que la tendencia de ésta cambia. Es probable que conforme la intensidad del estímulo se incrementa, se alcancen las condiciones necesarias para inducir la expresión de enzimas alternativas (ya sea por el tipo de enzima o por una mayor producción de éstas), de esta manera, aquellos organismos que no sean capaces de inducir esta respuesta podrían mostrar toxicidad aguda y aún la muerte. Como en toda respuesta de tipo biológico, también se espera la existencia de un rango de inducción efectivo, es decir, no todos los organismos responderían de la misma manera ante un estímulo y algunos podrían alcanzar este umbral antes que otros, lo cual puede ser determinante de su sobrevivencia. Conforme la concentración aumenta, las alternativas de respuesta se reducen, hasta que todos los organismos expuestos, finalmente mueran, como ocurrió en la concentración más alta probada (Ramos et al., 2005).

Con respecto al tipo de alteración en el desarrollo también se encontró una respuesta similar.

Los marcadores para cada región corporal en las tres especies fueron recurrentes, es decir, sedas tipo (“bent”), en mayor número, localizadas en una posición diferente, los terguitos del abdomen mostrando una fusión incompleta o aún ausentes en alguno de los hemisferios corporales, la reducción en el tamaño del ojo, la presencia de muescas en el borde de las alas y otras más que se expresaron de igual forma en las tres especies de moscas, aunque la frecuencia de estos eventos sí fue diferente entre especies.

Durante la metamorfosis el insecto pasa de larva a adulto. Al igual que ocurrió durante el desarrollo embrionario, la diferenciación de las estructuras del futuro adulto se realiza siguiendo un sentido Anterior – Posterior. Así, la diferenciación de la región cefálica antecede a la diferenciación del tórax y el abdomen. La metamorfosis implica la expresión gradual de cascadas de información reguladas por genes que coordinan a otros genes, los cuales en una acción cooperativa forman los diferentes órganos del adulto. De esta manera, en una misma especie, el efecto provocado por diferentes genotóxicos administrados de la misma manera a larvas de la misma edad podría reflejarse en la cabeza, el tórax o el abdomen, dependiendo del tiempo en el que la concentración necesaria para interferir con el desarrollo actúa en el blanco. Se ha propuesto que los compuestos que interfieren con el desarrollo de los organismos (teratógenos) podrían mostrar especificidad por ciertos órganos, sin embargo, es probable que más bien el efecto detectado dependa del tiempo en el que el compuesto o sus metabolitos se encuentran en el tejido o células sensibles.

Es importante considerar que, además de la exposición directa (por ejemplo, en la dieta) a un genotóxico, la exposición indirecta también afectará la respuesta. Una

vez que el compuesto es ingerido por las larvas, parte de éste es metabolizado y eliminado, ya sea por excreción o por acumulación en los tejidos grasos que son abundantes en los insectos inmaduros. Al iniciar la metamorfosis, el tejido larvario es lisado y la energía contenida en él es utilizada para sostener la diferenciación del tejido imagal, lo que alarga el período de exposición a los compuestos (Dietrich, 1965).

En *Drosophila melanogaster*, la cabeza y el tórax fueron las estructuras más afectadas, esto quiere decir que al momento de exponer las larvas fue suficiente para que el compuesto llegara hasta estos blancos, en *Drosophila virilis* el efecto del compuesto fue mayor en la región cefálica, aunque también se expresó en la región del tórax; el caso más extremo fue el de *Drosophila hydei* donde solo la región de la cabeza se vio afectada. Si bien la actividad metabólica de las tres especies varía por el tipo de ambiente en el que habitan, también es probable que la edad estimada como el tercer estadio en las dos especies alternativas no haya sido el equivalente. El criterio utilizado fue la proporción del tercer estadio larvario de *D. melanogaster*, el cual corresponde al último tercio de la fase de larva. Una vez establecido el ciclo de vida de *D. virilis* y *D. hydei*, se estableció al último tercio del desarrollo larvario como el tercer estadio larval. Se eligió este criterio porque la larva de *Drosophila* no muestra cambios morfológicos aparentes que permitan otro tipo de clasificación de las mudas larvarias. Así, una diferencia de algunas horas en el inicio del disparo hormonal que conduce a la metamorfosis pudo ser decisivo de que el efecto se localice en alguna región corporal en particular.

En la proliferación de los discos imagales e histoblastos, que son los primordios celulares que darán origen al adulto, la colchicina pudiera estar causando células

aneuploides y/o micronucleadas, afectando el ritmo del ciclo celular, que sin tener necesariamente un efecto de muerte celular provocaría que las cascadas de expresión génica se vean alteradas en estas células; el efecto sería más notable si llegase a afectar e interferir con la expresión de genes que producen proteínas que coordinan la actividad de otros productos génicos.

La proliferación de las células de los discos imagales alcanza un máximo después del tercer estadio y termina a las 24 h de formado el puparium en el caso de *D. melanogaster*, por lo que la presencia de la CO en el ambiente celular pudo afectar claramente esta actividad, conduciendo a errores en la diferenciación de las células y más adelante, de los órganos del adulto (Ramos, 2005).

Varias de estas actividades afectadas tienen como consecuencia directa la modificación en la comunicación celular-expresión genética, que en el proceso del desarrollo puede llevar a la muerte o a la modificación del patrón, según el grado del daño. Poco a poco se han ido descubriendo los genes blancos que son los responsables de la formación del patrón de varias estructuras (Thompson *et al.*, 1982; Martínez y Stewart 2002).

Un aspecto que apoya el planteamiento de una organización similar de las moscas de las especies estudiadas se observó en que biomarcadores como el ala tipo "Notch" (presencia de muescas en el borde de las alas), que en *D. melanogaster*, muestran expresividad variable, también mostraron variación en el grado de expresión en *D. virilis* y *D. hydei*. (García-Bellido y Dapena, 1974; García-Bellido y Merriam, 1971a y b). En los dípteros más evolucionados, las sedas están en un arreglo específico (Calleja *et al.*, 2002) que ha sido utilizado como modelo en el estudio de la biología del desarrollo y también podría ser usado como marcador

teratogénico, ya que el patrón de posición de las sedas puede ser alterado por factores ambientales.

Los contaminantes en el agua dulce comúnmente se encuentran a concentraciones muy bajas para causar una muerte rápida. La muerte es siempre precedida por síntomas menores o malfunciones, y una mayor preocupación en ecología es la frecuencia y la extensión a los cuales las plantas y animales pueden sobrevivir el impacto de la contaminación. Estos efectos subletales pueden ser observados en organismos a nivel bioquímico, fisiológico, ciclo de vida o desarrollo (De la vega, *et al.*, 1997).

Independientemente de la distribución de cada especie de *Drosophila*, estos marcadores pueden ser utilizados por lo menos en el género *Drosophila*, el cual tiene una distribución cosmopolita y ocupa varios ambientes, por lo que puede ser de utilidad para señalar la presencia de agentes con actividad genotóxica en el ambiente.

## VIII. CONCLUSIONES

- 1.- Los principios básicos del desarrollo permiten utilizar diversos organismos para el biomonitoreo ambiental, ampliando las expectativas para alcanzar metodologías aplicables al monitoreo *in situ*.
- 2.- El genero *Drosophila* es un buen punto de partida para comparar el modelo ampliamente estudiado de *Drosophila melanogaster*
- 3.- Es importante tomar en cuenta la plasticidad genética de los insectos, para adquirir resistencia a diferentes compuestos tóxicos.
4. La intensidad de efecto provocado por el tratamiento, depende del metabolismo asociado a los organismos utilizados como bioensayos.
- 5.- *Drosophila virilis* y *Drosophila hydei*, presentan marcadores comunes con *Drosophila melanogaster*.



## IX. REFERENCIAS

Aigaki T y Ohba S (1984a) Individual analysis of age-associated changes in reproductive activity and lifespan of *Drosophila Virilis*. *Experimental Gerontology*, 19: 13-23.

Aigaki T y Ohba S (1984b) Effect of mating status on *Drosophila virilis* lifespan *Experimental Gerontology*. 19: 267-278.

Alexander ML (1976) The Genetics of *Drosophila Virilis*. En *The Genetics and Biology of Drosophila*. (Ashburner M. and Novitski E. eds). Academic Press, London. 1c: 1365-1427.

Andreu JM; Gorbunoff MJ; Medrano FJ; Rossi M; Timasheff SN (1991) Mechanism of Colchicine Binding to Tubulin. Tolerance of Substituents in Ring C' of Biphenyl Analogues. *Biochemistry*. 30: 3777-3786.

Arellano ARO (2002) *Drosophila* como modelo *in vivo* para evaluar el potencial genotóxico de muestras ambientales. Los azufres, Mich. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. D.F. 51 pp.

Avila J (1990) Microtubule Poison. En *Microtubule Proteins*. V. CRC Press, Inc. USA. 270pp.

Ballatori N y Villalobos R (2002) Review, Defining the Molecular and Cellular Basis of Toxicity Using Comparative Models. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 183. 207-220.

Bolognesi C; Landino E; Roggieri P (1999) Role of biological markers in aquatic organism: in situ biomonitoring studies along the ligurian coast. *Mutation Res/ Fundamental and Molecular Mechanism of Mutagenesis*. 379: 1, pp s120.

Boudreau M; Courtenay SC; MacLatchy DL; Bérubé CH; Hewitt ML; Van Der Kraak (2005) Morphological abnormalities during early-life development of the estuarine mummichog, *Fundulus heteroclitus*, as an indicator of androgenic and anti-androgenic endocrine disruption. *Aquatic toxicology*. 77:4, 357-369.

Bruner MA; Rao M; Dumont JN; Hull M; Jones T; Bantle JA (1998) Ground and Surface Water Development Toxicity at a Municipal Landfill: Description and Weather-Related Variation. *Ecotoxicology and environmental safety*. Environmental Research Section B. 39; 215-226.

Butterworth FM; Villalobos PR; Gonsebatt MA (2000) Introduction. En *Biomonitoring and Biomarkers as indicators of environmental Change 2*. (Butterworth F. M.; Gunatilaka A. and Gonsebatt M. E. eds.) Environmental Science Research, New York 56: 1-8.

Calleja M; Renaud O; Usui K; Pistillo D; Morata G; Simpson P (2002) How to pattern an epithelium: lesson from *achaete-scute* regulation on the notum of *Drosophila*. *Gene*. 292. 1-12.

Chouard T y Yaniv M (1981) El control de la expresión de los genes. *Mundo Científico*. No. 149. Vol. 14. 708-717.

Clark AM (1982) The use of larval stages of *Drosophila* screening for some naturally occurring mutagens. *Mutation Res*. 2: 89-97.

De la Vega SM; Martínez TL; Macías GC (1997) Bioaccumulation of Methyl Parathion and Its Toxicology in Several Species of the freshwater Community in Ignacio Ramírez Dam in México. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 38, 53-62.

Demerec M. (ed) (1965) *Biology of Drosophila*. Carnegie Institution of Washington. Hafner Publishing Co., NY. Pp 633.

Denell RE; Brown SJ; Beeman RW (1996) Evolution of the organization and function of insect homeotic complexes. *Seminar in Cell and Developmental Biology*. 7: pp527-538.

Dietrich B (1965) Cap 4. The Postembryonic Development of *Drosophila*. En *Biology of Drosophila* (Demerec, ed). USA, Hafner. 275-302.

Doboule D y Wilkins AS (1998) The evolution of "bricolage". *Trends In Genetics*. Elsevier trends journals 14:2, 54-58

Dumont JN; Schultz TW; Buchanon MV; Kao GL (1983) Frog Embryo Teratogenesis Assay: Xenopus (FETAX)- A short-term assay applicable to complex environmental mixtures. In *Short-term Bioassays in the Analisis of Complex Enviromental mixtures III* (M. D. Waters, S.S. Sandhu, J. Lewtas, L. Claxton, N. Chernoff, and S. Nesnow Eds), pp 393-405, Plenum, New york.

Dunkov BC; Rodriguez-Arnaiz R; Pittendrigh B; French-Constant RH; Feyereisen R (1996) Cytochrome P450 gene cluster in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet*. 251(3): 290-7.

Dunkov BC; Guzov VM; Mocelin G; Shotkoski F; Boun A; Amichot M; French-Constant RH; Feyereisen R (1997) The *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 gene Cyp6a2: structure, localization, heterologous, expression and induction by Phenobarbital. *DNA Cell Biol*. 16(11): 1345-56.

Dvorak Z; Modriansky M; Ulrichova J; Maurel P; Vilarem M-J; Pascussi J-M. (2005) Disruption of microtubules leads to glucocorticoid receptor degradation in HeLa cell line. *Cellular Signalling* 17: 187-196.

Dvorak Z; Ulrichova J, Pichard-García L, Modriansky M; Maurel P (2002) Comparative effect of colchicine and colchicine on cytotoxicity and CYP gene expression in primary human hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 16: 219-227.

Einzinger A; Jungblut B; Sommer RJ (1999) Evolutionary change in the functional specificity of genes. *Review TIG*. 5:5, 197-202.

Evenden AJ y Deplege MH (1997) Genetic Susceptibility in Ecosystems: The Challenge for Ecotoxicology. *Environ. Health Persp Suppl*. 4 (105): 849-854.

Evtodienko YV; Teplova VV; Sidash SS; Ichas F; Mazat JP (1996) Microtubule-active drugs suppress the closure of the permeability transition pore in tumour mitochondria. *FEBS Letters*. 393:86-88.

Ferguson LR; Morcombe P; Triggs CN (1993) The size of cytokinesis-blocked micronuclei in human peripheral blood lymphocytes as a measure of aneuploidy induction by Set A compounds in the EEC trial. *Mutation Res*, 287: 101-112.

Feyereisen R (1999) Insect p450 enzymes. *Annu. Ev. Entomol*. 44:507-33.

Frank MR; Danielson PB; Fogleman JC (1997) Comparison of *Drosophila* Cytochrome p450 Metabolism of Natural and Model Substrates. *J. Insect Physiol*. 43: 10, 953-957.

Frolov MV y Alatortsev VE (1994) Cluster of cytochrome P450 genes on the X Chromosome of *Drosophila melanogaster*. *DNA Cell Biol*. 1994; 13(6):663-8.

Garcia BA y Dapena J (1974) Induction, Detection and Characterization of Cell Differentiation Mutants in *Drosophila*. *Molec. Gen. Get*. 128: 117-130.

Garcia BA y Merriam JR (1971a) Parameters of the Wing Imaginal Disc Development of *Drosophila melanogaster*. *Developmental biology*, 24, 61-87.

Garcia BA y Merriam JR (1971b) Clonal parameters of tergite development in *Drosophila*. *Developmental Biology*. 26: 264-276.

Gilbert SF (2000) *Biología del desarrollo*. trad. Antoni V. Barcelona. 2ª ed. Omega pp. 720.

Griffits JF; Miller JH; Suzuki DT; Lewontin RC; Gelbant WM (2000) *An Introduction to Genetic Analysis*. W. H. Freeman. 7ª. ed. 700-702.

Hess O (1976) Genetics of *Drosophila hydei* Sturtevant. En *The genetics and Biology of Drosophila*. (Ashburner M. and Novitski E. eds). Academic Press, London. 1c: 1343-1363.

Hallare AV; Kosmehl T; Schulze T; Hollert H; Kohler HR; Triebkoin R (2005) Assessing contamination levels of laguna lake sediments (Philippines) using a contact assay with zebra fish (*Danio rerio*) embryos. *Science of the total environment*. 346, 254-271.

Index Merck (1989) Index Merck, Merck & Co., Inc., New York, p 2466.

Jordan MA; Himes RH; Wilson L (1985) Comparison of the Effects of Vinblastine, Vincristine, Vindesine y Vinepidine on Microtubule Dynamics and Cell Proliferation *in Vitro*. *Cancer Research*, 45, 2741-2747).

Kallio M; Sjöblom T; Lähdetie J (1995) Effects of Vinblastine and Colchicine on Male Rat Meiosis In Vivo: Disturbances in spindle Dynamics Causing Micronuclei and Metaphase Arrest. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 25: 106-117.

Kleinjans Jos CS y Van Schooten F (2001) Ecogenotoxicology: the evolving field. *Environmental Toxicology and pharmacology* 11: 3, 173-179.

Leopardi P; Zijno A; Bassani B; Pacchierotti F (1993) In vivo studies on chemically induced aneuploidy in mouse somatic and germinal cells. *Mutation Res.*, 287: 119-130.

Lynch DW, Ronald LS, Ronald DH; Davis DG (1991) Evaluation of *Drosophila* for screening developmenal toxicants: Test results with eighteen chemicals and presentation of a new *Drosophila* bioassay. *Terat. Carcinog, and Mutag.* 11: 147-173.

Lynch AM & Parry JM (1993) The cytochalasin-B micronucleus/Kinetochores assay in vitro: Studies with 10 suspected aneugens. *Mutation Res*, 287: 71-86.

Lynch J & Desplan C (2003) Evolution of Development: Beyond Bicoid. *Current Biology*. 13, R557-R559.

Markow T, (1996) Evolution of *Drosophila* Mating System. En *Evolutionary Biology*, Plenum Press, 29. New York, E.U. pp. 73-106.

Martinez AA & Stewart A (2002) The Molecular Principles of Animal Development. Oxford University Press. New York. E.U. pp.410.

Mc Ginnis W & Kuziora M (1994) Arquitectos Moleculares del Diseño Corporal. *Investigación y Ciencia*. No. 211. 22-28.

Muñoz HA (1997) Comparación del potencial aneuploidogénico de compuestos citostáticos en células de alas de *Drosophila melanogaster*. Tesis maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. México D.F. 70pp.

Muñoz HA; Hernández BB; Rivas MH; Herrera BJ; Ramos MP. (2003) *Drosophila*: Una alternativa *in vivo* para la evaluación de actividad teratogénica. Congreso de la Sociedad Mexicana de Genética, Morelia. Michoacán.

Nishigaki N, Chang Ch, Ichikawa A; Negishi M (1998) Cytoskeletal regulation of the signal transduction of prostaglandin EP4 receptor. *Biochimica et Biophysica Acta* 1391. 110-116.

Nöthinger (1970) Sucrose density separation: A method for collecting large number of *Drosophila* larvae. *DIS* 45:177.

Ohe T; Watanabe T; Wakabayashi K (2004) Mutagens in surface waters: a review. *Review in Mutation Res.* 567:2, 109-149.

Patterson JT (1943) Studies in the genetics of *Drosophila* III. The *Drosophilidae* of the Southwest. The University of Texas Publication. No. 4313. pp. 326.

Ramos-Morales P; Ordaz MG; Dorantes A; Rivas H; Campos P; Matinez M; Hernández B (2000) *Drosophila* is a Reliable Biomonitor of Water Pollution. En *Biomonitoring and Biomarkers as indicators of environmental Change 2.* (Butterworth F. M.; Gunatilaka A. and Gonsebatt M. E. eds.) *Environmental Science Research*, New York 56: 257-299.

Ramos-Morales P; Herrera-Bazan JJH; Muñoz-Hernández A; Muñoz Moya JA; García Martínez V; Rivas-Martínez H; Hernández-Bernal BR. (2005) Thalidomide Induces Malformations, Somatic Recombination and Interferences the Fertility of Flies Exposed Through Development. *Mutation Research, Fundamental and Molecular Mechanism of Mutagenesis. The Abstracts of the 9<sup>th</sup> International conference on environmental Mutagens and 36<sup>th</sup> Annual Meeting Environmental Mutagen Society.* P. 46.

Ramos-Morales P (2005) Estrategias para la evaluación del impacto *in vivo* de genotóxicos ambientales utilizando insectos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental.* Vol. 21 (1). Resúmenes carteles X Congreso Nacional y IV Internacional de Ciencias Ambientales. Pp 307.

Sathe SS & Harte JP (1995) The extra sex bombs protein is highly conserved between *Drosophila virilis* and *Drosophila melanogaster*. *Mechanism of development.* 53: 1 113-122.

Sbrana I; Di Sibio A; Lomi A; Scarcelli V (1993) C-Mitosis and numerical chromosome aberration analyses in human lymphocytes: 10 known or suspected spindle poisons. *Mutation Res.* 287: 57-70.

Sieber SM; Whang-Peng J; Botkin C; Knutsen T (1978) Teratogenic and Cytogenetic effects of some plant-derived antitumor agents (vincristine, colchicine, maytansine, VP-16-213 and VM-26) in mice. *Teratology* 18: 31-47.

Skoufias DA & Wilson L (1992) Mechanism of Inhibition of Microtubule Polymerization by Colchicine: Inhibitory Potencies of Unliganded Colchicine and Tubulin-Colchicine Complexes. *Biochemistry.*, 31: 3, 738-745.

Stone AA & Chambers TC (2000) Microtubule Inhibitors Elicit Differential Effects on MAP Kinase (JNK, ERK, and p38) Signaling Pathways in human KB-3 Carcinoma Cells. *Experimental Cell Research* 254, 110-119.

Tateishi T; Soucek P; Caraco Y; Guengerich FP; Wood AJJ (1997) Colchicine biotransformation by human liver microsomes *Biochemical Pharmacology* 53, 11-116.

TDSC. Tucson *Drosophila* Stock Center. *Drosophila* Species Workshop. 2004. University of Arizona. pp 86.

Tepperberg JH; Moses MJ; Nath J (1997) Colchicine effects on meiosis in the male mouse. *Chromosoma*. 106: 183-192.

Thiébot B; Bilinska B; Langris M, Bocquet J; Carreau S (1999) Drug-induced alterations in rat peritubular cell cytoskeleton result in proteoglycan synthesis modifications. Comparison with some intracellular signaling pathways. *Biology of the cell*. 91: 117-129.

Tillib S; Sedkov Y; Mizrokhi L; Mazo A (1995) Conservation of structure and expression of the trithorax gene between *Drosophila virilis* and *Drosophila melanogaster*. *Mechanism of development*. 52:2. 225-232.

Thompson JN; Hellack JJ; Kennedy JS (1982). Polygenic Analysis of Pattern Formation in *Drosophila*: Specification of Campaniform Sensilla Position on the Wing. *Developmental Genetics*. 3: 115-128.

Vogel E (1998). Summary report on the performance of the *Drosophila* assays. En: Ashby J., de Serres F., Shelby M., Margolin B., Ishidate M., and Becking G (1998). Evaluation of short-term test for carcinogens. WHO, Cambridge University Press. 2227-2285.

Warren Robert & Carroll Sean (1995) Homeotic genes and diversification of the insect body plan. *Current opinion in genetics and Development*. 5:4. p 459-465.

Wheeler MR. (1981). Cap. 95 *Drosophilidae*. En *Manual of Nearctic Diptera*. Research Branch Agricultural Canada. 1:27. 1011-1018.

White AH; Aspland SE; Brookman JJ; Clayton L; Sproat G (2000) The design and analysis of a homeotic response element. *Mechanism of Development*. 91. 217-226.

WHO (1984) Principles for Evaluating Health Risk to Progeny Associated with Exposure to Chemicals During Pregnancy. World Health Organization, Genova, 175 pp.

Wilson TG (2001) Resistance of *Drosophila* to Toxins. Annual Review of Entomology. 46: 545-71.

Yamamoto KI & Kikuchi Y (1980) A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisins. Mutation Research. 71 (1):127-31.

Zijno A; Marcon F; Leopardi P and Crebelli R (1996) Analysis of chromosome segregation in cytokinesis-blocked human lymphocytes: non-disjunction is the prevalent damage resulting from low dose exposure to spindle poison. Environmental Mutagen Society/Oxford University Press. 335.