

00361



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFFECTO PROTECTOR DE LA VITAMINA E Y DE LOS  
b-CAROTENOS EN CONTRA DE LA MUTAGENICIDAD  
DE LA MITOMICINA-C (MMC) EN LA PRUEBA  
SOMATICA DE ALA DE *Drosophila melanogaster*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS  
( B I O L O G I A )  
P R E S E N T A :  
BIOL. PATRICIA GUADALUPE OROZCO SOTO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ROSARIO RODRIGUEZ-ARNAIZ

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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

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

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

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

## INDICE

	página
RESUMEN	11
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	27
HIPOTESIS	28
MATERIAL Y METODO	28
RESULTADOS	35
DISCUSION	37
CONCLUSIONES	46
REFERENCIAS	47
FIGURAS	62
TABLAS	99

## RESUMEN

Dado que existen numerosos reportes en la literatura sobre la actividad antimutagénica de algunas vitaminas y provitaminas, en el presente trabajo se evaluó, mediante la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en células de ala de *Drosophila melanogaster*, el efecto protector o antimutagénico de la vitamina E y de los  $\beta$ -carotenos sobre la genotoxicidad de la mitomicina-C (MMC).

Se trataron larvas transheterocigóticas *mwh +/+ flr<sup>3</sup>* de 72<sup>+</sup>4 horas de edad. Se realizaron dos tipos de exposición: 1) tratamiento agudo (6 horas) con el mutágeno de referencia (MMC) y la administración posterior subcrónica de la vitamina E 6 de los  $\beta$ -carotenos y 2) tratamiento subcrónico con una mezcla del mutágeno de referencia y de cada una de las vitaminas.

Se corrieron los testigos concurrentes respectivos tanto negativos con los disolventes empleados (Sacarosa al 5%, etanol al 5% y etanol-tween 3:1) como positivo con el mutágeno de referencia (MMC).

Las concentraciones utilizadas en ambos tipos de tratamientos fueron 100 ppm para cada vitamina y 0.625 mM para el testigo positivo.

Se cuantificaron la cantidad y la frecuencia de manchas sencillas (chicas y grandes) y gemelas en cada uno de los lotes experimentales y testigos, encontrándose un efecto inhibidor de las dos vitaminas sobre la genotoxicidad de la MMC, siendo más efectivos en esta inhibición los  $\beta$ -carotenos que la vitamina E en los dos tipos de tratamiento.

De igual manera el presente trabajo también demuestra la utilidad de la prueba de mutación y recombinación somática para los análisis genotóxicos de mezclas de compuestos químicos y en la detección de agentes antimutagénicos.

## INTRODUCCION

A partir de la década de los 60's en que comenzaron los estudios sobre los efectos de mutágenos químicos se ha mostrado, en diferentes organismos experimentales, que existen numerosos agentes químicos en el ambiente que poseen una potente actividad mutagénica, los cuales se encuentran entre las sustancias empleadas como aditivos de alimentos, cosméticos, medicamentos, pesticidas e incluso entre los contaminantes ambientales (De Serres, 1979).

La presencia de estos compuestos en el medio es importante por el riesgo genético que representan, puesto que el daño que se le puede ocasionar a un individuo a través de la inducción de mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas en las células somáticas podría causar el desarrollo de cáncer (Fig.1) (Loprieno, 1980; De Flora y Ramel, 1988) o bien mediante la producción de mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas en células germinales, afectar a las futuras generaciones ya que se producen alteraciones heredables (Loprieno, 1980) (Fig.2)

Un aspecto de mayor preocupación en cuanto a la exposición humana a estos agentes es la alta correlación que se

ha encontrado entre la actividad mutagénica y la carcinogénica (Ames et al. 1973; Ames, 1979; De Serres, 1979; Maron y Ames, 1983).

La producción de daño genético en células somáticas (carcinogénesis) o en células germinales (mutagénesis) está determinada por muchos factores, a saber: (Fig.3)

- Ruta de administración, forma de aplicación, tasa de adsorción, distribución y eliminación.

- Biotransformación (activación metabólica y desactivación).

- El tipo de interacción con el ADN (radicales libres, intercalación electrofílica).

- Tasa de reacción con el ADN y otras biomoléculas.

- Tipo y distribución de aductos del ADN.

- Participación de daño secundario al ADN (ligamientos cruzados, sitios apurínicos).

- Reparación del ADN (sujeta a error, libre de error o falta de reparación).

- Tasa de división celular.

- Expresión del daño genético.

- Tiempo transcurrido entre el tratamiento y el efecto genético.

Estos procesos están influidos por una variedad de parámetros químicos tales como:

- Lipofilicidad.

- Factores estéricos.

- Interacción con enzimas.
- Reactividad absoluta y relativa.
- Actividad óptica.
- Mono o multifuncionalidad. (Zijlstra, 1987; Waters et al. 1990).

También se ha reportado que la dieta humana contiene gran variedad de mutágenos y carcinógenos naturales, de los cuales algunos pueden actuar mediante la generación de radicales libres, pudiendo funcionar como iniciadores endógenos de procesos degenerativos tales como daño al ADN, mutación y promoción, los cuales están relacionados con el cáncer, las enfermedades del corazón y el envejecimiento (Ames, 1983; Carr, 1985).

Debido a la alta incidencia de cáncer, la investigación acerca de los agentes que puedan combatirlo se ha ido incrementando, de modo que en la actualidad se utilizan una gran variedad de sustancias en la quimioterapia del cáncer, incluyéndose entre ellas antimutágenos y anticarcinógenos naturales (Ames, 1983; Carr, 1985).

Entre los diferentes tipos de agentes antitumorales se encuentran:

a) Agentes alquilantes.- La mayoría de los agentes alquilantes efectivos son bi o tri funcionales. Estos agentes tienen la capacidad de actuar a temperatura corporal y en condiciones acuosas neutrales, su forma de acción es mediante su interacción con la información genética de la célula, es

decir alquilan el ADN. La actividad biológica de los grupos alquilantes está determinada tanto por su reactividad química como por la naturaleza de la estructura transportadora (aminoácidos, péptidos, carbohidratos, esteroides y compuestos heterocíclicos) (Stock, 1970; Hellman, 1972; Kupchan, 1974; Sainsbury, 1979; Ames, 1983; Carr, 1985).

Dentro de este grupo se encuentran compuestos que reaccionan directamente una vez introducidos en el cuerpo o bien aquellos que son inicialmente inactivos, pero que son activados de manera selectiva dentro del tumor (Stock, 1970; Pratt y Ruddon, 1979).

b) Antimetabolitos.- Son compuestos que poseen una estructura molecular semejante a los metabolitos de la célula pero que interfieren con las funciones de los propios metabolitos (Stock, 1970).

c) Hormonas.- Se ha descrito que tumores que surgen en tejidos normalmente susceptibles al ambiente hormonal tienden a responder al tratamiento con hormonas, principalmente en estadios tempranos del desarrollo tumoral. Los principales ejemplos son cáncer de mama, endometrio y cáncer de próstata (Stock, 1970).

d) Enzimas.- En 1953 se reportó que el suero de cuyos causa la regresión o inhibición de ciertos tipos de linfomas de rata y ratón. El material activo fue la L-asparaginasa. En la actualidad ésta enzima es producida en gran escala a partir de fuentes bacterianas y es útil en el tratamiento clínico de la



leucemia aguda. Su actividad aparentemente se debe a la destrucción de la asparagina. Los experimentos con animales de laboratorio han demostrado que es poco tóxica, selectiva e inocua, aunque también se ha observado resistencia a la enzima (Stock, 1970; Hellman, 1972; Pratt y Ruddon, 1979).

e) Antibióticos.- Los antibióticos antitumorales difieren de los utilizados contra las bacterias en que los primeros son marcadamente tóxicos para las células de mamíferos. Generalmente actúan en un punto específico del ciclo celular (metafase), aunque muestran múltiples efectos bioquímicos, los cuales incluyen la interferencia con la síntesis de ADN y ARN (Stock, 1970; Pratt y Ruddon, 1979).

f) Productos extraídos de plantas.- Se ha demostrado que las fracciones de alcaloides extraídas del mirto (Vinca rosea), tienen propiedades antileucémicas en el ratón (Pratt y Ruddon, 1979).

Actualmente la vinblastina y la vincristina juegan un papel importante en el tratamiento de leucemias, linfomas, cáncer de mama y melanoma maligno (Carter y Livingston, 1976).

La inducción de tumores por compuestos químicos en animales se considera un proceso de pasos múltiples y que requiere del factor tiempo para manifestarse.

Muchos de los carcinógenos que han sido probados se modifican químicamente por el tejido para adquirir una forma reactiva (activación metabólica), antes de que puedan ejercer su carcinogenicidad. Especialmente los compuestos lipofílicos

son extensamente metabolizados a través de enzimas oxidantes que introducen grupos hidroxilo en la molécula, ya sea mediante inserción directa de un átomo de oxígeno en un enlace C-H ó a través de epoxidación de un enlace insaturado seguido por hidrólisis espontánea o enzimática. La oxidación de esos compuestos da como resultado metabolitos con una mayor solubilidad en agua con lo cual se hace más fácil su excreción (Fig.4), sin embargo los productos lipofílicos tienden a acumularse en el cuerpo en tejidos ricos en grasas.

Esa activación metabólica puede requerir varios pasos y provocar un producto electrofílico que se une covalentemente con macromoléculas críticas como el ADN.

Después de un tiempo variable la célula alterada expresa nuevas características fenotípicas que resultan en un patrón de crecimiento diferente, los eventos bioquímicos mediante los cuales ésto sucede son desconocidos, sin embargo las interacciones de una célula con un carcinógeno pueden estar influidas en principio, por una variedad de factores nutricionales.

Las oxidasas microsómicas de función mezclada constituyen un sistema que posee muchas de las enzimas capaces de activar carcinógenos a su forma reactiva. Este sistema enzimático está localizado en el retículo endoplásmico de la célula y convierte frecuentemente a los carcinógenos lipofílicos en compuestos más hidrofílicos con lo cual pueden entonces entrar a sistemas acuosos de reacción (Zijlstra, 1987)

(Fig.5).

El tipo de dieta puede influir en la ocurrencia, dosis y exposición a carcinógenos (Hayatsu et al. 1988), por lo que los constituyentes de la misma pueden modular la actividad de enzimas activadas por carcinógenos (Carr, 1985).

Los seres humanos poseen varios mecanismos de defensa para protegerse contra mutágenos, carcinógenos y otras sustancias tóxicas, entre ellos se encuentran:

1) Eliminación sin cambios (aire expirado, orina, heces, sudoración, vómito, uñas, pelo y leche).

2) Modificación de la estructura haciéndola más soluble en agua para facilitar la excreción por vía urinaria.

3) Cambio de la estructura para su desintoxicación.

4) Descamación de las capas superficiales de la piel, estómago, córnea, intestinos y colon (Norton, 1975).

Entre las defensas más importantes están aquellas contra radicales oxígeno y peroxidación de los lípidos (Fig.6) que son los mayores contribuyentes de daño al ADN. Las fuentes endógenas principales de radicales oxígeno son los peróxidos y los superóxidos generados como producto del metabolismo.

En la actualidad se está expuesto a oxidantes tanto de origen endógeno como exógeno, los que contribuyen al desarrollo o exacerbación de muchas de las enfermedades que aquejan a los seres humanos y que están asociadas con el envejecimiento, incluyendo cáncer, ataques al corazón, artritis, fracturas óseas y cataratas (Cerrutti et al. 1983;

Cerrutti, 1985; Frei et al. 1988).

Las fuentes endógenas de este tipo de compuestos incluyen la respiración mitocondrial, enzimas tales como lipoxigenasas y oxidasa xantina y el sistema NADPH oxidasa/mieloperoxidasa de los fagocitos (Frei et al. 1989). Algunas fuentes exógenas de oxidantes son los constituyentes de la dieta, la radiación U.V., los gases radioactivos y los contaminantes ambientales, como el humo de los vehículos automotores y el del cigarro (Ames, 1983).

El plasma humano está dotado de una variedad de mecanismos antioxidantes de defensa, entre ellos se encuentran: varias moléculas pequeñas algunas de las cuales son productos del metabolismo como la bilirrubina y los uratos (DeLange y Glazer, 1989), albúmina, ascorbato, y  $\alpha$ -tocoferol, se ha sugerido así mismo que los grupos sulfhidrilo de las proteínas contribuyen significativamente a la capacidad antioxidante del plasma (Wayner et al. 1987), aunque su oxidación podría causar daño oxidante dependiendo de la proteína afectada. La transferrina y la ceruloplasmina son consideradas también antioxidantes porque atrapan metales de transición evitando que éstos participen en reacciones de radicales libres.

Muchas enzimas protegen a las células del daño oxidante entre otras la superóxido desmutasa extracelular, la glutatión peroxidasa dependiente del selenio, la diaforasa D.T. y la glutatión transferasa (Ames, 1983; Karlsson y Marklund, 1987; Maddipati y Marnett, 1987).

Además la incorporación dentro de la dieta de antioxidantes naturales es un aspecto importante que favorece los mecanismos de defensa del cuerpo contra los agentes oxidantes sean naturales o no. Varios de ellos están siendo identificados como antimutágenos y anticarcinógenos (Ames, 1983; De Flora y Ramel, 1988) (Fig.7 y tabla 1)

El término antimutágeno se utilizó originalmente para describir aquellos agentes que reducen la frecuencia o la tasa de mutaciones inducidas o espontáneas, independientemente de los mecanismos involucrados (Novick y Szilard, 1952).

Los mecanismos de inhibición de la mutagénesis y de la carcinogénesis son muy variados y dependen de la etapa en que intervienen durante el proceso mutagénico y carcinogénico, de los patrones de modulación, de las estrategias de defensa del huésped y que incluyen aquellos que actúan extracelularmente (Ramel, 1986) también llamados por Kada et al. (1982) desmutágenos y cuya actividad se puede encontrar a diferentes niveles, a saber:

- Inhibiendo la entrada de los mutágenos o de sus precursores.

- Inhibiendo la formación endógena de mutágenos

- Desactivando mutágenos.

Hasta los que pueden actuar intracelularmente (Ramel, 1986), siendo éstos los antimutágenos o bioantimutágenos (Kada et al. 1982) cuyos mecanismos pueden ser los siguientes:

- Modulando el metabolismo.
- Bloqueando moléculas reactivas.
- Modulando la replicación del ADN o la reparación.

E incluso actuando sobre células neoplásicas iniciadas llamados entonces agentes supresores (Wattenberg, 1981), cuya acción puede ser mediante:

- Modulación de la promoción tumoral.
- Modulación de la progresión tumoral.

Sin embargo es necesario mencionar que existen antimutágenos y anticarcinógenos que actúan a través de mecanismos múltiples, abarcando un amplio rango de niveles de intervención (De Flora y Ramel, 1988).

Entre los diferentes antimutágenos y anticarcinógenos se han reportado a las vitaminas A,C,D y E, así como a los  $\beta$ -carotenos (Lai et al. 1980; Ames, 1983; Carr, 1985; Ong et al. 1986; De Flora y Ramel, 1988; Ong et al. 1989).

Asimismo las vitaminas A y E y los retinoides son clasificados como agentes supresores de cáncer (De Flora y Ramel, 1988).

El término vitamina es aplicado a un grupo de sustancias orgánicas que participan en cantidad muy pequeña en las funciones normales de las células, las cuales no pueden ser sintetizadas por algunos organismos y por ello deben obtenerlas de la dieta (Lehninger, 1985) por lo cual se han llamado factores alimenticios accesorios (Devore y Muñoz-Mena, 1974).

Algunas se encuentran como provitaminas inactivas,

que el organismo transforma a través del metabolismo en la vitamina activa correspondiente.

Las vitaminas se dividen en dos clases: hidrosolubles y liposolubles. Las hidrosolubles son entre otras B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, ácido nicotínico, ácido pantoténico, B<sub>6</sub>, biotina, ácido fólico, B<sub>12</sub>, y la C, casi todas tienen función de coenzimas.

A las liposolubles pertenecen las vitaminas A, D, E y K, sus funciones bioquímicas no son bien conocidas.

La vitamina E se forma biológicamente a partir de unidades de isopreno, está constituida por lo menos por tres tipos, los  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  tocoferoles, de los cuales el más importante es el  $\alpha$ -tocoferol que es un fenol altamente lipofílico (Fig.8) y que se oxida rápidamente a  $\alpha$ -tocoquinona y a tocoferonolactona (Mirvirsh, 1986) (Fig.9). Los tocoferoles se encuentran en los aceites vegetales y son especialmente abundantes en el germen de trigo, maíz, aceites de algodón y palma, en las hojas de lechuga, espinacas, berros y en la yema de huevo, su biosíntesis se muestra en la figura 10.

La concentración diaria recomendada por el Consejo de Alimentos y Nutrición de la Academia Nacional de Ciencias de EUA es de 8 mg de  $\alpha$ -tocoferol para mujeres y de 10 mg para hombres (Bieri *et al.* 1983).

La absorción en humanos depende de su capacidad para digerir y absorber a las grasas por lo cual la bilis es esencial para su absorción (Gallo-Torres, 1970).

Los tocoferoles esterificados son hidrolizados en el

intestino y únicamente los tocoferoles libres aparecen en la linfa (Blomstrand y Forsgren, 1968). El tocoferol es transportado a la circulación por quilomicrones en donde rápidamente se equilibra con lipoproteínas del plasma, principalmente aquellas de baja densidad. El tocoferol circulante se acumula lentamente en los tejidos y aunque no existe un órgano de depositación de la vitamina E, en términos de cantidades absolutas, el tejido adiposo, el hígado y el músculo contienen la mayor parte (Bieri et al. 1983).

La deficiencia en tocoferol provoca varios trastornos entre ellos la degeneración del hígado y alteraciones en las funciones de las membranas, en ratas produce esterilidad, necrosis hepática, distrofia muscular y fragilidad eritrocítica (Bieri et al. 1983; Mirvish y Laughlin, 1986).

La acción bioquímica de la vitamina E es básicamente antioxidante, participa muy activamente en la prevención de ataques destructivos del oxígeno sobre los lípidos de las membranas celulares (Devore y Muñoz-Mena, 1974; Summerfield y Tappel, 1984; Leghninger, 1985; Lieber et al. 1986; Dean y Cheeseman, 1987) se considera que la vitamina E es la principal atrapadora de radicales libres y peróxidos lipídicos de las membranas, por ello ha sido usada clínicamente para tratar una gran variedad de enfermedades relacionadas con la oxidación (Mirvish, 1986).

La vitamina E disminuye tanto el daño cardíaco como la carcinogenicidad de las quinonas, de la adriamicina y de la



daunomicina que al parecer es provocado por la generación de radicales libres (Ames, 1983; Bieri et al. 1983). También inhibe la agregación de plaquetas *in vitro* (Steiner y Anastasi, 1976). Corrigan (1982) reporta que concentraciones altas de vitamina E pueden reducir la absorción intestinal de las vitaminas A y K; el  $\alpha$ -tocoferol tiene un efecto antagónico sobre la función de la vitamina K el cual se da sobre la formación de protrombina.

La vitamina E ha sido efectiva en la reducción de aberraciones cromosómicas inducidas en plantas y animales por cromo y por radiación ionizante (Alekperov, 1976; Alekperov y Akhundova, 1974; Gebbhart et al. 1985; Borek et al. 1986) y en cultivos celulares de mamíferos que fueron tratados con dimetilbenzatraceno (Shamburger et al. 1973) y con cromo (Sugiyama et al. 1989, 1991), así como en la disminución de las mutaciones inducidas en el locus HGPRT (Sugiyama et al. 1991).

Estudios con animales de laboratorio han mostrado que dosis por arriba de la usual refuerza la protección contra varios agentes químicos tóxicos, incluyendo metales como la plata, el mercurio y el plomo (Horwitt y Mason, 1972) o compuestos hepatotóxicos como el tetracloruro de carbono, el benceno, el cresol y algunas drogas (Plaa y Witschi, 1976).

En *Salmonella* el tratamiento con tocoferol reduce la frecuencia de mutaciones por corrimiento del marco de lectura, adiciones y deleciones, inducidas por malonaldehído y  $\beta$ -propiolactona (Shamburger et al. 1979)

En *Drosophila melanogaster* se ha observado la

reducción drástica de letales recesivos ligados al sexo, al tratar a hembras con medio al que se le ha añadido tocoferol (Beckman et al. 1982).

Fonck y Konings (1978) sugieren un posible papel de la vitamina E en los procesos de reparación del ADN además de su efecto antioxidante.

También se ha reportado que tiene acción anticlastogénica en cultivos de linfocitos humanos tratados con trenimon y ciclofosfamida (Shamburger et al. 1973; Alekperov, 1976; Smalls y Pettersen, 1982; Gebhart et al. 1985) y en células de mamífero inhibe significativamente algunos tipos de aberraciones cromosómicas inducidas por sulfuro de níquel (Lin et al. 1991).

Haber y Wissler (1962) describen la inhibición de la actividad carcinogénica del metilcolantreno en ratones tratados con  $\alpha$ -tocoferol, también ha mostrado ser un fuerte inhibidor de las reacciones de nitrosación por lo cual puede afectar directamente la carcinogenicidad de compuestos N-nitrosos ya preformados e incluso puede alterar la formación de los mismos y de otros carcinógenos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Mirvish, 1975, 1986).

De igual manera se han reportado efectos protectores contra el daño provocado por radiación y contra la mutagenicidad y la carcinogenicidad inducida por la dimetilhidrazina (Ames, 1983).

Ip (1985) encuentra que la vitamina E cuando se

administra simultáneamente con selenio es anticarcinogénica. El efecto primario de dicha vitamina sobre la carcinogénesis puede ser una consecuencia de su acción a nivel de la promoción, notándose además efectos aditivos cuando se emplea vitamina E, glutatión y trióxido sódico de selenio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) (Perchellet et al. 1985, 1987).

Los  $\beta$ -carotenos son compuestos terpénicos de origen vegetal, formados por moléculas de isopreno, son básicamente tetraterpenos isómeros del licopeno (Fig.11).

Son sustancias pigmentadas muy probablemente debido a los dobles enlaces conjugados que contienen, se han encontrado en hojas de vegetales verdes, en la zanahoria, en flores y frutos rojos y amarillos, en la leche y en el suero sanguíneo (Devore y Muñoz-Mena, 1974; Raj y Katz, 1985).

Los carotenoides son sintetizados en plantas y microorganismos a partir de acetil-coenzima-A por una serie de reacciones de condensación bien definidas (Spurgeon y Porter, 1983), como se muestra en las figuras 12 y 13.

El  $\beta$ -caroteno es una provitamina que se oxida principalmente en el intestino y en menor medida en el hígado, dando origen a la vitamina A (Peto et al. 1981).

Glover (1960) indica que pueden ocurrir dos reacciones oxidantes, una en el doble enlace central 15,15' (división central) y la otra en 1 ó más de los otros dobles enlaces (división excéntrica), de éstas dos posibles vías la más aceptada es la de la división central, la cual dá como

resultado dos moléculas de retinal, la enzima que lleva a cabo dicha reacción es la  $\beta$ -carotenoide 15,15' dioxigenasa (Figs.14 y 15).

La mayoría de los carotenoides ingeridos por los mamíferos no son precursores de vitamina A (Allen, 1989). Se ha demostrado que varios factores afectan el metabolismo y la excreción de los  $\beta$ -carotenos, por ejemplo: la diabetes, enfermedades de la tiroides y la anorexia nerviosa.

La Organización Mundial de la Salud, recomienda que la ingesta diaria de  $\beta$ -carotenos para un adulto de 70 kg debe ser de 350 mg/día, la deficiencia de éstos puede causar xerofthalmia, queratomalacia y ceguera (Peto et al. 1981).

Los  $\beta$ -carotenos son antioxidantes y representan un factor importante en la protección de la grasa corporal y de los lípidos de la membrana contra la oxidación. Los carotenoides son atrapadores de radicales libres y eficientes represores de oxígeno molecular, que es una forma muy reactiva de oxígeno, el cual es mutagénico y particularmente eficaz para producir peroxidación de los lípidos (Parcker et al. 1981; Peto et al. 1981; Krinsky y Deneke, 1982; Ames, 1983; Burton e Ingold, 1984).

Los carotenoides pueden clasificarse en 4 tipos de acuerdo con su acción biológica

1. Activos biológica y nutricionalmente ( $\beta$ -carotenos).
2. Activos biológicamente, pero nutricionalmente inactivos, por lo menos en mamíferos (cantaxantina).

3. Biológicamente inactivos pero nutricionalmente activos ( $\beta$ -apo-14' carotenal).

4. Inactivos biológica y nutricionalmente (fitoeno) (Allen, 1989).

El plasma humano contiene una mezcla compleja de carotenoides estructuralmente diversos, entre ellos:  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -carotenos, licopeno, criptoxantina y luteína, encontrándose una variabilidad interindividual significativa en las concentraciones de éstos (Kläui y Bauernfeind, 1981), los cuales además parecen ser transportados en el plasma humano exclusivamente por lipoproteínas, principalmente de baja densidad.

En cuanto a los sitios cuantitativamente más importantes de depósito de carotenoides en el ser humano están el tejido adiposo y el hígado, siendo éstos los mismos que se encuentran en el plasma e incluyen: luteína, criptoxantina, zeinoxantina, licopeno,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y 3 ó 4 carotenoides polares no identificados (Allen, 1989).

Mathews-Roth (1975 y 1982) reporta la presencia de carotenoides en las membranas de eritrocitos y leucocitos. Los  $\beta$ -carotenos pueden reforzar la respuesta inmune en animales tratados tanto *in vivo* como *in vitro* (Bendich, 1989).

Entre las plantas, los carotenos parecen ser la defensa principal contra el oxígeno molecular que se genera como producto de la interacción entre la luz y la clorofila (Peto *et al.* 1981).

Los carotenoides han mostrado ser anticarcinógenos en ratas y ratones y pueden serlo en los seres humanos, ya que han sido utilizados en el tratamiento de algunas enfermedades genéticas, tales como las porfirias en las que existe una marcada fotosensibilidad debida a la formación de oxígeno molecular (Ames, 1983).

Estudios epidemiológicos han demostrado que la ingesta diaria de vitamina A, incluyendo  $\beta$ -carotenos está asociada con una disminución del riesgo de presentar cáncer en humanos (Hirayama, 1979; Mettlin et al. 1979; Peto et al. 1981; Shekelle et al. 1981; Kvale et al. 1983; Stich et al. 1985).

Así mismo se ha mostrado que bajos niveles de  $\beta$ -carotenos en el suero o en el plasma están asociados con el desarrollo de cáncer de pulmón; relaciones de éste tipo se han descrito también para cáncer de estómago y de mama aunque no en forma tan concluyente como para el cáncer de pulmón (Ziegler, 1989)

Se ha reportado actividad antitumoral en ratones y ratas (Epstein, 1977; SantaMaría et al. 1981; Mathews-Roth, 1982; Mathews-Roth y Krinsky, 1985; Manoharan y Bannerjee, 1985).

Stich et al. (1984, 1985) muestran la disminución significativa de micronúcleos, en individuos fumadores de tabaco a los que se les administra en su dieta  $\beta$ -caroteno durante nueve semanas.

También se ha mencionado la actividad inhibidora del  $\beta$ -caroteno sobre rompimientos cromosómicos inducidos por

benzo(a)pireno y mitomicina-C en médula ósea de ratón (Raj y Katz, 1985), y la reducción de intercambios de cromátidas hermanas en células de ovario de criceto sujetas a especies activas de oxígeno (Weitberg et al. 1985).

En animales de laboratorio, Alam y Alam (1987) encontraron una disminución en el número de tumores de glándulas salivales inducido por dimetil benzatraceno y Temple y Basu (1987) demuestran la protección de los  $\beta$ -carotenos contra la inducción de cáncer de colon por agentes químicos.

Se ha sugerido que los efectos de los  $\beta$ -carotenos sobre la carcinogénesis, pueden ser mediante la interferencia en la fase de promoción del cáncer (Krinsky, 1989) ya que con frecuencia prolonga el período de latencia (Dorogokupla et al. 1973; Rieder et al. 1983). Peto et al. (1981) proponen sin embargo, que el efecto protector se produce sobre los últimos estados de la progresión neoplásica y en el proceso final del crecimiento tumoral.

Entre los agentes antitumorales ya se han mencionado a los antibióticos, uno de ellos es la mitomicina-C, aislada de *Streptomyces caesipitosus* que se emplea frecuentemente en la quimioterapia

Las mitomicinas son sustancias básicas coloreadas que forman placas o cristales en aguja de color rojo-violeta.

Este tipo de antibiótico representa el primer ejemplo de la formación por un sistema microbiano de un grupo aziridina, el sistema de anillos indol-pirrol (1,2, $\alpha$ ), una

aminobenzoquinona y una pirrolizina. El núcleo común de la mitomicina es llamado mitozano, la mitomicina-C se emplea en el tratamiento de adenocarcinomas de estómago, páncreas, pulmones, cuello uterino, de la leucemia mieloide crónica y en la enfermedad de Hodgkin, así como profiláctico después de la cirugía o de la irradiación de sarcomas, epitelomas y carcinomas de orígenes variados (Adler, 1981; Salmon y Sartorelli, 1990). Se usa como testigo positivo en muchas pruebas tales como las bacterianas y los cultivos celulares de linfocitos, fibroblastos, etc en donde actúa como agente alquilante monofuncional.

La mitomicina-C (MMC) requiere ser activada antes de que pueda funcionar como agente alquilante bifuncional (cross-linker) (Adler, 1981). El proceso de activación es mediado por la enzima citocromo c- reductasa-NADPH, se reduce a su derivado hidroquinona por una de las enzimas pertenecientes al grupo de quinonas reductasas (diaforasas), esto facilita una protonación del nitrógeno aziridina promoviendo la alquilación intracelular de centros nucleofílicos (Fig.16), el proceso de activación puede ser revertido por O<sub>2</sub> (Pan et al. 1984; Keyes et al. 1984; Marshall y Rauth, 1986).

La mitomicina-C es soluble en agua e inestable en condiciones ligeramente ácidas. La molécula activada de MMC inhibe la síntesis de ADN en organismos susceptibles y conduce a rompimiento extenso del ADN *in vitro*. A niveles altos de MMC



se suprime la síntesis del ARN y de las proteínas. La MMC actúa como un agente alquilante mono o bifuncional, produciendo ligamientos ó enlaces cruzados DNA-DNA ó DNA-proteínas o uniéndose a una base sencilla del ADN por alquilación del O<sup>6</sup> de la guanina, también se pueden producir monoadductos en el ADN, proteínas alquiladas y especies citotóxicas de oxígeno. Se ha visto que la toxicidad de la MMC se incrementa en las células hipóxicas *in vitro* (Kennedy et al. 1980; Marshall y Rauth, 1986) (Fig.17).

En *E. coli* cepa K-12 tratada con MMC el ADN que ha sido ligado de manera cruzada o alquilado monofuncionalmente es reparado por un proceso que involucra la escisión de los residuos alquilados de guanina, proceso que está bajo el control de los genes *uvr* (Schewe et al. 1971).

Los efectos de la MMC han sido evaluados en diferentes sistemas de prueba (Mayer y Flam, 1975), a saber:

- En bacterias produce mutaciones génicas.
- En hongos provoca no disyunción, pérdida cromosómica, recombinación mitótica y conversión génica.
- En plantas induce aberraciones cromosómicas, no disyunción y pérdida cromosómica.
- En células de mamífero y en mamíferos completos provoca muerte celular, mutaciones génicas, aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas.

Los efectos de la MMC han sido extensamente estudiados en ambos sexos de *Drosophila*, en las hembras produce

mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en ovocitos inmaduros y ovogonias, pérdida del cromosoma X, así como varios tipos de intercambios entre cromosomas no homólogos.

En machos tratados, se han reportado mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en todos los estadios de la espermatogénesis e intercambios en espermatocitos y espermatogonias. No induce "recombinación" en regiones centroméricas de espermatogonias pero si tiene éste efecto en las células en división mitótica (Vogel et al. 1981).

También se ha estudiado el efecto de la MMC sobre células somáticas (ala) de *Drosophila*, con resultados positivos (Graf et al. 1984).

Por todo ello, la MMC ha sido empleada como un mutágeno modelo o de referencia.

*Drosophila melanogaster* ofrece numerosas ventajas, que la hacen el sistema de prueba animal más rápido, versátil y eficiente (Zimmering, 1975), entre ellas están que es el eucarionte mejor conocido desde el punto de vista genético, su mantenimiento es relativamente económico, se pueden obtener poblaciones grandes en espacios reducidos, su ciclo de vida es corto (10 días, figura 18); posee activación metabólica gracias a la presencia de un paquete enzimático en el retículo endoplásmico muy semejante a la fracción microsómica S-9 del hígado de mamíferos, la cual es capaz de activar o degradar promutágenos (Zimmering, 1975; Vogel y Sobels, 1976; Baars et al. 1980; Zijlstra, 1984). Los compuestos se pueden administrar

por diferentes rutas de exposición, además de que permite la detección de virtualmente todos los eventos genéticos inducidos:

- Sustitución de pares de bases en el ADN.
- Mutaciones génicas o puntuales con efectos deletéreos.
- Delecciones pequeñas que serán transmitidas como amorfas.
- Duplicaciones pequeñas que generan inestabilidad durante la replicación.
- Rearreglos cromosómicos gruesos tales como inversiones y translocaciones.
- No disyunción.
- Recombinación en las células germinales y en las somáticas.
- Transposición de elementos cromosómicos insercionales (genes saltarines).

Estos eventos genéticos pueden ser detectados en el tejido gonadal, donde dan lugar a prole mutada o en células somáticas donde producen clones alterados que aparecen como mosaicos celulares (Zijlstra, 1987).

En la actualidad se han implementado un gran número de sistemas de cruce con marcadores genéticos apropiados, entre los cuales se encuentran la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) que tiene valores más altos de sensibilidad (0.75-0.78) y especificidad (0.83-0.86) que la de letales

recesivos ligados al sexo (SLRLT) (0.33-0.79 y 0.50-0.73, respectivamente) cuando se evalúan compuestos de grupos que no son agentes alquilantes (Vogel, 1987; Graf y Würgler, 1988; Vogel y Szakmary, 1990). Mediante esta prueba se han obtenido resultados positivos de mutágenos que abarcan gran variedad de clases químicas no relacionadas, incluyendo un gran número de promutágenos (Würgler y Vogel, 1986).

Los ensayos de mutación y recombinación somática se basan en la generación de moscas con un genotipo tal que un evento mutagénico en una célula somática, conduce a un cambio genotípico que se manifiesta fenotípicamente en todas las células que se derivan de la célula madre mutante, lo que conduce a la formación de un clon (Vogel y Szakmary, 1990).

Auerbach (1945) y Becker (1966) ya habían detectado la aparición de mosaicos o manchas (clones) en la cutícula de los adultos, al exponer a larvas heterocigóticas para marcadores fenotípicos a diferentes mutágenos (Becker, 1975, 1976). Basados en tales observaciones, Mollet y Würgler (1974) sugieren el uso de células somáticas de *Drosophila* para probar mutágenos. En individuos heterocigotos para mutaciones marcadoras visibles, ciertos eventos genéticos pueden conducir a la pérdida del alelo silvestre opuesto a la mutación marcadora, con la subsecuente expresión del alelo marcador recesivo en las células resultantes que formarán por divisiones celulares sucesivas un clon, la pérdida del alelo dominante puede ocurrir por diversos mecanismos: mutación, delección o

recombinación mitótica (Graf et al. 1983).

En las larvas se presentan dos tipos de linajes celulares diferentes: 1) las células larvarias que están determinadas genéticamente y que formarán el cuerpo de la larva, éstas células únicamente crecen en tamaño pues su capacidad de división se ha perdido y 2) las células de los discos imagales, los cuales se presentan en las larvas a manera de pequeños sacos, y cuyas células constituirán casi todas las estructuras externas y parte de las estructuras internas del adulto, éstas no están involucradas en la formación del cuerpo de la larva (Wilkins, 1985, 1986).

Los discos imagales crecen por divisiones mitóticas a lo largo de los tres estadios por los que pasa la larva hasta alcanzar la condición de prepupa, momento en el cual se dan las últimas divisiones mitóticas, el siguiente paso será la diferenciación celular (metamorfosis) dando origen a las estructuras del imago o adulto (García-Bellido y Merriam, 1971) (Fig.19). El tórax se origina por la combinación de varios discos imagales. Las extremidades, los ojos, las antenas, las alas y el aparato genital se diferencian a partir de su respectivo disco imagal que sufre una histogénesis durante el desarrollo de la pupa (Demerec, 1965; Wilkins, 1986).

Si durante este proceso se induce una alteración heredable en cualquiera de las células imagales, ésta originará una estirpe celular con la misma característica alterada dando lugar a un clon que será observado como una mancha en la

estructura imagal correspondiente, si se emplean los marcadores fenotípicos adecuados.

Se han desarrollado varios protocolos que usan dos tipos de discos imagales a saber:

1) Manchas en ojo con los marcadores "white-zeste" (Rasmuson et al. 1978), los marcadores "white- white coral" (Becker, 1966) ó con los marcadores "white" y silvestre.

2) Otro protocolo es el que usa los discos imagales mesotorácicos dorsales los cuales darán origen al mesonotum del segundo segmento torácico que incluye el ala, la cual se considera una estructura cuticular, más no un apéndice. Las alas están constituidas por dos monocapas celulares de tejido epitelial, cada una se desarrolla de manera independiente. Las alas presentan tanto cetas como tricomas, éstos últimos son unicelulares (Demerec, 1965), mientras que las cetas o cerdas se forman de cuatro células, dos de ellas de carácter nervioso, por ello se consideran como orgánulos (Wilkins, 1986).

Puesto que se han detectado y caracterizado mutaciones que alteran la diferenciación final de las células que darán origen a los tricomas en *Drosophila melanogaster*, es posible utilizarlas como marcadores fenotípicos (García-Bellido y Dapena, 1974; Graf et al. 1983).

El interés que se ha puesto en este tipo de pruebas es debido a:

1) La correlación entre la actividad mutagénica y carcinogénica de los agentes químicos ha generado mucho interés

en la actividad genotóxica de éstos en células somáticas. En *Drosophila*, aproximadamente el 85 % de los carcinógenos ensayados son mutagénicos en células germinales (Vogel et al. 1980).

2) No sólo la actividad mutagénica sino también la recombinogénica de los compuestos químicos es ahora discutida con relación a la carcinogénesis (Cairns, 1981; Radman y Kinsella, 1980).

3) La larva de *Drosophila* posee actividades metabólicas que le permiten activar a una gran variedad de agentes xenobióticos.

4) Un sistema de prueba que emplea tejido alar es ventajoso porque se pueden realizar preparaciones permanentes, lo cual hace posible la verificación y la ratificación de resultados. Otra ventaja más, comparada con el sistema de ojo es la posibilidad de almacenar a las moscas tratadas en alcohol al 70 % para el montaje posterior de las alas. Además cada disco imagal expuesto contiene cientos de células blanco expuestas al genotóxico (Graf et al. 1984).

#### OBJETIVOS

1) Analizar mediante la prueba de mutación y recombinación somática en células del ala de *Drosophila melanogaster*, los efectos protectores de la vitamina E y de los  $\beta$ -carotenos sobre la genotoxicidad de la MMC.

2) Valorar la capacidad de la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) para detectar mezclas de compuestos (mutágenos y antimutágenos) mediante dos tipos de tratamientos diferentes.

#### HIPOTESIS

Si la vitamina E y los  $\beta$ -carotenos son antimutágenos, entónces inhibirán la frecuencia de mutaciones inducidas por la mitomicina-C (MMC).

#### MATERIAL Y METODOS

##### Sistema de cruzas

Se utilizaron dos líneas con marcadores fenotípicamente reconocibles: mwh y flr<sup>3</sup>

La craza progenitora se hizo con hembras homocigotas mwh/mwh de 72<sup>±</sup> 4 horas y machos flr<sup>3</sup>/TM<sub>3</sub>Ser de 48 horas.

El genotipo "pelos múltiples en el ala" (mwh 3 - 0.0) produce un fenotipo en el cual las células del ala contienen 2 ó más tricomas en lugar de uno solo, que es el característico del fenotipo silvestre (Lindsley y Grell, 1968; Lindsley y Zimm, 1990).

La línea flr<sup>3</sup>/TM<sub>3</sub>Ser posee dos marcadores genotípicos "flama" (flr<sup>3</sup> 3-38.8) que es recesivo y provoca un



fenotipo en las células del ala con tricomas amorfos algunos semejantes a una flama, el eje de las quetas está frecuentemente encorvado y ramificado, los tricomas son cortos y aparecen como abultados en el ala y en forma de roseta en el abdomen. Este gene es letal en condición homocigótica (García Bellido y Dapena, 1974) por esta razón el genotipo de esta línea debe portar un cromosoma que balancee estos efectos, el cromosoma  $TM_3$  "(Third multiple)" posee múltiples inversiones y además el marcador dominante "Serrata" (Ser), el cual permite identificar a los organismos que lo portan ya que produce un fenotipo de bordes discontinuos en las alas. El gene serrata en condición homocigótica es letal y por ello se recobran en cada generación únicamente individuos heterocigóticos para  $flr^3$  y serrata.

Las larvas transheterocigóticas para  $mwh$  y  $flr^3$  se obtienen a partir de las cruzas progenitoras entre las dos cepas antes mencionadas, éste tipo de larvas conforman la mitad de la progenie, la otra mitad consiste en larvas heterocigotas  $mwh/TM_3, Ser$ . Cabe mencionar que estos dos tipos de larvas no se diferencian una de otra y por lo tanto se tratan juntas, después de la metamorfosis, las moscas adultas portadoras de los marcadores  $mwh +/ + flr^3$  tienen alas silvestres y pueden distinguirse de las moscas adultas  $mwh/TM_3, Ser$  que presentan las alas con bordes discontinuos.

Las alteraciones genéticas inducidas causan fenotipos reconocibles en las células del ala del adulto ya que sobre un

panorama de tricomas silvestres, pueden observarse células o clones celulares en los cuales se expresa el fenotipo mwh, flr<sup>3</sup> o encontrarse clones celulares conformados por ambos tipos de tricomas. La recombinación mitótica entre flr<sup>3</sup> y el centrómero produce manchas gemelas mwh-flr<sup>3</sup>, la recombinación mitótica entre los marcadores mwh y flr<sup>3</sup> genera manchas sencillas mwh. Este tipo de manchas, las mwh, pueden originarse además por otros eventos genéticos que ocurren en las células somáticas, tales como mutaciones puntuales, pérdida cromatídica y no disyunción (Würgler et al. 1984, 1985) (Fig.20). El tamaño del clon se correlaciona con la edad de las larvas en el momento del tratamiento, si las larvas son muy jóvenes (24 a 48 horas) la dimensión del clon en el adulto será mayor, si tienen más edad (72 horas) la magnitud del clon en el adulto resultará menor (García Bellido y Merriam, 1971; Szabad et al. 1983).

#### Compuestos Químicos

Se utilizaron en los tratamientos experimentales Mitomicina-C, Vitamina E y  $\beta$ -caroteno de Sigma.

#### Procedimiento Experimental (Fig.21)

72 horas después de la cruce se colectaron los huevecillos durante 8 horas, tres días después se obtuvieron las larvas de 72  $\pm$  4 horas de edad de acuerdo con el

procedimiento de Nöthiger (1970) que consiste en separar las larvas enjuagando el medio con una solución concentrada de sacarosa al 20% posteriormente se colocan en un embudo de separación donde se colectan utilizando una tela de nylon.

Las larvas se colocaron de acuerdo al tipo de tratamiento en tubos homeopáticos (viales) con medio instantáneo (Instant Caroline Medium) y la solución a probar. Las larvas terminaron su metamorfosis en este medio.

En experimentos preliminares se determinaron las concentraciones de la vitamina E y de los  $\beta$ -carotenos de manera que se aplicaron para ambos 10, 100 y 1000 ppm, las concentraciones empleadas para el testigo positivo (MMC) fueron de 0.3125, 0.625 y 1.2 mM. y se corrieron testigos negativos concurrentes que consistieron en los disolventes de cada uno de los compuestos empleados, la vitamina E al ser insoluble en agua y en etanol al 5% tuvo que solubilizarse en una mezcla caliente de etanol y tween (3:1); los  $\beta$ -carotenos se solubilizaron en etanol al 5% y por último la MMC se disolvió en sacarosa al 5%. Para los tratamientos en mezcla se probaron concentraciones de 100 ppm de cada vitamina y la de 0.625 mM del mutágeno de referencia.

Se eligieron dos tipos de tratamiento, de tal manera que se hicieron dos bloques experimentales: el primero consistió en preparar una mezcla del mutágeno de referencia (MMC 0.625 mM) y la vitamina E (100 ppm) ó el  $\beta$ -caroteno (100 ppm) la cual fue añadida al medio instantáneo donde se

introdujeron las larvas de 72 horas; el segundo tipo de tratamiento consistió en someter a las larvas de manera aguda (6 horas) con el mutágeno de referencia (MMC 0.625 mM); posteriormente se extrajeron las larvas y se colocaron en medio instantáneo al que se añadió la vitamina E (100 ppm) o los  $\beta$ -carotenos (100 ppm) según el caso. En la figura 22 se presenta un esquema de los tratamientos.

Como consecuencia de estos dos tipos de tratamiento tuvieron que correrse paralelamente experimentos agudos y crónicos para la MMC y para los testigos negativos antes mencionados.

El tratamiento agudo se realizó colocando las larvas en tubos homeopáticos que contenían en el extremo inferior una gasa de nylon y en el superior un tapón de poliuretano, éstos tubos se acomodaron en vasos de precipitado de 10 ml con 0.3 g de celulosa y 1.5 ml de la solución a tratar, las larvas se dejaron durante 6 horas y después los tubos homeopáticos se retiraron del vaso y las larvas se enjuagaron con agua y se les colocó en medio instantáneo conteniendo la vitamina correspondiente hasta la emergencia de los adultos.

#### Análisis de las alas

Los adultos transheterocigóticos se fijaron en etanol al 70%. Se separaron las alas con ayuda de unas pinzas de relojero y se montaron en portaobjetos utilizando solución de

Faure (Graf et al. 1984). En cada preparación se montaron 40 alas, 20 de hembras y 20 de machos, se analizaron en el microscopio registrándose el tipo de mancha, mwh, flr<sup>3</sup> y gemelas, así como el tamaño de las mismas.

#### Tratamiento estadístico

Se realizaron para cada tratamiento un experimento y su repetición.

Los datos se procesaron con ayuda del programa de cómputo SMART (Würgler, comunicación personal) y el análisis estadístico se hizo mediante las tablas de Kastebaum-Bowman (1970) con un nivel de significancia del 5%.

Puesto que el programa de cómputo SMART está diseñado para detectar inducción en la frecuencia de manchas y debido a que en el presente trabajo se evaluó precisamente la inhibición de manchas después de una exposición determinada, se procedió a hacer el tratamiento estadístico, que es de una sola cola, invirtiendo los términos, es decir el testigo fue el lote correspondiente a las vitaminas en cualquiera de sus dos modalidades y el lote experimental es el testigo positivo MMC.

Dado que las frecuencias para manchas sencillas menores de tres células observadas en los grupos testigo son mayores que las de manchas con tres o más células (manchas sencillas grandes) y de las manchas gemelas (mwh-flr), las frecuencias de los tres tipos de manchas se evaluaron de forma

separada mediante el procedimiento de decisión múltiple Shelby-Olson (1981) lo que permitió concluir si un compuesto es positivo, débil positivo, indeterminado o negativo.

La decisión se basa en el contraste de dos hipótesis (Frei y Würigler, 1988): 1)  $H_0$  ó hipótesis nula que plantea que no existen diferencias entre la frecuencia de mutación de las series testigo y tratada. 2)  $H_a$  ó hipótesis alternativa que considera que la frecuencia inducida en el grupo tratado es  $m$  veces mayor que la observada en el lote testigo. De acuerdo con esto se puede llegar a las siguientes conclusiones:

a) Efecto positivo del compuesto químico: se rechaza la  $H_0$  se acepta la  $H_a$ .

b) Efecto negativo: se acepta la  $H_0$  y se rechaza la  $H_a$ .

c) Efecto débil positivo: se rechazan ambas hipótesis.

d) No se puede determinar el efecto del compuesto (Indeterminado): se aceptan ambas hipótesis (Fig.23).

El parámetro "  $m$  " se da con base en la frecuencia basal para cada tipo de mancha:  $m=2$  para manchas sencillas pequeñas puesto que son las más frecuentes y por ende se requiere de una mayor inducción de daño para doblar la basal,  $m=5$  para manchas sencillas grandes y manchas gemelas, ya que son menos frecuentes y por ello con menor daño se podría duplicar la basal (Frei y Würigler, 1988).

Es importante mencionar que para evitar errores en la

clasificación de las manchas, únicamente se consideraron como expresiones mwh aquellas que se localizaron dentro o en la periferia de una mancha mwh (con más de tres pelos), además aquellos clones que se encuentren separados por más de tres hileras de tricomas normales se estimaron como independientes (Graf et al. 1984).

## RESULTADOS

Se realizó un experimento y una repetición para cada bloque experimental y al no encontrarse diferencias significativas mediante la prueba de  $X^2$  para proporciones entre las repeticiones de cada experimento, se procedió a sumar los resultados.

En la tabla II se muestran los resultados obtenidos al tratar a las larvas crónicamente con el mutágeno de referencia MMC, encontrándose inducción positiva en las tres concentraciones empleadas con respecto al testigo de sacarosa al 5%. Es importante mencionar que la MMC produce una clara relación concentración-respuesta en la inducción de los tres tipos diferentes de manchas, siendo efectiva en la producción de todos los tipos de manchas especialmente de las gemelas, que sin duda provienen de la recombinación mitótica entre  $f1r^3$  y el centrómero (Fig.24).

La tabla III contiene los datos obtenidos al aplicar crónicamente vitamina E a las larvas, encontrándose los

siguientes resultados con respecto al testigo negativo de etanol más tween, en las concentraciones de 10 y 100 ppm no aumenta significativamente ningún tipo de mancha. A 1000 ppm indujo significativamente los tres tipos de manchas: sencillas pequeñas, sencillas grandes y gemelas, así como manchas totales. En la figura 25 se muestran gráficamente estos resultados.

En la tabla IV y figura 26 correspondientes al tratamiento crónico de  $\beta$ -caroteno, puede notarse que éste resultó negativo para la inducción de manchas sencillas chicas, positivo para sencillas grandes en 10 ppm e indeterminado para manchas sencillas grandes en 100 y 1000 ppm y para gemelas en 10 y 1000 ppm.

En la tabla V se muestran los resultados obtenidos en la mezcla crónica de MMC y Vitamina E, en los cuales puede notarse que la cantidad y la frecuencia de manchas de la vitamina E y su testigo negativo no difieren significativamente. Al comparar el testigo positivo, que produce una cantidad y frecuencia de manchas significativas con respecto a los testigos negativos, con la mezcla crónica puede notarse claramente que tanto la cantidad como la frecuencia de manchas de todos los tipos que ésta produce es significativamente menor. En la fig. 27 se muestran gráficamente estos resultados.

La tabla VI corresponde al bloque experimental de mezcla crónica de MMC y  $\beta$ -caroteno y puede notarse que la



cantidad y frecuencia de todas las manchas es significativamente mayor en el testigo positivo (Fig.28).

En la tabla VII se encuentran los datos obtenidos al tratar de forma aguda a las larvas con MMC con las tres diferentes concentraciones, los cuales se compararon con el testigo negativo de sacarosa al 5%, obteniéndose una relación concentración-respuesta. Sin embargo, la concentración de 0.3125 mM solo indujo significativamente las manchas sencillas grandes; las otras dos concentraciones aumentaron significativamente la cantidad y el tipo de todas las manchas (Fig.29).

En la tabla VIII se muestran los resultados obtenidos en el bloque experimental de tratamiento agudo de MMC y crónico de vitamina E. Al comparar, éstos resultados con el testigo positivo (MMC) se encontró que para las manchas sencillas chicas y las totales la inhibición es significativa, mientras que para las sencillas grandes resultó ser débil positivo y para las gemelas indeterminado (Fig.30).

En la tabla IX y en la fig.31 se anotan los resultados obtenidos en el tratamiento agudo-crónico de MMC y  $\beta$ -caroteno el análisis de ésta tabla muestra diferencias altamente significativas.

#### DISCUSION

El proceso de inducción de mutaciones por agentes

químicos involucra una serie de eventos entre los cuales se encuentran la biotransformación mediada por enzimas metabólicas, que en algunos casos generan un producto intermedio electrofílico que es capaz de interactuar con el ácido desoxirribonucleico. Las lesiones premutagénicas o aductos, producto de esta interacción son con frecuencia reparadas enzimáticamente ya sea por mecanismos libres de errores, en cuyo caso la alteración no se manifiesta, o sujeta a errores mecanismo que promueve y fija mutaciones (Ramel et al. 1986; Waters et al. 1990).

En las células somáticas el daño inducido a los ácidos nucleicos puede producirse por mutágenos endógenos cuyos efectos tienden a acumularse en función del tiempo y contribuyen de manera importante al envejecimiento celular y a diversas enfermedades degenerativas, algunas de ellas asociadas con el cáncer.

Los procesos endógenos vinculados con el daño en el ácido desoxirribonucleico son la oxidación (Hartman, 1981; Ames, 1983), metilación, desaminación y despurinización (Saul y Ames, 1986).

Los agentes oxidantes se generan en las células como subproductos del metabolismo normal, éstos intervienen en la peroxidación de los lípidos (Ames, 1983; Ramel et al. 1986; Ames y Gold, 1991), la que provoca radicales libres. Las reacciones inflamatorias y la fagocitosis que se inducen después de infecciones virales o bacterianas son fuentes

endógenas adicionales en la producción de radicales libres (Ramel et al. 1986).

Debido al intervalo de tiempo que transcurre entre la generación de agentes oxidantes y su destrucción por diversos mecanismos celulares de defensa, se ha estimado que pueden persistir niveles bajos de oxidantes el tiempo suficiente para causar daños a las macromoléculas (Chance et al. 1979). En los eucariontes el ácido desoxirribonucleico está protegido tanto por las histonas que forman parte de la cromatina como por la membrana nuclear la que impide el ingreso al núcleo de muchos oxidantes que se originan en el citoplasma.

Los radicales libres estimulan la división celular o mitogénesis, factor importante en el proceso carcinogénico. Así mismo la pérdida de la heterocigosis se produce como consecuencia de la recombinación mitótica y de la no disyunción, para que estos eventos se expresen se requiere que la célula se divida. Se ha demostrado que la mutagénesis y la mitogénesis son sinérgicas (Ames y Gold, 1990, 1991) (Fig.32).

En los organismos existen también diversos mecanismos que los protegen contra los efectos adversos de diversos mutágenos naturales, a nivel metabólico la desintoxicación y a nivel genético la reparación libre de errores del ADN (Ramel et al. 1986; Waters et al. 1990).

Entre los factores metabólicos que permiten limitar la exposición a oxidantes reactivos se encuentran las enzimas involucradas en la desintoxicación entre ellas la superóxido

desmutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa; además en la dieta existen numerosos mutágenos y antimutágenos naturales, éstos últimos inhiben los efectos adversos de los mutágenos por diversos mecanismos. La determinación de un mecanismo protector resulta en ocasiones complicada ya que la antimutagénesis puede producirse a diferentes niveles (Ramel et al. 1986; De Flora y Ramel, 1988). Los inhibidores presentes en los alimentos tienen estructuras químicas muy variadas (Wattenberg, 1983).

La actividad antimutagénica puede estar relacionada con diversas condiciones experimentales tales como: el tiempo de exposición al mutágeno, el tipo de exposición y la dosis; otro parámetro importante es el que se produce por las combinaciones entre los agentes químicos.

Las pruebas de corto plazo que han mostrado ser efectivas para la detección de mutágenos deben en principio poder identificar antimutágenos (Clarke y Shankel, 1975; Jacobs et al. 1977; Kada et al. 1978). La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* ha sido utilizada durante más de 60 años para identificar agentes genotóxicos físicos y químicos en células germinales. La prueba de mutación y recombinación somática desarrollada hace más de 15 años (Mollet y Würigler, 1974; Graf et al. 1984) ha permitido a la fecha valorar más de 300 compuestos químicos tanto en células de los ojos como de las alas y permite detectar eficientemente tanto mutágenos de acción directa como promutágenos (Vogel y Zijlstra, 1987;

Vogel, 1987; Graf et al. 1990).

La mitomicina-c (MMC) es un promutágeno que al ser bifuncional actúa produciendo ligamientos cruzados, lo cual se traduce a nivel celular en gran actividad recombinogénica que depende en todos los casos de la concentración; el tiempo de exposición al promutágeno es también un factor importante en el número de células afectadas. Por esta razón fue necesario realizar tratamientos agudos y crónicos, encontrándose una respuesta mayor en cuanto al número y tipo de manchas en el tratamiento crónico, tal como se esperaba.

La determinación de la respuesta en función de la concentración de las vitaminas, mostró que la vitamina E a concentraciones elevadas, 1000 ppm, induce significativamente los tres tipos de manchas, ésto permite sugerir que a la dosis más alta probada la vitamina E promueve mutaciones.

Como con las concentraciones de 10 y 100 ppm los resultados no son significativamente distintos al testigo negativo para los tratamientos combinados se utilizaron 100 ppm; además tanto la vitamina E como los  $\beta$ -carotenos a tal concentración no produjeron ninguna mancha gemela, factor importante para la comparación de los resultados inducidos por MMC que como ya se mencionó es esencialmente recombinogénica, otra razón para utilizar esta concentración fue la de asegurar que los organismos tuvieran suficiente cantidad del antioxidante.

Uno de los propósitos en el diseño experimental fue

probar diferentes combinaciones del mutágeno y del antimutágeno. El tratamiento combinado en el que primero se administró la MMC durante 6 horas y después la vitamina E ó el  $\beta$ -caroteno, inhibió la respuesta positiva de la MMC a la mitad, mostrando ser un poco más efectivo el  $\beta$ -caroteno. La doble manipulación de las larvas sujetas a éste tipo de tratamiento podría afectar de alguna manera el metabolismo, acelerar la pupación y alargar la metamorfosis.

El tratamiento combinado de la mezcla crónica con el mutágeno y el antimutágeno permitió demostrar inequívocamente que ambas vitaminas inhiben parcialmente los efectos genotóxicos inducidos por la MMC, de manera especial, en la aparición de manchas gemelas (Fig.33) que provienen de la recombinación mitótica inducida por la MMC, ésta inhibición fue ligeramente más efectiva para los  $\beta$ -carotenos, sin embargo en ambos casos fue de alrededor de un orden de magnitud.

Las manchas chicas y grandes (Figs.34 y 35) pueden ser el resultado de recombinación mitótica entre los marcadores *mwh* y *flr*<sup>3</sup> o bien originarse, aunque en menor medida, por retromutación, delección o no disyunción. Es importante hacer notar que la inhibición de manchas chicas en la mezcla agudo-crónica de ambas vitaminas fue igual, de cerca de 3 veces menor con respecto a las inducidas por la MMC; la frecuencia de las manchas grandes fue más eficientemente inhibida por ambas vitaminas en la mezcla crónica siendo 7.5 veces menores para el  $\beta$ -caroteno y 4 veces para la vitamina E.

La frecuencia de manchas totales es un parámetro que permite relacionar la cantidad de manchas producidas en cada ala, lo cual es importante para la determinación del potencial genotóxico de un agente químico, y también facilita la decisión de cual concentración emplear en función de la cantidad de manchas por analizar en cada ala. Queda claro que si la MMC administrada en forma crónica indujo 6 manchas por ala en la concentración más alta, 3.5 manchas por ala en la concentración intermedia y 1.8 en la concentración más baja, en todos los casos la respuesta fue positiva, en términos del análisis microscópico de las alas. En función del propio protocolo se decidió emplear la concentración intermedia (0.625 mM) que produjo una respuesta positiva y fácilmente cuantificable.

En los tratamientos agudos la MMC produjo 2 manchas por ala en la concentración más alta, y 1.6 manchas en la intermedia resultando ambas positivas, sin embargo en la concentración menor indujo 0.4 manchas por ala resultado que no es significativamente distinto al encontrado en el testigo negativo, por ésto se eligió la concentración intermedia de 0.625 mM, especialmente con el propósito de comparar ambos tipos de tratamientos combinados.

En la tabla 10 y en la figura 36 se muestra un resumen de los resultados obtenidos en la presente tesis, puede notarse que la genotoxicidad de la MMC en el tratamiento agudo fue bloqueada por ambas vitaminas de manera eficiente, sin embargo los  $\beta$ -carotenos inhibieron 4 veces la frecuencia de

manchas totales por ala inducida por la MMC. En el tratamiento crónico la inhibición de las manchas totales producidas por la MMC fue más efectiva y relevante en la mezcla con  $\beta$ -carotenos.

En cuanto a los mecanismos de acción de la inhibición de la genotoxicidad de la MMC, demostrada en este trabajo se puede proponer que ya que ésta requiere de activación metabólica la que se realiza como ya se ha demostrado por los citocromos P-450, reacción que es mediada por la citocromo c-reductasa y que requiere NADPH formándose un compuesto electrofílico, capaz de producir radicales de oxígeno ( $O^-$ ) (Bachur et al. 1978; Keyes et al. 1984; Pan et al. 1984) y que las vitaminas E y los  $\beta$ -carotenos por ser antioxidantes son capaces de atrapar radicales libres como los generados por la MMC, es muy probable que los radicales de oxígeno presentes en el producto electrofílico intermedio de la MMC, hayan sido inhibidos intracelularmente por bloqueo de algunas moléculas reactivas (De Flora y Ramel, 1988), aquellas que no fueron inhibidas dentro de la célula son probablemente las que pudieron penetrar al núcleo e interactuar bifuncionalmente con el ADN provocando ligamientos cruzados que se tradujeron en una elevada recombinogénesis.

Estos resultados permiten considerar que los objetivos iniciales del trabajo fueron cubiertos, pero a su vez abrieron otra serie de preguntas cuyas respuestas serían tema de otra investigación.

La inhibición de la genotoxicidad de la MMC se



demostró en tratamientos combinados empleando una sola concentración del mutágeno y del antimutágeno, la capacidad bloqueadora de la vitamina E y de los  $\beta$ -carotenos será necesario probarla manteniendo constante la concentración del promutágeno y haciendo variable la concentración de las vitaminas.

## CONCLUSIONES

Se mostró el efecto inhibitor de la vitamina E y de los  $\beta$ -carotenos sobre la genotoxicidad de la MMC en la inducción de los tres tipos de manchas.

De las vitaminas utilizadas, los  $\beta$ -carotenos fueron más efectivos en cuanto a la inhibición del efecto mutagénico de la MMC.

Se demostró que la prueba de mutación y recombinación somática es útil para detectar antimutágenos y para el uso de mezclas.

Los tratamientos empleados muestran consistencia en la respuesta, siendo más recomendable la mezcla crónica, ya que entre otras razones, únicamente se manipula una sola vez a las larvas.

Se considera que el posible mecanismo de acción de la vitamina E y de los  $\beta$ -carotenos, dada su capacidad antioxidante sea mediante el bloqueo de moléculas reactivas, que contienen radicales de oxígeno, que se generan como productos del metabolismo de la MMC, actuando por lo tanto como antimutágenos.

REFERENCIAS

- Alam, B.S. y S.Q. Alam (1987) The effect of different levels of dietary B-carotene on DMBA-induced salivary gland tumor. *Nutr. Cancer* 9:93-101.
- Adler, I.D. (1981) Comparative mutagenicity of mitomycin C. En: *Comparative chemical mutagenesis* ( F.J. De Serres y M.D. Shelby, eds.), Plenum Press, Nueva York. pp.993-1014.
- Alekperov, U.K. y D.D. Akhundova (1974) Cytogenetic analysis of the antimutagenic action of  $\alpha$ -tocopherol on spontaneous radiation-induced chromosomal mutations. (Transl. from Russian). *Genetika* 10:12-17.
- Alekperov, U.K. (1976) Modification of the antimutagenic activity of  $\alpha$ -tocopherol by administration during different periods of the G<sub>1</sub> phase (Transl. from Russian). *Tsitolog. Genet.* 10:40-42.
- Allen. J. (1989) Biological actions of carotenoids. *J. Nutr.* 119:94-95.
- Ames, B.N., W.E. Durston., E. Yamasaki y F.D. Lee (1973) Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 70:2281-2285.
- Ames, B.N. (1979) Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science* 204:587-593.
- Ames, B.N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* 221:1256-1262.
- Ames, B.N. y L.S. Gold (1990) Too many rodents carcinogens: Mitogenesis increases mutagenesis. *Science* 249:970-971.
- Ames, B.N. y L.S. Gold (1991) Endogenous mutagens and the cause of aging and cancer. *Mutat. Res.* 250:3-16.

- Auerbach, C. (1945) The problem of chromosome rearrangements in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Proc. R. Soc. Edinburgh 62:120-127.
- Baars, A.J., G.H. Blijleven., G.R. Mohn., A.T. Natarajan y D.D. Breimer (1980) Preliminary studies on the ability of *Drosophila* microsomal preparations to active mutagens and carcinogens. Mutat. Res.72: 257-264.
- Bachur, N.R., S.L. Gordon y M.V. Gee (1978) General mechanisms for microsomal activation of quinone anticancer agents to free radicals. Cancer Res.38:1745-1750.
- Becker, H.J. (1966) Genetic and variegation mosaics in the eye of *Drosophila*. Curr. Topics Develop. Biol.1:155-171.
- Becker, H.J. (1975) X-ray and TEM-induced mitotic recombination in *Drosophila melanogaster*: unequal and sister strand recombination. Molec. Gen. Genet.138:11-24.
- Becker, H.J. (1976) Mitotic recombination. En: The Genetics and Biology of *Drosophila*. ( M. Ashburner y E. Novitski, Eds.), Academic Press, Nueva York, Vol 1C, pp.1019-1087.
- Beckman, C., R.M.Roy y A.Sproule (1982) Modification of radiation-induced sex-linked recessive lethal mutation frequency by tocopherol. Mutat. Res.105:73-77.
- Bendich, A. (1989) Carotenoids and the immune response. J. Nutr.119:112-115.
- Bieri, J.G., L. Corash y V.S. Hubbard (1983) Medical uses of vitamin E. N. Engl. J. Med.308:1063-1071.
- Blomstrand, R. y L. Forsgren (1968) Labeled tocopherols in man: intestinal absorption and thoracic duct lymph transport of dl-alpha tocopherol-(5-methyl-3H) and N-methyl-3H di gamma-tocopheramine. Int Z. Vitaminforsch 38:328-344.
- Borek, C., A. Ong., H. Mason., L. Onahue y J.E Biaglow (1986) Selenium and vitamin E inhibit radiogenic and chemically induced transformation in vitro via different mechanisms. Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 82:6755-6759.

- Brusick, D. (1987) Principles of genetic toxicology. Plenum Press. Nueva York, 284 pp.
- Burton, G.W. y K.U.Ingold (1984)  $\beta$ -carotene: an unusual type of lipid antioxidant. Science 224:569-573.
- Cairns, J. (1981) The origin of human cancers. Nature 289: 353-357.
- Carr, B.J. (1985) Chemical carcinogens and inhibitors of carcinogenesis in the human diet. Cancer 55:218-224.
- Carter, S.K. y R.B.Livingston (1976) Plant products in cancer chemotherapy. Cancer Treat. Rep.60: 1141-1156.
- Chance, B., H.Sies y A. Boveris (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol. Rev.59:527-605.
- Clarke, C.H. y D.M.Shankel (1975) Antimutagenesis in microbial systems. Bacteriol. Rev.39:33-53.
- Cerutti, P.A., J. Emerit y P. Amstad (1983) Membrane mediated chromosome damage. En:Genes and proteins in oncogenesis (I.B Weinstein y F.Vogel, Eds). Academic Press, Nueva York, pp.55-67.
- Cerutti, P.A. (1985) Prooxidant states and tumor promotion Science 227:375-381.
- Corriyan, J. J. Jr. (1982) The effect of vitamin E on warfar-induced vitamin K deficiency. Ann. N. Y. Acad. Sci.393: 361-367.
- Dean, R.T. y K.H. Cheeseman (1987) Vitamin E protects proteins against free radical damage in lipid environment. Biochem. Biophys. Res. Commun.148:1277-1282.
- De Flora, S. y C. Ramel (1988) Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview. Mutat. Res.202:285-306.

- DeLange, R.J. y A.N. Glazer (1989) Phycoerythrin fluorescence-based assay for peroxy radicals: a screen for biologically relevant protective agents. *Anal. Biochem.* 177:300-306.
- Demerec, M. (1965) *Biology of Drosophila*. Hafner Publishing Co. Nueva York, 633 p.
- De Serres, F.J. (1979) Evaluation of test for mutagenicity as indicators of environmental mutagens and carcinogens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 84:75-84.
- Devore, G. y E. Muñoz-Mena (1974) *Química orgánica. Publicaciones Culturales. México.* pp. 250, 251, 264, 265, 268, 654, 755, 777.
- Dorogokupla, A.G., S.F. Postolnikov., E.G. Troitskaya y L.K. Adilgireeva (1973) Role of carotene-containing foods in the occurrence of experimental tumors. En: *Inst Klin. Eksp. Khir* (S.R. Karynbaev, Ed.), pp.153-155.
- Epstein, J.H. (1977) Effects of  $\beta$ -carotene on U.V. induced cancer formation in the hairless mouse skin. *Photochem. Photobiol.* 25:211-213.
- Fonck, K. y A.W.T. Konings (1978) The effect of vitamin E on cellular survival after X-radiation of lymphoma cells. *Br. J. Radiol.* 51:832-833.
- Frei, B., R. Stocker y B.N. Ames (1988) Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85:9748-9752.
- Frei, B., L. England y B.N. Ames (1989) Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 86:6377-6381.
- Frei, H y F.E. Würqler (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.* 203:297-308.
- Gallo-Torres, H.E. (1970) Obligatory role of bile for the intestinal absorption of vitamin E. *Lipids* 5:379-384.

- García-Bellido, A. y J.R. Merriam (1971) Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 24:61-87.
- García-Bellido, A. y J. Dapena (1974) Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila*. *Molec. Gen. Genet.* 128:117-130.
- Gebhart, E., H. Wagner., K. Grzimok y H. Behnsen (1985) The action of anticlastogens in human lymphocyte cultures and their modification by rat-liver S-9 mix.II. Studies with vitamins C and E. *Mutat. Res.* 149:83-94.
- Glover, J. (1960 ) The conversion of beta-carotene into vitamin A. *Vitamin Horm.* 18:371-386.
- Graf, U., H. Juon., A.J. Katz., H.J. Frei y F.F. Würgler (1983) A pilot study on a new *Drosophila* spot test. *Mutat. Res.* 120:233-239.
- Graf, U., E. Würgler., A.J. Katz., H. Frei., H. Juon., C.B. Hall y P.G. Kale (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6:153-188.
- Graf, U. y F.E. Würgler (1988) The sex-linked recessive lethal assay and somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. En: Evaluation of short term tests for carcinogens (J. Ashby et al. Eds), Cambridge UK-WHO/Cambridge University Press. Vol 2, pp 2.301-2.309.
- Graf, U., C.B. Hall y N.V. Schaik (1990) On the use of excision repair defective cells in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.* 16:225-237.
- Haber, S.L. y R.W. Wissler (1962) Effect of vitamin E on carcinogenicity of methylcholantrene. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111:774-775
- Hartman, P. (1981) The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* 78:7124-7128.

- Hayatsu, H., H. Arimoto y T. Negishi (1988) Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 202: 439-446.
- Hellman, K. (1972) Anticancer drugs. *Chem. Brit.* 8(2):69-72.
- Herrera, E. (1986) *Bloquímica. Interamericana. México*, pp.625-665.
- Hirayama, T. (1979) Diet and cancer. *Nutr. Cancer* 1:67-81.
- Horwitt, M.K. y K.E. Mason (1972) Tocopherols. XII. Pharmacology and toxicology. En: *The vitamins: chemistry, physiology, pathology, methods* (W.H. Sebrell y R.S. Harris, Eds.) 2d. ed. Vol.5. Nueva York, Academic Press, pp. 309-312.
- Ip. C. (1985) Attenuation of the anticarcinogenic action of selenium in vitamin E deficiency. *Cancer Lett.* 25:325-331.
- Jacobs, M.M., T.S. Mathey y C.A. Griffin (1977) Inhibitory effects of selenium on the mutagenicity of 2-acetylaminofluorene (AAF) and AAF derivatives. *Cancer Lett.* 2:319-322.
- Kada T., K. Morita y T. Inoue (1978) Antimutagenic actions of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Mutat. Res.* 53:351-353. 53.
- Kada, T., T. Inoue y N. Namiki (1982) En: *Environmental mutagenesis and plant biology.* (E.J. Klekowski, Ed.), Praeger, Nueva York, pp. 137-151. .
- Karlsson, K y L. Marklund (1987) Heparin-induced release of of extracellular superoxide dismutase to human blood plasma *Biochem. J.* 242:55-59.
- Kastenbaum, M.A. y K.O. Bowman (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res.* 9:527-549.



- Kennedy, K.A., S. Rockwell y A.C. Sartorelli (1980) Preferential activation of mitomycin C to cytotoxic metabolites by hypoxic tumor cells. *Cancer Res.*40:2356-2360.
- Keyes, S.R., P.M. Fracasso., D.C. Helmbrook., S. Rockwell., S.G. Sligar y A.C. Sartorelli (1984) Role of NADPH: cytochrome c reductase and DT-Diaphorase in the biotransformation of mitomycin C. *Cancer Res.*44:5638-5643.
- Kláui, H. y J.C. Bauernfeind (1981) Carotenoids as food colors. En: *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors.* (J.C Bauernfeind, Ed.) Academic Press, Nueva York.
- Krinsky, N.I. (1989) Carotenoids and cancer in animal models. *J. Nutr.*119:123-126.
- Krinsky, N.I y S.M Deneke (1982) Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids. *J. Nat. Cancer Inst.* 69:205-209.
- Kupchan, S.M. (1974) Novel natural products with antitumor activity. *Fed. Prod.* 33:2288-2295.
- Kvale, G., E. Bjelk y J.J. Gart (1983) Dietary habits and lung cancer risk. *Int. J. Cancer* 31:397-405.
- Lai, C., M.A. Butler y T.S. Matney (1980) Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content. *Mutat. Res.*77:245-250.
- Lehninger, A. (1985) *Bioquímica: las bases moleculares de la estructura y función celular.* Omega, Barcelona, 2a.Ed., 1117 p.
- Lieber, D.C., D.S. Klings y D.J. Read (1986) Antioxidant protection of phospholipid bilayers by  $\alpha$ -tocopherol status and lipid peroxidation by ascorbic acid and glutathione. *J. Biol. Chem.*261:12114-12119.
- Lin, X., M. Sugiyama y M. Costa (1991) Differences in the effect of Vr on nickel sulfide or nickel chloride-induced chromosomal aberrations in mammalian cells. *Mutat. Res.* 260:159-164.

- Lindsley, D.L. y R. Grell (1968) Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Institution of Washington Publication Washington. 472 p.
- Lindsley, D.L. y G. Zimm (1990) The genome of *Drosophila melanogaster*. Parte 4: Genes L-2, balancers, transposable elements. *Dros. Inf. Serv.* 68:382 p.
- Loprieno, N. (1980) General principles of genetic toxicology and methods for mutagenesis assesment. En: The principles and methods in modern toxicology. (C.L. Galli., S.D. Murphy y R. Paoletti, Eds.), Elsevier, Holanda.
- Maddipati, K.R. y L.J. Marnett (1987) Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. Purification and properties of a selenium - dependent glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 262:17398-17403.
- Manoharan, K. y M.R. Bannerjee (1985) B-carotene reduces sister chromatid exchange induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. *Cell Biol. Int. Rep.* 9:783-789.
- Maron, D.M. y B.N. Ames (1983) Revised methods for *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113:173-215.
- Mayer, V.W. y W.G. Flam (1975) Legislate and technical aspects of mutagenicity testing. *Mutation Res.* 29:295-300.
- Marshall, R.S. y A.M. Rauth (1986) Modification of the cytotoxic activity of mitomycin-C by oxigen and ascorbic acid in chinese hamster ovary cells and a repair-deficient mutant. *Cancer Res.* 46:2709-2713.
- Mathews-Roth, M.M. (1975) Presence of carotenoids in the erythrocyte membranes of carotenemic and non-carotenemic individuals. *Clin. Chem.* 21:258-259.
- Mathews-Roth, M.M. (1982) Antitumor activity of  $\beta$ -carotene, canthaxanthin and phytoene. *Oncology.* 39:33-37.

- Mathews-Roth, M. y N.I. Krinsky (1985) Carotenoid dose level and protection against UV-B induced skin tumors. *Photochem. Photobiol.* 42:35-38.
- Mettlin, C., S. Graham y M. Swanson (1979) Vitamin A and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 62:1435-1438.
- Mirvish, S.S. (1975) Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics and in vivo occurrence. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 31:325-351.
- Mirvish, S.S. (1986) Effects of vitamins C y E on N-Nitroso compound formation, carcinogenesis, and cancer. *Cancer* 58:1842-1850.
- Mirvish, S.S y K. Laughlin (1986) Lack of vitamin E inhibition of nitrosamine formation from NO<sub>2</sub>-derived nitrosating agent in mouse skin. En: *Antimutagenesis and anticarcinogenesis: mechanisms.* (D.M. Shankel, P.E. Hartman T.Kada y A.E. Hollaender, Eds.), Plenum press, Nueva York.
- Mollet, P. y F.E. Würgler (1974) Detection of somatic recombination and mutation in *Drosophila*: a method for testing genetic activity of chemical compounds. *Mutation Res.* 25:421-424.
- Norton, T.R. (1975) Metabolism of toxic substances. En: *Toxicology, the basic science of poisons.* ( L.J. Casaret y J.Doull, Eds.), Macmillan, Pub.Co. Nueva York, pp. 45-132.
- Nöthiger, R. (1970) Sucrose density separation: a method for collecting large numbers of *Drosophila* larvae. *Dros. Inf. Serv.* 45:177.
- Novick, A. y L. Szilard (1952) Anti-mutagens. *Nature* (London). 170:926-927.
- Ong, T., W.Z. Whong., J. Stewart y H.E. Brockman (1986) Chlorophyllin: a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures. *Mutat. Res.* 173:11-115.

- Ong, T., W.Z. Whong., J.D. Stewart y H.E. Brockman (1989) Comparative antimutagenicity of 5 compounds against 5 mutagenic complex mixtures in *Salmonella typhimurium* strain TA98. *Mutat. Res.*22:19-25.
- Pan, S.S., P.A. Andrews y C.J. Glover (1984) Reductive activation of MMC y MMC metabolites catalysed by NADPH-cytochrome P-450 reductase and xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*259:959-966.
- Parcker, J.E., J.S. Mahood., V.O. Mora-Arellano., T.F. Slater., R.L. Wilson y B.S. Wolfenden (1981) Free radicals and singlet oxygen scavengers: reaction of a peroxy-radical with  $\beta$ -carotene, diphenyl furan and 1,4,diazobicyclo (2,2,2,-)octane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*98:901-906
- Perchellet, J.P., M.D. Owen., T.D. Posey., D.K. Orten y B.A. Schneider (1985) Inhibitory effects of glutathione level-raising agents and D- $\alpha$  tocopherol on ornithine decarboxylase induction and mouse skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Carcinogenesis* 6:567-573.
- Perchellet, J.P., N.L. Abney., R.M. Thomas., Y.L. Guislain y E.M. Perchellet (1987) Effects of combined treatments with selenium, glutathione, and vitamin E on glutathione peroxidase activity, ornithine decarboxylase induction, and complete and multistage carcinogenesis in mouse skin. *Cancer Res.*47:477-485.
- Peto, R., R. Doll., J.D. Buckley y M.B. Sporn (1981) Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? *Nature (London)* 290:201-208.
- Plaa, G.L. y H. Witschi (1976) Chemicals, drugs, and lipid peroxidation. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*16:125-141.
- Pratt, W. y M.D. Ruddon (1979) The anticancer drugs. Nueva York. Oxford University Press. Nueva York, 323 pp.
- Radman, M. y A.R. Kinsella (1980) Chromosomal events in carcinogenic initiation and promotion: implications for carcinogenicity testing and cancer prevention strategies. En: "Molecular and cellular aspects of carcinogen screening tests". ( R. Montesano, H. Bartsch, L. Tomatis

- Eds.), International Agency for Research on Cancer. Lyon, pp. 75-90.
- Raj. A.S. y M. Katz (1985)  $\beta$ -carotene as an inhibitor of benzo(a)pirene and mitomycin C induced chromosome-breaks in the bone marrow of mice. *Can. J. Genet. Cytol.* 27: 598-602.
- Rasmuson, B., H. Svahlin., A. Rasmuson., I. Montell y H. Olefsson (1978) The use of a mutationally unstable X-chromosome in *Drosophila melanogaster* for mutagenicity testing. *Mutat. Res.* 54:33-38.
- Ramel, C. (1986) Deployment of short-term assays for the detection of carcinogens: genetic and molecular considerations. *Mutat. Res.* 168:327-342.
- Ramel, C., U.K. Alekperov., B.N. Ames., T. Kada y L.W. Wattenberg (1986) Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis. Report by ICPENC expert group on antimutagens and desmutagens. *Mutat. Res.* 168:47-65.
- Rieder, A., M. Adamek y H. Wrba (1983) Delay of diethyl-nitrosamine-induced hepatoma in rats by carrot feeding. *Oncology* 40:120-123.
- Sainsbury, M. (1979) Natural products in the fight against cancer. *Chem. Brit.* 15:127-130
- Salmon, S.E. y A.C. Sartorelli (1990) Quimioterapia del cáncer. En: *Farmacología básica y clínica.* ( B.G. Katzung, Ed.), El Manual Moderno. México.
- SantaMaria, L., A. Bianchi., A. Arnaboldi y L. Andreoni (1981) Prevention of the benzo(a)pirene photocarcinogenic effect by B-carotene and canthaxanthin. *Med. Biol. Environ.* 9: 113-120.
- Saul, R.L. y B.N. Ames (1986) Background levels of DNA damage in the population. En: *Mechanisms of DNA damage and repair: implications for carcinogenesis and risk assessment.* ( M.G. Simic., L. Grossman y A.C. Upton, Eds.), Plenum Press, Nueva York. pp. 529-536.

- Shamburger, R.J., F.F. Baughman., S.L. Kalchert., C.E. Willis y G.C.Hoffman (1973) Carcinogen-induced chromosomal breakage decreased by antioxidants. Proc. Natl. Acad. Sci.(USA) 70:1461-1463.
- Shamburger, R.J., C.L.Carlett., K.D. Beaman y B.L. Kastern. (1979) Antioxidants reduced the mutagenic effect of malonaldehyde and  $\beta$ -propiolactone. IX Antioxidants and cancer. Mutat. Res.66:349-355.
- Schewe,M.J., D.T. Suzuki y U. Erasmus (1971) The genetic effects of mitomycin-C in *Drosophila melanogaster* II Induced meiotic recombination. Mutat. Res.12:269-279.
- Shekelle, R.B., S. Lui., W.J. Raynor., M. Lepper., C. Maliza., A.H. Rossof., O. Paul., A.M. Shyrook y J. Stamler (1981) Dietary vitamin A and risk of cancer in the western electric study. Lancet 2:1185-1190.
- Shelby, P.B. y W.H. Olson (1981) Methods and criteria for deciding whether specific locus mutation rate data in mice indicate a positive, negative or inconclusive result. Mutat. Res.83:403-418.
- Smalls, E. y R.M. Pettersen (1982) Reduction of benzo( $\alpha$ )pyrene induced chromosomal aberrations by d,l, $\alpha$  tocopherol. Eur. J. Cell Biol.26:96-97.
- Spurgeon, S.L. y J.W. Porter (1983) Biosynthesis of carotenoids. En:Biosynthesis of isoprenoid compounds. (J.M. Porter y S.L. Spurgeon, Eds.), Vol.2 Wiley and Sons, Nueva York, pp 1-122.
- Steiner, M. y J. Anastasi (1976) Vitamin E: an inhibitor of the platelet release reaction. J. Clin. Invest.57:732-737.
- Stich, H.F., W. Stich., M.P. Rosin y M.O. Vallejera (1984) Use of the micronucleus test to monitor the effect of vitamin A, beta-carotene and canthaxanthin on the buccal mucosa of betal nut/tobacco chewers. Int. J. Cancer 34:745-750.
- Stich, H.F., A.P. Hornby y B.P. Dunn (1985) A pilot beta-carotene intervention trial with inuits using smokeless tobacco. Int J. Cancer 36:321-327.

- Stock, J.A. (1970) Chemoterapy of cancer. Chem. Brit.6(1): 11-16.
- Sugiyama, M., A. Ando y R. Ogura (1989) Effect of vitamin E on survival, glutathione reductase and formation of chromium (V) in chinese hamster V-79 cells treated with sodium chromate (VI). Carcinogenesis 10:737-741.
- Sugiyama, M., X. Lin y M.Costa (1991) Protective effect of vitamin E against chromosomal aberrations and mutation induced by sodium chromate in chinese hamster V79 cells. Mutat. Res.260:19-23.
- Summerfield, F.W. y A.L. Tappel (1984) Vitamin E protects against methyl ethyl ketone peroxide-induced peroxidative damage to rat brain DNA. Mutat. Res.126:113-120.
- Szabad, J., I. Poos., G. Polgar y G. Hejja (1983) Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the Drosophila mosaic and the sex-linked recessive lethals tests. Mutat. Res.113:117-133.
- Temple, N.J. y T.K. Basu (1987) Protective effect of B-carotene against colon tumors in mice. JNCL 78:1211-1214.
- Vogel, E. y F.H. Sobels (1976) The function of Drosophila in genetic toxicology testing. En: Chemical mutagens, principles and methods for their detection. (A. Hollander Ed.), Plenum Press, Nueva York, Vol.4. pp. 93-142.
- Vogel, E., W.G.H. Blijleven., P.M. Klapwijk., J.A. Zijlstra (1980) Some current perspectives of the application of Drosophila in the evaluation of carcinogens. En: The predictive value of short-term screening tests in carcinogenicity. (G.M. Williams et al. Eds.), Amsterdam, Elsevier. pp.125-147.
- Vogel, E., A. Schalet., W.R. Lee y F.Würgler (1981) Mutagenicity of selected chemicals in Drosophila. En: Comparative chemicals mutagenesis. (F.J. De Serres y M.D. Shelby Eds.), Plenum Press, Nueva York. pp.176-248.

- Vogel, E.W. (1987) Discussion Forum. Evaluation of potential mammalian genotoxins using *Drosophila*: the need for a change in test strategy. *Mutagenesis* 2:161-171.
- Vogel, E.W. y J.A. Zijlstra (1987) Mechanistic and methodological aspects of chemically-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 182:243-264.
- Vogel, E.W. y A. Szakmary (1990) Basic principles and evaluation of results of assays measuring genotoxic damage in somatic cells of *Drosophila*. En: *Mutation and the environment. Part. B*, pp 149-158.
- Waters, M.D., A.L. Brady., H.F. Stack y H.E. Brockman (1990) Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutation Res.* 238:57-85.
- Wattenberg, L.W. (1981) En: *Cancer achievements. Challenge and prospects for the 1980s.* (J.H. Buchernal y H.F. Oettgen, Eds.), Grune y Stratton, Nueva York, pp 517-540.
- Wattenberg, L.W. (1983) Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. *Cancer Res. Suppl.* 43:2448-2453.
- Wayner, D., G.W. Burton., K.V. Ingold., L.R.C. Barclay y S.J. Locke (1987) The relative contributions of  $V_e$ , urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim. Biophys. Acta* 924:408-419.
- Weitberg, A.B., S.A. Weitzman., E.P. Clark y T.P. Stossel (1985) Effects of antioxidants on oxidant-induced sister chromatid exchange formation. *J. Clin. Invest.* 75:1835-1841
- Wilkins, A.S. (1986) *Genetic analysis of animal development* Wiley, Nueva York, 546 p.
- Würgler, F.E., F.H. Sobels y E. Vogel (1984) *Drosophila* as an assay system for detecting genetic changes. En: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures.* (B.J. Kilbey et al. Eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Vol. 2A, pp 55-601.



Würgler, F.E., U. Graf. y H. Frei (1985) Somatic mutation and recombination test in wings of *Drosophila melanogaster*. (J. Ashby y F.J de Serres et al. Eds). Progress in mutation research. Elsevier, Amsterdam. Vol. 5, pp. 325-340.

Würgler, F.E. y E.W. Vogel (1986) *In vivo* mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*, En: Chemical mutagens. Principles and methods for their detection. (F.J. de Serres Ed.), Plenum, Nueva York, Vol. 10, pp. 1-59.

Ziegler, R.G. (1989) A review of epidemiological evidence that carotenoids reduce the risk of cancer. J. Nutr.119: 116-122.

Zijlstra, J.A. (1984) Bioactivation and inactivation of mutagens in *Drosophila*. Mutat. Res.130:276-322.

Zijlstra, J.A. (1987) Pharmacological and mechanistic aspects of chemically induced mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. Druk: Krips Repro Meppel. pp.7-20.

Zimmering, S. (1975) Utility of *Drosophila* for detection of potential environmental chemical mutagens. Ann. N.Y. Acad. Sci.269:26-33.

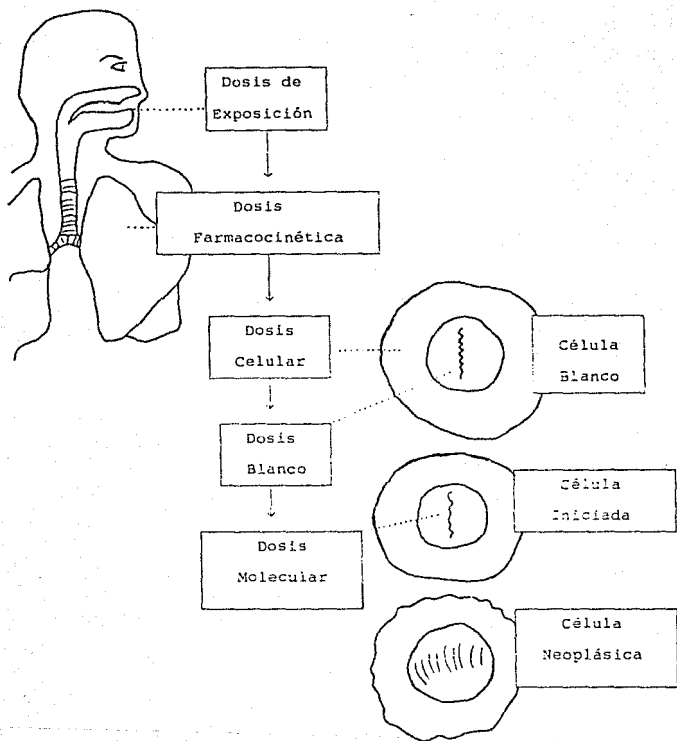


Figura 1. Niveles de exposición a agentes xenobióticos y su correlación con efectos genotóxicos en células somáticas (De Flora y Ramel, 1988).

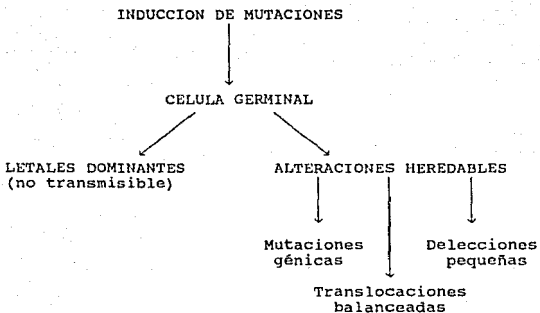


Figura 2. Inducción de mutaciones génicas y/o cromosómicas en células germinales (Modificado de Brusick, 1987).

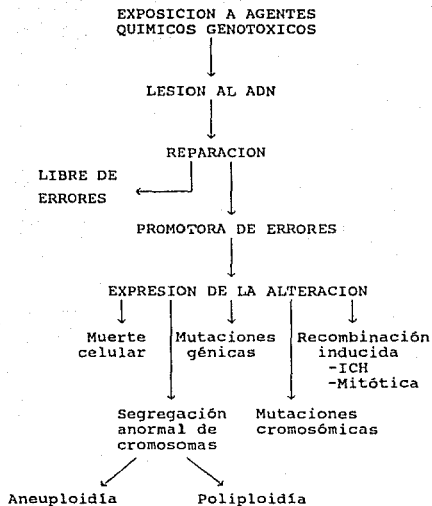


Figura 3. Daño genético inducido en células somáticas y germinales después de la exposición a agentes químicos genotóxicos (Modificado de Brusick, 1987).

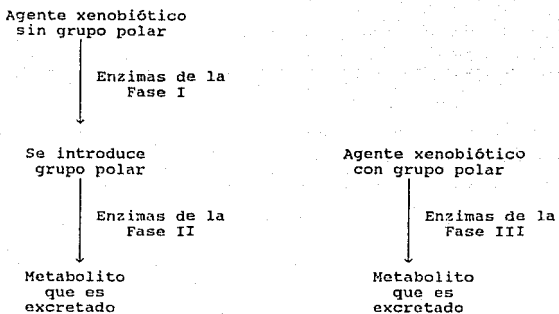


Figura 4. Rutas metabólicas de los compuestos polares y no polares (Wattenberg, 1983).

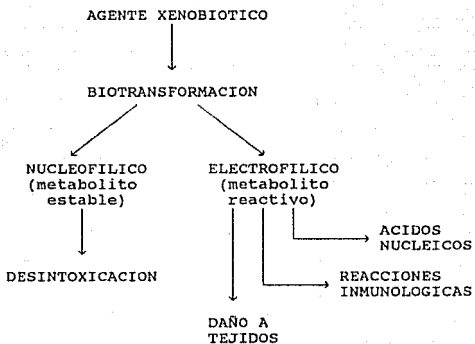
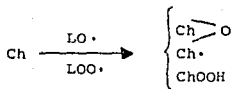
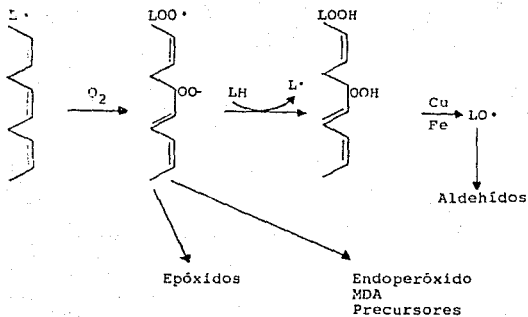


Figura 5. Formación de metabolitos (Rodríguez-Arnaiz R. comunicación personal).



Mutágenos/Carcinógenos

L·  
 LO·  
 LOO·  
 ch·

LOOH  
 ChOOH

L > O  
 Ch > O  
 α,β

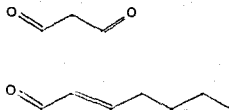


Figura 6. Peroxidación de los lípidos (Ames y Gold, 1991).  
 L = radical lipídico; L' = radical alcoxy lipídico; LOO = radical hidroperóxi lipídico; LOOH = hidroperóxido lipídico; Ch = colesterol; Ch > O = epóxido de colesterol; L > O = epóxido lipídico; MDA = malondialdehído.

Categoría de inhibidores

Secuencia que conduce a efectos genotóxicos

Inhibidores que inactivan mutágenos o que impiden la formación de compuestos genotóxicos

Agentes bloqueadores atrapadores de radicales

Agentes que actúan sobre la reparación de ADN.  
Agentes supresores

Compuestos precursores

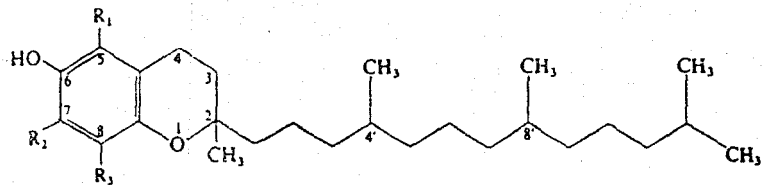
Compuestos genotóxicos

Reacciones con blancos celulares

Manifestación genotóxica

Figura 7. Clasificación de los inhibidores de genotoxicidad sobre la base del tiempo en el cual ejercen sus efectos protectores (Ramel *et al.* 1986).

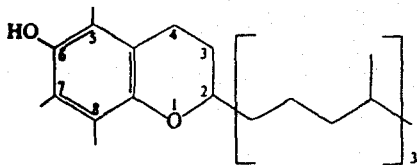




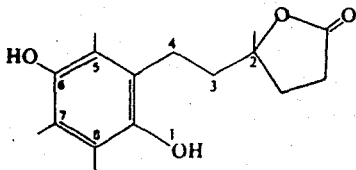
Tocoferoles

-Tocoferol	-Tocol	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
α-	5,7,8-Trimetil	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
β-	5,8-Dimetil	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
γ-	7,8-Dimetil	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
δ-	8-Metil	H	H	CH <sub>3</sub>
-	5,7-Dimetil	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
-	5-Metil	CH <sub>3</sub>	H	H
-	7-Metil	H	CH <sub>3</sub>	H
-	Tocol	H	H	H

Figura 8. Estructura química de los tocoferoles (Herrera, 1986).



Tocopherol



Tociferonolactona

Figura 9. Uno de los productos de la oxidación del  $\alpha$  - tocoferol.  
(Herrera, 1986).

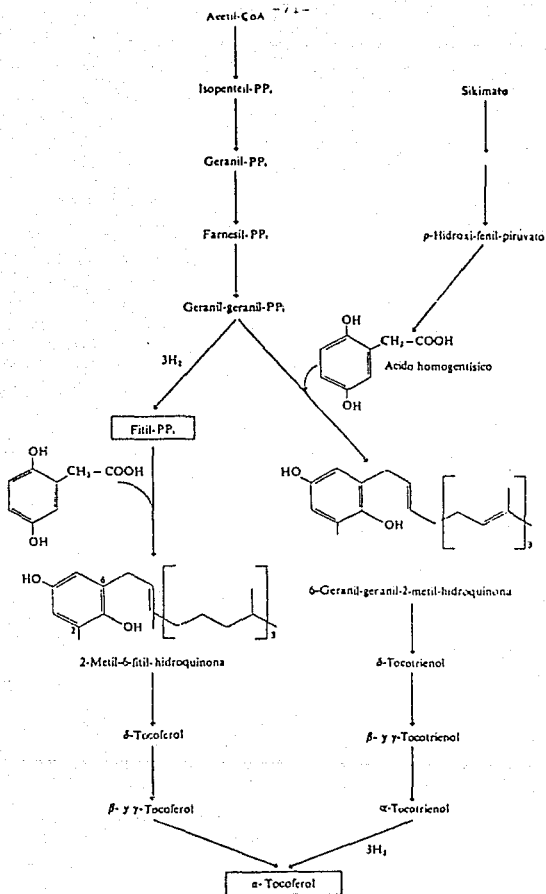
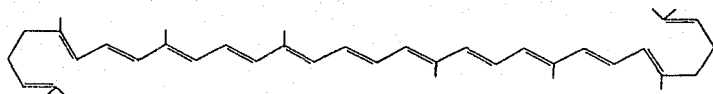
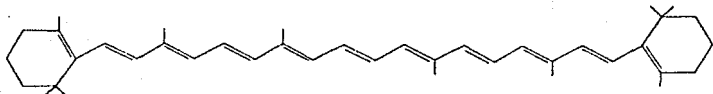


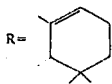
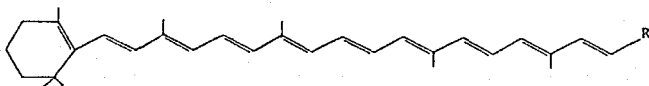
Figura 10. Biosíntesis de la vitamina E según la ruta propuesta por Pennock (Herrera, 1986).



Licopeno



$\beta$ -Caroteno



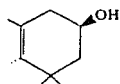
$\alpha$ -Caroteno



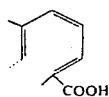
$\gamma$ -Caroteno



3-Deshidro- $\beta$ -caroteno



Criptoxantina



Torularodina

Figura 11. Estructura de carotenoides y sustancias relacionadas (Herrera, 1986).

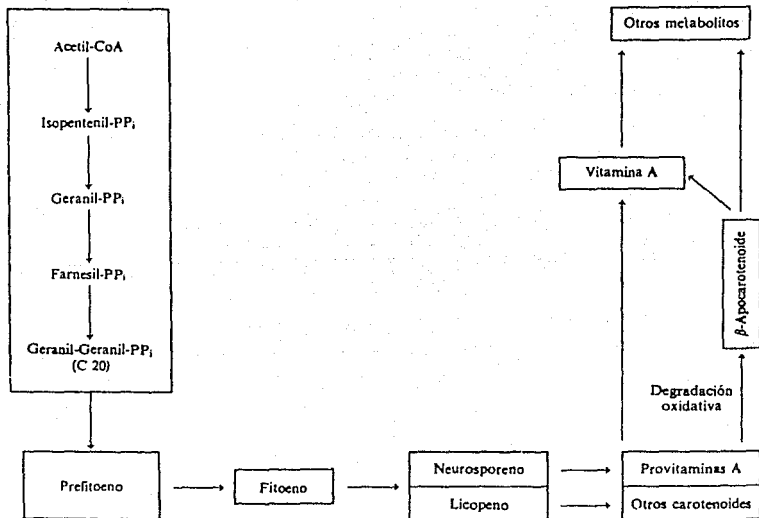


Figura 12. Biosíntesis de la vitamina A. Los  $\beta$ -apocarotenoides se forman a partir de  $\alpha$  y  $\gamma$ - caroteno por degradación oxidativa (Herrera, 1986).

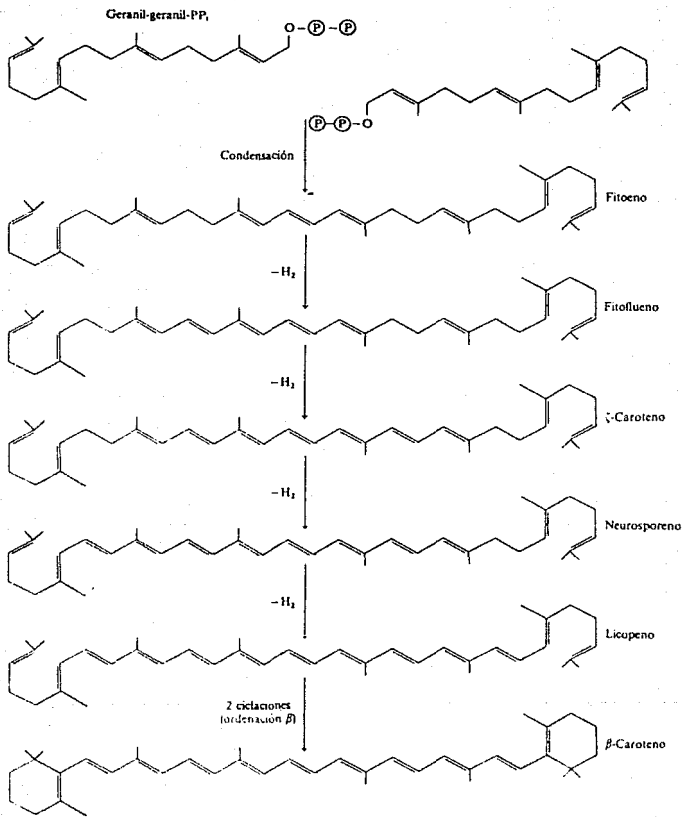


Figura 13. Biosíntesis del β-caroteno (Herrera,

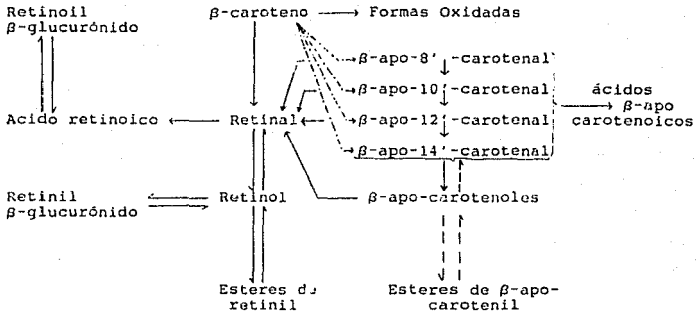


Figura 14. Transformaciones posibles del  $\beta$ -caroteno en mamíferos (Las reacciones biológico-enzimáticas conocidas están señaladas con flechas sólidas, las reacciones no demostradas por flechas con guiones y las posibles reacciones biológicas o no biológicas por flechas con guiones y puntos (Allen, 1989)).

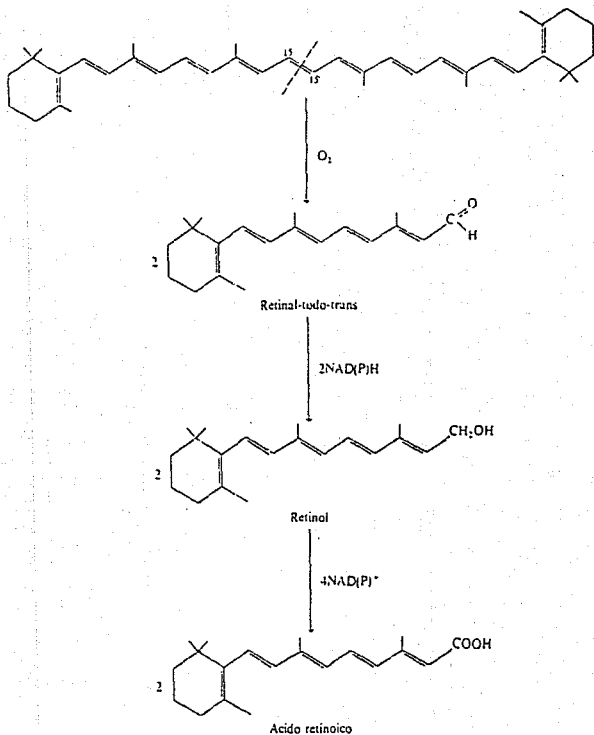


Figura 15. Mecanismo de la conversión de la provitamina A en retinal, retinol y ácido retinoico (Herrera, 1986).



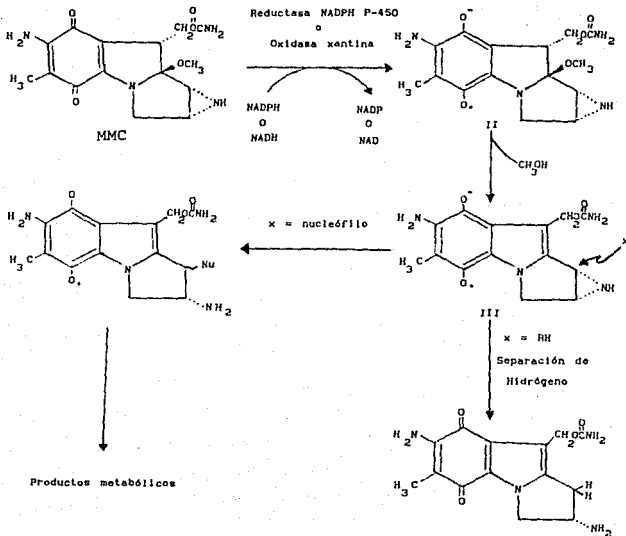


Figura 16. Activación enzimática de la MMC (Pan et al 1984).  
 Formación de un radical anión (II) y eliminación de metanol, para formar un intermediario III.  
 División del anillo aziridina y ataque nucleofílico para formar productos metabólicos y 2,7-diaminomitoseno por separación de un hidrógeno.

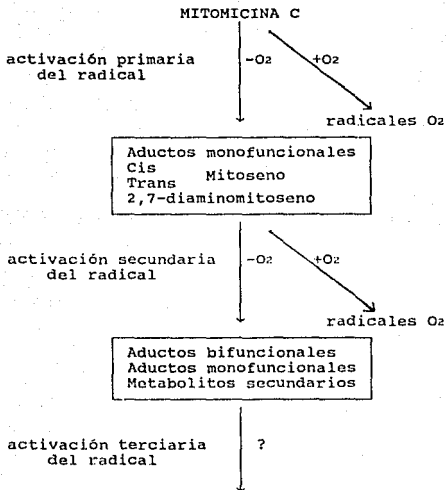


Figura 17. Citotoxicidad de la MMC en niveles metabólicos múltiples: aeróbicos ( $+O_2$ ) y anaeróbicos ( $-O_2$ ). (Pan *et al.* 1984)

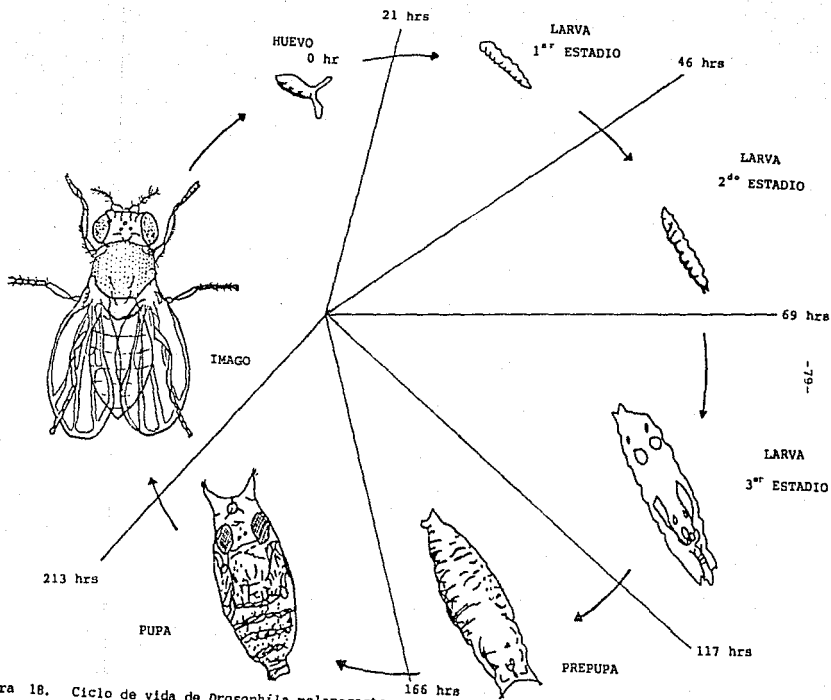


Figura 18. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

a 25°C y 60 % de humedad

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

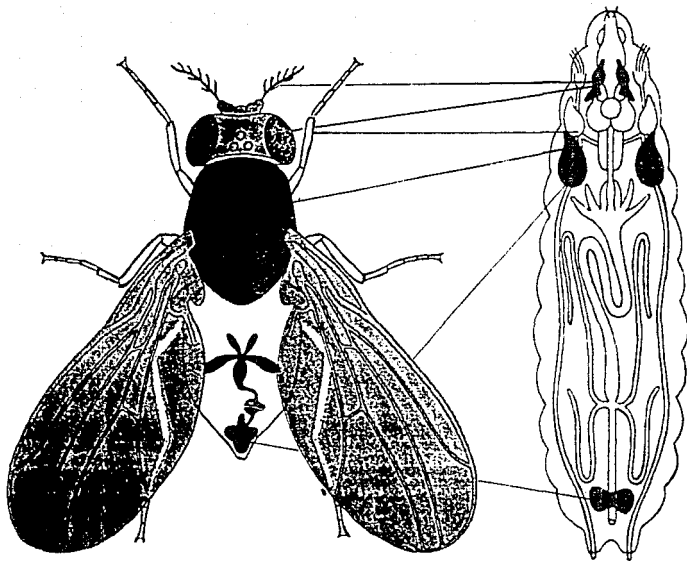


Figura 19. Discos imagales en la larva de *Drosophila melanogaster* y estructuras a las que dan origen en el adulto.

MITOSIS CELULAS HIJAS TIPO DE MANCHA

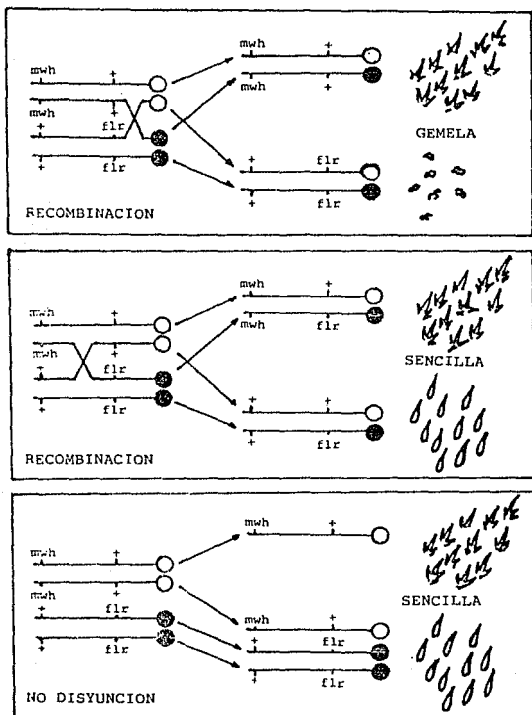


Figura 20. Eventos genéticos y tipos de manchas inducidos en las células somáticas del ala de *Drosophila melanogaster* (Graf *et al.* 1984).

MITOSIS CELULAS HIJAS TIPO DE MANCHA

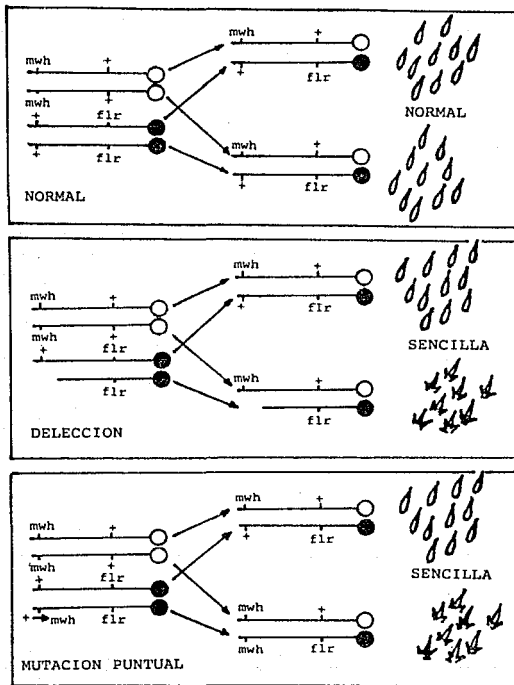


Figura 20. Continuación.

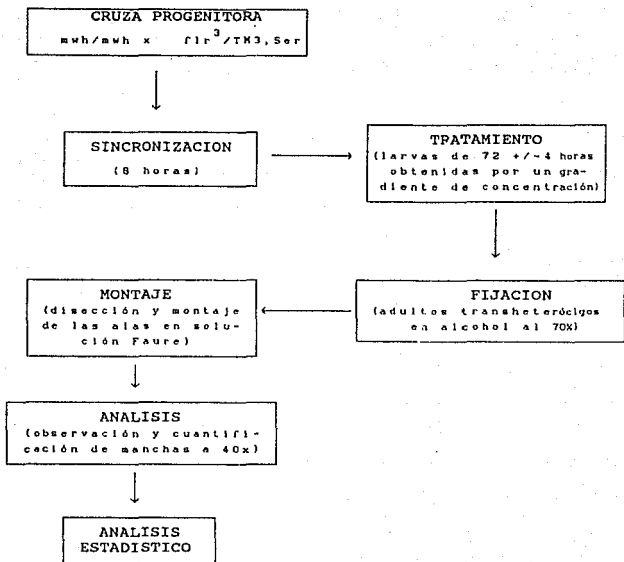


Figura 21. Cronograma de la técnica de SMART (ala).

1.- Agudo - crónico

A) HMC  
Larvas (0.625 mM) +  $\beta$ -caroteno ----- Imago  
6 horas (100 ppm)  
(AGUDO) (CRONICO)

B) HMC  
Larvas (0.625 mM) + Vitamina E ----- Imago  
6 horas (100 ppm)  
(AGUDO) (CRONICO)

2.- Mezcla crónica

C) HMC +  $\beta$ -caroteno  
Larvas (0.625 mM) (100 ppm) ----- Imago  
(CRONICO)

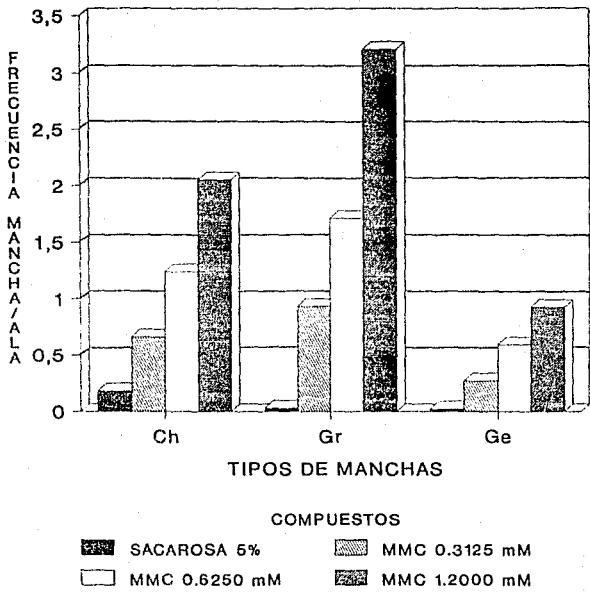
D) HMC + Vitamina E  
Larvas (0.625 mM) (100 ppm) ----- Imago  
(CRONICO)

Figura. 22 Tratamientos experimentales empleados en la presente tesis, a larvas de 72  $\pm$  4 horas.



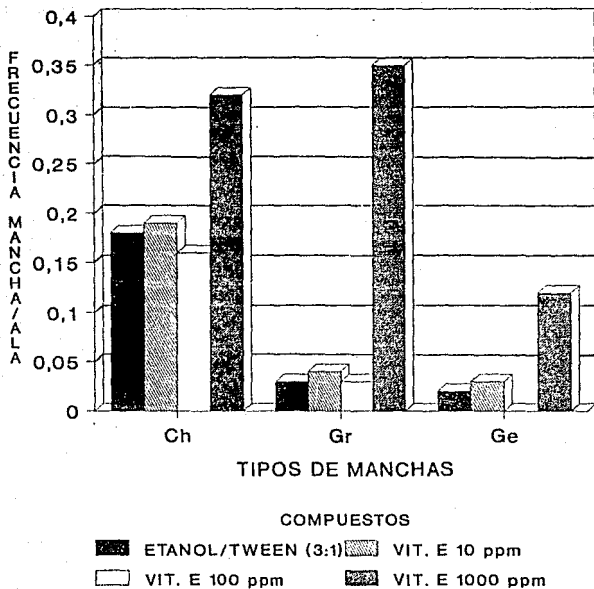
	SE ACEPTA H <sub>A</sub>	SE RECHAZA H <sub>A</sub>
SE ACEPTA H <sub>0</sub>	Indeterminado	Negativo
SE RECHAZA H <sub>0</sub>	Positivo	Débil Positivo

Figura 23. Clasificación estadística de los compuestos genotóxicos de acuerdo con Frei y Würzler (1988).



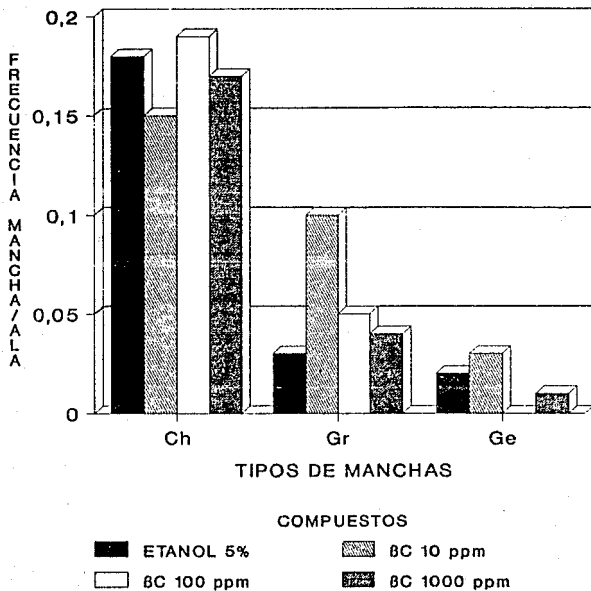
Ch(CHICAS),Gr(GRANDES),Ge(GEMELAS)

**FIG. 24 FRECUENCIA DE MANCHAS/ALA INDUCIDA POR MMC (CRONICA) EN CELULAS DEL ALA DE *Drosophila melanogaster***



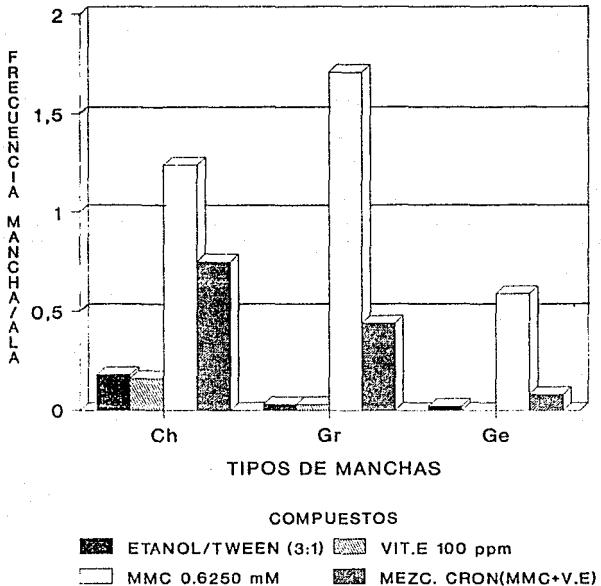
Ch(CHICAS),Gr(GRANDES),Ge(GEMELAS).

**FIG. 25 FRECUENCIA DE MANCHAS/ALA INDUCIDA POR LA VITAMINA E (CRONICA) EN CELULAS DEL ALA DE *Drosophila melanogaster***



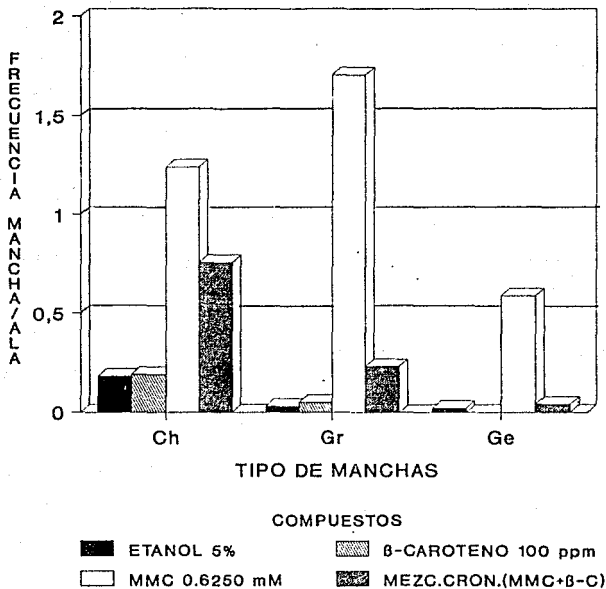
Ch(CHICAS),Gr(GRANDES), Ge(GEMELAS).

**FIG. 26 FRECUENCIA DE MANCHAS/ALA INDUCIDA POR  $\beta$ -CAROTENO (CRONICO) EN CELULAS DEL ALA DE *Drosophila melanogaster***



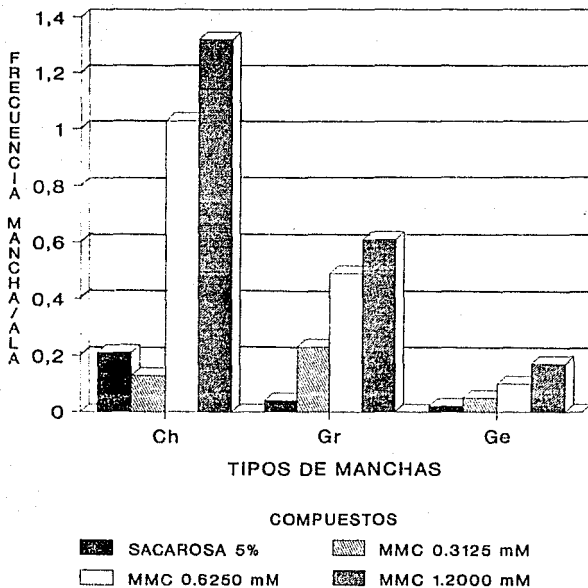
Ch(CHICAS),Gr(GRANDES),Ge(GEMELAS).

**FIG. 27 FRECUENCIA DE MANCHAS/ALA INDUCIDA POR MMC+VIT.E (MEZCLA CRONICA) EN CELULAS DEL ALA DE *Drosophila melanogaster***



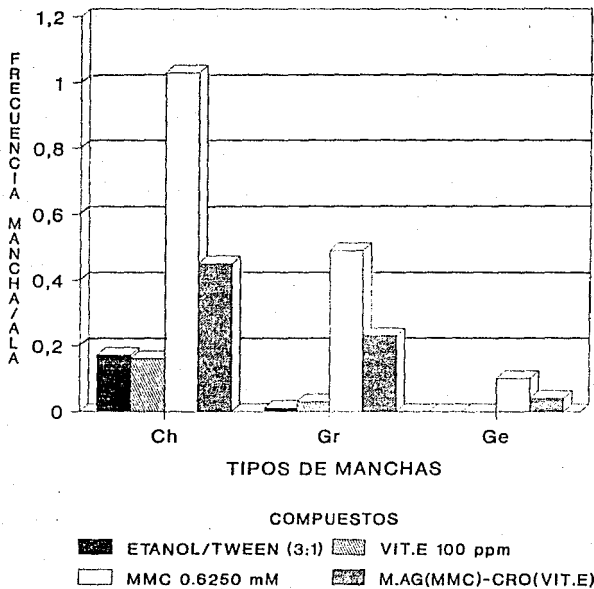
Ch(CHICAS), Gr(GRANDES), Ge(GEMELAS).

**FIG. 28 FRECUENCIA DE MANCHAS/ALA INDUCIDA POR MMC +  $\beta$ -CAROTENO (MEZCLA CRONICA) EN CELULAS DEL ALA DE *Drosophila melanogaster***



Ch(CHICAS),Gr(GRANDES),Ge(GEMELAS).

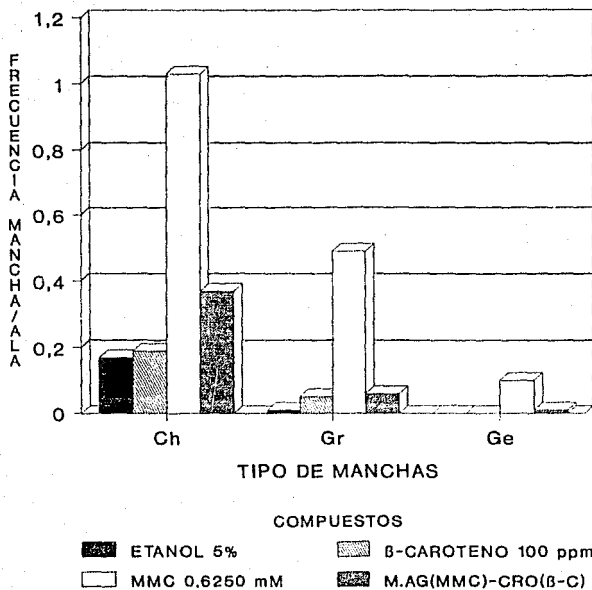
**FIG. 29 FRECUENCIA DE MANCHAS/ALA INDUCIDA POR MMC (AGUDA) EN CELULAS DEL ALA DE *Drosophila melanogaster***



Ch(CHICAS),Gr(GRANDES),Ge(GEMELAS).

**FIG. 30 FRECUENCIA DE MANCHAS/ALA INDUCIDA POR MMC+VIT.E (AGUDO-CRONICO) EN CELULAS DEL ALA DE *Drosophila melanogaster***





Ch(CHICAS,Gr(GRANDES),Ge(GEMELAS))

**FIG. 31 FRECUENCIA DE MANCHAS/ALA INDUCIDA POR MMC +  $\beta$ -CAROTENO (AGUDO-CRONICO) EN CELULAS DEL ALA DE *Drosophila melanogaster***

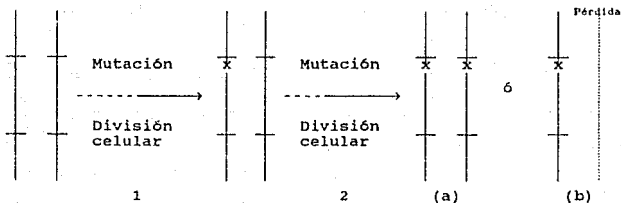


Figura 32. La mitogénesis aumenta la mutagénesis (Ames y Gold, 1991).

La división celular inducida aumenta la mutagénesis debido a: los aductos en el ADN se convierten en mutaciones (1 y 2a); vulnerabilidad del ADN durante la replicación (1 y 2a); recombinación mitótica (2a); conversión génica (2a) y no disyunción (2b).

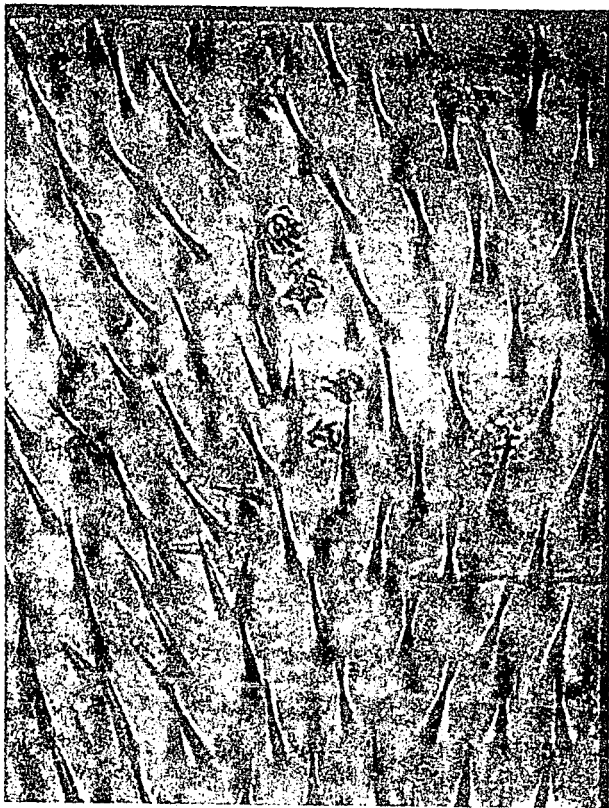


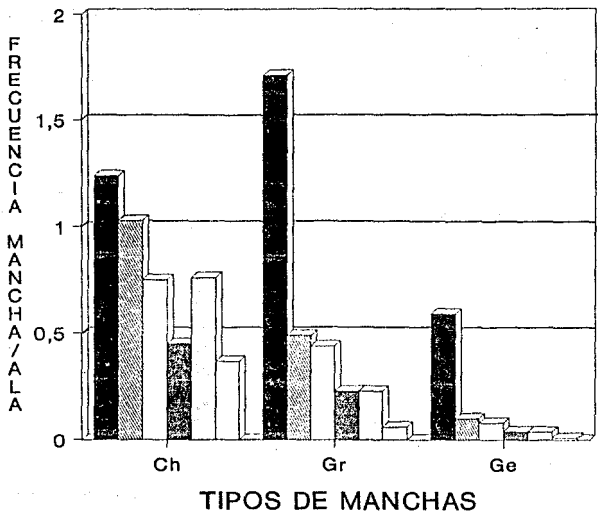
Figura 33. Mancha gemela *mwh-flr3*.



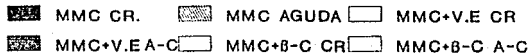
Figura 34. Mancha sencilla mwh.



Figura 35. Mancha sencilla fir<sup>3</sup>.



COMPUESTOS



Ch(CHICAS),Gr(GRANDES),Ge(GEMELAS)

FIG. 36 RESUMEN

**Tabla 1**  
**Mecanismos de los inhibidores de mutagénesis y carcinogénesis**  
**(De Flora y Ramel, 1988)**

<b>Clasificación</b>	<b>Ejemplos</b>
<b>1. Inhibidores de mutagénesis que actúan extracelularmente:</b>	
<b>1.1 Inhibiendo la entrada de mutágenos o de sus precursores</b>	
1.1.1. Obstruyendo su penetración	
1.1.1.1. dentro del organismo.....	estrategias de protección del cuerpo.
1.1.1.2. dentro de las células.....	ácidos grasos, putrescina, aminoácidos aromáticos, iodo.
1.1.2. Favoreciendo su eliminación.....	fibras.
<b>1.2 Inhibiendo la formación endógena de mutágenos</b>	
1.2.1. Inhibiendo las reacciones de nitración.....	ácido ascórbico, tocoferoles fenoles.
1.2.2. Modificando la flora intestinal .....	productos comestibles fermentados.
<b>1.3 Desactivando mutágenos</b>	
1.3.1. Por reacción física.....	mantenimiento del pH en los fluidos corporales.
1.3.2. Por reacción química.....	tioles, antioxidantes.
1.3.3. Por reacción enzimática.....	vegetales con actividad peroxidasa.
<b>2. Inhibidores de mutagénesis que actúan intracelularmente:</b>	
<b>2.1 Moduladores del metabolismo<sup>b</sup></b>	
2.1.1. Inhibiendo la replicación celular.....	retinoides.
2.1.2. Favoreciendo la captura de mutágenos en células no blanco.....	tioles.
2.1.3. Inhibiendo la activación de promutágenos.....	moduladores de reacciones de la fase I, principios de plantas crucíferas.
2.1.4. Induciendo mecanismos de desintoxicación.....	fenoles, tioles.
<b>2.2 Bloqueando moléculas reactivas:</b>	
2.2.1. Reaccionando con electrófilos	
2.2.1.1. Por reacción química.....	compuestos de azufre
2.2.1.2. Por reacción enzimática.....	inductores de reacciones de la fase II
2.2.2. Eliminando especies reactivas de oxígeno.....	varios antioxidantes
2.2.3. Protegiendo sitios nucleofílicos del ADN.....	ácido elágico, retinoides.

- 2.3. Moduladores de la replicación o reparación del ADN.<sup>d</sup>
  - 2.3.1. Aumentando la fidelidad de la replicación del ADN.....cloruro de cobalto, arsenito de sodio.
  - 2.3.2. Favoreciendo la reparación del daño al ADN.....cinamaldehído, cumarina, umbeliferona, vainillina, tioles
  - 2.3.3. Inhibiendo los caminos de reparación sujeta a error.....inhibidores de proteasas.
- 3. Inhibidores que actúan sobre células iniciadas o neoplásicas:
  - 3.1. Moduladores de la promoción tumoral.
    - 3.1.1. Inhibiendo efectos genotóxicos.....Ver 1 y 2
    - 3.1.2. Eliminando radicales libres ...varios antioxidantes.
    - 3.1.3. Inhibiendo la proliferación celular.....retinoides, glucocorticoides, hipertermia.
    - 3.1.4. Induciendo la diferenciación celular.....retinoides, glucocorticoides calcio, vitamina D.
    - 3.1.5. Modulando la señal de transducción.....inhibidores de proteína cinasa C.
  - 3.2. Moduladores de la progresión tumoral.
    - 3.2.1. Inhibiendo efectos genotóxicos.....Ver 1 y 2
    - 3.2.2. Actuando sobre hormonas o factores de crecimiento.....tratamientos hormonales, antagonistas de la dopamina, inhibidores de proteasas.
    - 3.2.3. Actuando sobre el sistema inmune.....inmunoreguladores (retinoides lipotropos), vacunas, anticuerpos monoclonales.
    - 3.2.4. Agentes antineoplásicos físicos, químicos y biológicos.....radiación, drogas antiblásticas, interferón.
    - 3.2.5. Modulando la señal de transducción.....Inhibidores de proteína cinasa C.

<sup>a</sup> Inhibidores del estado 1 de acuerdo con Ramel et al. (1986). Aquello que actúan *in vitro* fuera de las células blanco también han sido referidos como desmutágenos por Kada et al. (1982).

<sup>b</sup> Inhibidores del estado 2 de acuerdo con Ramel et al. (1986).

<sup>c</sup> Agentes bloqueadores de acuerdo con Wattenberg (1981).

<sup>d</sup> Bioantimutágenos o antimutágenos en sentido estricto de acuerdo con Kada et al. (1982).

<sup>e</sup> Agentes supresores de acuerdo con Wattenberg (1981).



TABLA II. FRECUENCIA DE MANCHAS/ALA INDUCIDA POR MMC (CRONICA)  
EN CELULAS DEL ALA DE *Drosophila melanogaster*

COMPUESTO [ ]	NUMERO DE ALAS	TIPO DE MANCHA						TOTAL	
		Ch m=2		Gr m=5		Ge m=5		MANCHA/ALA m=2	
		No.	Fr.	No.	Fr.	No.	Fr.	No.	Fr.
TESTIGO NEGATIVO									
SACAROSA 5%	80	14	0.17	1	0.01	2	0.02	17	0.21
MMC 0.3125 mM	70	46	0.66*	65	0.93*	19	0.27*	130	1.86*
0.6250 mM	160	199	1.24*	273	1.71*	95	0.59*	567	3.54*
1.2000 mM	114	234	2.05*	366	3.21*	105	0.92*	705	6.18*

El análisis estadístico se realizó con el programa de cómputo CHART (Frei y Würzler, 1988): +=positivo; -=negativo; d=débil positivo; i=indeterminado; m=factor de multiplicación.  
Niveles de probabilidad:  $\alpha=\beta=0.05$ .  
Prueba estadística de una cola.

Ch(CHICAS), Gr(GRANDES), Ge(GEMELAS).

TABLA III. FRECUENCIA DE MANCHAS/ALA INDUCIDA POR VIT.E (CRONICA)  
EN CELULAS DEL ALA DE *Drosophila melanogaster*

COMPUESTO [ ]	NUMERO DE ALAS		TIPO DE MANCHA						TOTAL MANCHA/ALA m=2	
			Ch m=2		Gr m=5		Ge m=5			
			No.	Fr.	No.	Fr.	No.	Fr.		
TESTIGO NEGATIVO ETANOL/TWEEN (3:1)	114	21	0.18	3	0.03	2	0.02	26	0.23	
VIT. E 10 ppm	78	15	0.19 <sup>-</sup>	3	0.04 <sup>!</sup>	2	0.03 <sup>!</sup>	20	0.26 <sup>-</sup>	
100 ppm	80	13	0.16 <sup>-</sup>	2	0.03 <sup>!</sup>	0	0.00 <sup>-</sup>	15	0.19 <sup>-</sup>	
1000 ppm	80	26	0.32 <sup>*</sup>	28	0.35 <sup>*</sup>	10	0.12 <sup>*</sup>	64	0.80 <sup>*</sup>	

+positivo; -=negativo; d\*=débil positivo; i=indeterminado; m=factor de multiplicación.

Niveles de probabilidad:  $\alpha=\beta=0.05$ .

Prueba estadística de una cola.

Ch(CHICAS), Gr(GRANDES), Ge(GEMELAS).

TABLA IV. FRECUENCIA DE MANCHAS/ALA INDUCIDA POR B-CAROTENO (CRONICO) EN CELULAS DEL ALA DE *Drosophila melanogaster*

COMPUESTO [ ]	NUMERO DE ALAS		TIPO DE MANCHA						TOTAL	
			Ch m=2		Gr m=5		Ge m=5		MANCHA/ALA m=2	
			No.	Fr.	No.	Fr.	No.	Fr.	No.	Fr.
TESTIGO NEGATIVO ETANOL 5%	114	21	0.18	3	0.03	2	0.02	26	0.23	
B-CAROTENO 10 ppm	80	12	0.15 <sup>-</sup>	8	0.10 <sup>*</sup>	2	0.03 <sup>1</sup>	22	0.28 <sup>1</sup>	
100 ppm	80	15	0.19 <sup>-</sup>	4	0.05 <sup>1</sup>	0	0.00 <sup>-</sup>	19	0.24 <sup>-</sup>	
1000 ppm	80	14	0.17 <sup>-</sup>	3	0.04 <sup>1</sup>	1	0.01 <sup>1</sup>	18	0.22 <sup>-</sup>	

+ = positivo; - = negativo; d<sup>+</sup> = débil positivo; i = indeterminado; m = factor de multiplicación.

Niveles de probabilidad:  $\alpha = \beta = 0.05$ .

Prueba estadística de una cola.

Ch(CHICAS), Gr(GRANDES), Ge(GEMELAS).

TABLA V. FRECUENCIA DE MANCHAS/ALA INDUCIDA POR MMC+VIT. E  
(MEZCLA CRONICA), EN CELULAS DEL ALA DE  
*Drosophila melanogaster*

COMPUESTO [ ]	NUMERO DE ALAS	TIPO DE MANCHA						TOTAL	
		Ch m=2		Gr m=5		Ge m=5		MANCHA/ALA m=2	
		No.	Fr.	No.	Fr.	No.	Fr.	No.	Fr.
TESTIGO NEGATIVO ETANOL/TWEEN (3:1)	114	21	0.18	3	0.03	2	0.02	26	0.23
VITAMINA E 100 ppm	80	13	0.16	2	0.03	0	0.00	15	0.19
TESTIGO POSITIVO MMC 0.625 mM	160	199	1.24 <sup>+</sup>	273	1.71 <sup>+</sup>	95	0.59 <sup>+</sup>	567	3.54 <sup>+</sup>
MEZCLA CRONICA VIT.E + MMC 100 ppm/0.625	80	60	0.75 <sup>-</sup>	35	0.44 <sup>-</sup>	6	0.08 <sup>-</sup>	101	1.26 <sup>-</sup>

+ = positivo; - = negativo; d<sup>+</sup> = débil positivo; i = indeterminado m = factor de multiplicación.

Niveles de probabilidad:  $\alpha = \beta = 0.05$ .

Prueba estadística de una cola.

Ch(CHICAS), Gr(GRANDES), Ge(GEMELAS).

TABLA VI. FRECUENCIA DE MANCHAS/ALA INDUCIDA POR MMC+ $\beta$ -CAROTENO (MEZCLA CRONICA), EN CELULAS DEL ALA DE *Drosophila melanogaster*

COMPUESTO [ ]	NUMERO DE ALAS	TIPO DE MANCHA						TOTAL	
		Ch m=2		Gr m=5		Ge m=5		MANCHA/ALA m=2	
		No.	Fr.	No.	Fr.	No.	Fr.	No.	Fr.
TESTIGO NEGATIVO ETANOL 5%	114	21	0.18	3	0.03	2	0.02	26	0.23
$\beta$ -CAROTENO 100 ppm	80	15	0.19	4	0.05	0	0.00	19	0.24
TESTIGO POSITIVO MMC 0.625 mM	160	199	1.24 <sup>+</sup>	273	1.71 <sup>+</sup>	95	0.59 <sup>+</sup>	567	3.54 <sup>+</sup>
MEZCLA CRONICA MMC+ $\beta$ -CAROTENO 0.625mM/100ppm	79	60	0.76 <sup>-</sup>	18	0.23 <sup>-</sup>	3	0.04 <sup>-</sup>	81	1.03 <sup>-</sup>

+ = positivo; - = negativo; d<sup>+</sup> = débil positivo; i = indeterminado; m = factor de multiplicación.

Niveles de probabilidad:  $\alpha = \beta = 0.05$ .

Prueba estadística de una cola.

Ch (CHICAS), Gr (GRANDES), Ge (GEMELAS).

TABLA VII. FRECUENCIA DE MANCHAS/ALA INDUCIDA POR MMC (AGUDA)  
EN CELULAS DEL ALA DE *Drosophila melanogaster*

COMPUESTO [ ]	NUMERO DE ALAS	TIPO DE MANCHA						TOTAL	
		Ch m=2		Gr m=5		Ge m=5		MANCHA/ALA m=2	
		No.	Fr.	No.	Fr.	No.	Fr.	No.	Fr.
TESTIGO NEGATIVO SACAROSA 5%	294	62	0.21	13	0.04	5	0.02	80	0.27
MMC 0.3125 mM	78	10	0.13 <sup>-</sup>	18	0.23 <sup>+</sup>	4	0.05 <sup>!</sup>	32	0.41 <sup>+</sup>
0.6250 mM	77	79	1.03 <sup>+</sup>	38	0.49 <sup>+</sup>	8	0.10 <sup>+</sup>	125	1.62 <sup>+</sup>
1.2000 mM	69	91	1.32 <sup>+</sup>	42	0.61 <sup>+</sup>	12	0.17 <sup>+</sup>	145	2.10 <sup>+</sup>

+ = positivo; - = negativo; d<sup>+</sup> = débil positivo; i = indeterminado; m = factor de multiplicación.  
Niveles de probabilidad:  $\alpha = \beta = 0.05$ .  
Prueba estadística de una cola.

Ch (CHICAS), Gr (GRANDES), Ge (GEMELAS).

TABLA VIII. FRECUENCIA DE MANCHAS/ALA INDUCIDA POR MMC+VIT.E  
(AGUDO-CRONICO) EN CELULAS DEL ALA DE  
*Drosophila melanogaster*

COMPUESTO [ ]	NUMERO DE ALAS	TIPO DE MANCHA						TOTAL	
		Ch m=2		Gr m=5		Ge m=5		MANCHA/ALA m=2	
		No.	Fr.	No.	Fr.	No.	Fr.	No.	Fr.
TESTIGO NEGATIVO ETANOL/TWEEN (3:1)	80	14	0.17	1	0.01	0	0.00	15	0.19
VIT.E 100 ppm	80	13	0.16	2	0.03	0	0.00	15	0.19
TESTIGO POSITIVO MMC 0.6250 mM	77	79	1.03 <sup>+</sup>	38	0.49 <sup>d</sup>	8	0.30 <sup>i</sup>	125	1.62 <sup>+</sup>
MEZCLA AG-CRON MMC/VIT.E 0.6250 mM/100 ppm	78	35	0.45 <sup>-</sup>	18	0.23 <sup>-</sup>	3	0.04 <sup>-</sup>	56	0.72 <sup>-</sup>

+ = positivo; - = negativo; d<sup>\*</sup> = débil positivo; i = indeterminado; m = factor de multiplicación.

Niveles de probabilidad:  $\alpha = \beta = 0.05$ .

Prueba estadística de una cola.

Ch(CHICAS), Gr(GRANDES), Ge(GEMELAS).

TABLA IX. FRECUENCIA DE MANCHAS/ALA INDUCIDA POR MMC+ $\beta$ -CAROTENO (AGUDO-CRONICO) EN CELULAS DEL ALA DE *Drosophila melanogaster*

COMPUESTO [ ]	NUMERO DE ALAS	TIPO DE MANCHA						TOTAL	
		Ch m=2		Gr m=5		Ge m=5		MANCHA/ALA m=2	
		No.	Fr.	No.	Fr.	No.	Fr.	No.	Fr.
TESTIGO NEGATIVO ETANOL 5%	80	14	0.17	1	0.01	0	0.00	15	0.19
$\beta$ -CAROTENO 100 ppm	80	15	0.19	4	0.05	0	0.00	19	0.24
TESTIGO POSITIVO MMC 0.6250 mM	77	79	1.03 <sup>+</sup>	38	0.49 <sup>+</sup>	8	0.10 <sup>+</sup>	125	1.62 <sup>+</sup>
MEZCLA AG-CRON MMC/ $\beta$ -C 0.625mM/100ppm	78	29	0.37 <sup>-</sup>	5	0.06 <sup>-</sup>	1	0.01 <sup>-</sup>	35	0.45 <sup>-</sup>

+ = positivo; - = negativo; d<sup>+</sup> = débil positivo; i = indeterminado; m = factor de multiplicación.

Niveles de probabilidad:  $\alpha = \beta = 0.05$ .

Prueba estadística de una cola.

Ch (CHICAS), Gr (GRANDES), Ge (GEMELAS).



TABLA X. RESUMEN

COMPUESTO [   ]	TRATAMIENTO	TIPO DE MANCHA						TOTAL MANCHA/ALA	
		Ch m=2		Gr m=5		Ge m=5		m=2	
		No.	Fr.	No.	Fr.	No.	Fr.	No.	Fr.
MMC 0.6250 mM	CRONICO	199	1.24 <sup>+</sup>	273	1.71 <sup>+</sup>	95	0.59 <sup>+</sup>	567	3.54 <sup>+</sup>
MMC 0.6250 mM	AGUDO	79	1.03 <sup>+</sup>	38	0.49 <sup>+</sup>	8	0.10 <sup>+</sup>	125	1.62 <sup>+</sup>
MMC+VIT. E 0.6250 mM/ 100 ppm	MEZCLA CRONICA	60	0.75 <sup>-</sup>	35	0.44 <sup>-</sup>	6	0.08 <sup>-</sup>	101	1.26 <sup>-</sup>
MMC+VIT. E 0.6250 mM/ 100 ppm	AGUDO CRONICO	35	0.45 <sup>-</sup>	18	0.23 <sup>-</sup>	3	0.04 <sup>-</sup>	56	0.72 <sup>-</sup>
MMC +β-CAROTENO 0.6250 mM/ 100 ppm	MEZCLA CRONICA	60	0.76 <sup>-</sup>	18	0.23 <sup>-</sup>	3	0.04 <sup>-</sup>	81	1.03 <sup>-</sup>
MMC +β-CAROTENO 0.6250 mM/100 ppm	AGUDO CRONICO	29	0.37 <sup>-</sup>	5	0.06 <sup>-</sup>	1	0.01 <sup>-</sup>	35	0.45 <sup>-</sup>

Ch(Chicas), Gr(Grandes), Ge(Gemelas).