

20
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

EFFECTO DE LA CAPACIDAD DE INDUCCION DE LA
ACTIVIDAD METABOLICA DEL ETANOL Y DEL
CICLOHEXANOL FRENTE AL DAÑO PRODUCIDO
POR LA N,N-DIMETILNITROSAMINA EN
Drosophila melanogaster.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
SUSANA MURILLO ROMERO

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LA UNAM, S. R. DE CV
DE INVEST. Y DESARROLLO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. JUDITH ISABEL GUZMAN RINCON
ASESOR INTERNO: DR. MARIO A. ALTAMIRANO LOZANO

MEXICO, D. F.

1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

DIRECCION

C. JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACION
ESCOLAR.
P R E S E N T E .

Comunico a usted que el alumno MURILLO ROMERO SUSANA
con número de cuenta B515B54-2 de la carrera Biologo
se le ha fijado el día 9 del mes de Septiembre de 1997 a las 12:00 hrs.
Hrs., para presentar examen profesional, que tendrá lugar en esta Facultad, -
con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE M. en C. RAUL ZAVALA CHAVERO
- VOCAL DRA. JUDITH GUZMAN RINCON
- SECRETARIO DR. MARIO ALTAMIRANO LOZANO
- SUPLENTE BIOL. CARLOS MARTINEZ MONTOYA
- SUPLENTE M. en BSH. ELIA ROLDAN REYES

[Handwritten signatures and initials over a lined background]

El título de la tesis que se presenta es: EFECTO DE LA CAPACIDAD DE
INDUCCION DE LA ACTIVIDAD METABOLICA DEL ETANOL Y DEL CICLOHEXANOL
FRENTE AL DAÑO PRODUCIDO POR LA N,N-DIMETILNITROSAMINA EN Drosophila
melanogaster.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
México, D.F., a 15 de Abril de 1997.

B
AZC.

[Handwritten signature]
DR DENNY WEISS STEIDER
DIRECTOR

R E C I B I

OFICINA DE EXAMENES
PROFESIONALES Y GRADO.

CON MUCHO CARIÑO DEDICO ESTA TESIS A MI MAMA :

MA. MAGDALENA ROMERO BASURTO

POR SU INVALUABLE AMOR, APOYO Y CONFIANZA

GRACIAS A DIOS POR PERMITIRME SER TU HIJA.

A MI ABUELITA CARLOTIN :

POR LA DICHA DE TENERLA JUNTO A MI.

A TI ALBERTO :

POR TU CARIÑO Y COMPARTIR GRANDES MOMENTOS JUNTOS.

**SINCERAMENTE Y CON MUCHO CARIÑO AGRADEZCO A LA DRA. JUDITH
L. GUZMAN RINCON POR SU AMISTAD, APOYO Y CONFIANZA.**

MUCHAS GRACIAS POR SER MI MAESTRA.

AGRADEZCO ESPECIALMENTE A :

DR. MARIO A. ALTAMIRANO LOZANO.

M. en C. RAUL ZAVALA CHAVERO.

M. en I.B.S.H. ELIA ROLDAN REYES.

BIOL. CARLOS MARTINEZ MONTOYA.

**POR SUS COMENTARIOS Y SUGERENCIAS QUE ENRIQUECIERON ESTE
MANUSCRITO.**

MUCHAS GRACIAS A :

DR. ULRICH GRAF

DR. J. JAVIER ESPINOSA

**POR SUS COMENTARIOS Y SUGERENCIAS
EN LA PARTE EXPERIMENTAL.**

AGRADEZCO AL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES.

MUCHAS GRACIAS A TODOS Y CADA UNO DE MIS COMPAÑEROS DEL LABORATORIO DE *Drosophila* Y AL DEPTO. DE GENETICA EL APOYO RECIBIDO DURANTE LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

CON ESPECIAL AGRADECIMIENTO A :

DORIS

POR SU AYUDA TECNICA DURANTE TODA LA TESIS.

A :

YOLANDA LINARES R.

PATRICIA RAMIREZ V.

ADRIANA HERNANDEZ G.

ARACELI CARBAJAL P.

POR SU AMISTAD Y CARIÑO.

**AGRADEZCO AL CENTRO DE INFORMACION Y DOCUMENTACION
NUCLEAR LAS FACILIDADES OTORGADAS EN EL REQUERIMIENTO DEL
MATERIAL BIBLIOGRAFICO PARA EL DESARROLLO DE ESTA TESIS.**

ESPECIALMENTE A :

SR. PABLO ROSALES G.

POR SU GRAN APOYO Y AMISTAD.

INDICE

RESUMEN	2
1. INTRODUCCION	3
1.1 Citocromo P-450	5
1.2 Reacciones catalizadas por el cit P-450	5
1.3 Funciones metabólicas del cit P-450	6
1.4 Inducción e Inhibición del cit P-450	7
1.5 Nitrosaminas	9
1.6 Activación de la Dimetilnitrosamina	10
1.7 Etanol	13
1.8 Ciclohexanol	15
1.9 <i>Drosophila melanogaster</i> como Sistema de Prueba y el Ensayo de Mutación y Recombinación Somática (SMART)	16
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIALES Y METODOS	23
4. RESULTADOS	33
5. DISCUSION	38
6. CONCLUSIONES	44
7. TABLAS	45
8. REFERENCIAS	52

RESUMEN

Se evaluó la capacidad de inducción del etanol y del ciclohexanol como posibles activadores metabólicos del citocromo P-450 mediante la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en las alas de *Drosophila melanogaster* empleando dos marcadores recesivos, mwh (pelos múltiples en el ala) y flr¹ (pelos en forma de flama), utilizando la crucea estándar. Larvas de 48 hrs de edad fueron sometidas a un pretratamiento crónico vía oral con etanol 1.8, 3.2 y 7.5 % o ciclohexanol 0.15, 0.31 y 0.625 %, utilizando como testigo positivo fenobarbital 12 mM. 24 hrs después se les suministró un tratamiento con dimetilnitrosamina (DMN) en concentraciones 0, 0.078, 0.15 y 0.31 mM o ciclofosfamida 1 mM como testigo positivo, incubándose hasta el estado adulto. El análisis estadístico se hizo a través del programa de Frei y Wurgler con P < 0.05 mediante la prueba de N². Los tipos de manchas que se analizaron fueron simples (mwh o flr) pequeñas (1 o 2 células), grandes (más de 2 células) y dobles (mwh y flr). Los resultados mostraron que tanto el etanol como el ciclohexanol no incrementaron por sí mismos la frecuencia basal de manchas a las dosis utilizadas. En general el pretratamiento con ciclohexanol no incrementó la frecuencia de daño genético en los adultos tratados con DMN, en cambio, el etanol mostró un incremento en la frecuencia de manchas totales a las concentraciones de 3.2 y 7.5 % cuando se aplicó en tratamiento con DMN 0.15 mM. El tratamiento con DMN a la concentración de 0.31 mM fue altamente tóxico.

1. INTRODUCCION

Los seres vivos están expuestos constantemente a una serie de compuestos que pueden interactuar con su información genética. Estos compuestos llamados mutágenos pueden inducir diferentes tipos de alteraciones: mutaciones puntuales (mutaciones génicas y pequeñas deleciones), aberraciones cromosómicas (translocaciones e inversiones), aneuploidias (ganancia o pérdida de cromosomas) e intercambio de cromátidas hermanas. Los agentes genotóxicos se dividen en dos grandes grupos (Würgler, 1991), los mutágenos de acción directa que se caracterizan por interactuar con el ADN en la misma forma química en la que ingresaron al organismo y los mutágenos de acción indirecta o promutágenos, que necesitan ser metabolizados y son sus metabolitos, los causantes de las mutaciones (Hallstrom et al., 1982). El grupo de enzimas conocidas como citocromo P-450 está involucrado en el metabolismo oxidativo de moléculas tanto endógenas como exógenas y juegan un papel importante en la activación de mutágenos y carcinógenos de tipo indirecto (Hodgson y Randy, 1991).

La Genética Toxicológica estudia los fenómenos de interacción entre los agentes tóxicos y los cambios genéticos que producen y que son considerados de gran importancia debido a que pueden ocurrir tanto en células somáticas como germinales, dando lugar a la aparición de diferentes manifestaciones como cánceres o enfermedades hereditarias (Guzmán et al., 1990, Guzmán et al., 1994). La conversión génica y en particular la recombinación mitótica son importantes mecanismos de daño como la pérdida de la heterocigocidad, que constituye un proceso relevante en la carcinogénesis. Por esta razón cuando se evalúan eventos de genotoxicidad, es importante considerar un amplio espectro de ensayos, capaces de detectar simultáneamente eventos de mutación y otros cambios, como la recombinación mitótica (Graf et al., 1984).

En las pruebas para evaluar genotoxicidad de promutágenos mediante ensayos bacterianos, se utiliza la fracción microsomal S9 del hígado de ratas, como un sistema metabólico exógeno para activar a los agentes químicos de tipo indirecto. Para incrementar la actividad de las enzimas requeridas para la transformación de muchos carcinógenos genotóxicos, los animales de los cuales

se extrae la fracción S9 son tratados con un agente inductor de dichas enzimas (Ames et al., 1975).

El agente de inducción enzimática utilizado con más frecuencia es una mezcla de policloruros de bifenilo conocido como Aroclor 1254, que activa la fracción del citocromo P-450 que como ya se dijo, se asocia con el metabolismo de muchos carcinógenos genotóxicos (Ames et al., 1975). Sin embargo se han utilizado otros inductores como la combinación de fenobarbital con B-naftoflavona y acetona para incrementar los efectos mutagénicos de algunos compuestos (Haag y Sipes, 1980).

Además, estudios recientes sugieren que algunos alcoholes como el ciclohexanol y el etanol incrementan la actividad de algunos mutágenos indirectos como el 4-(N-metil-N-nitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) Y la N,N-dimetilnitrosamina (NDMA) en organismos pretratados oralmente con este tipo de compuestos (Espinosa-Aguirre et al., 1993).

1.1 CITOCROMO P-450

En 1958 fué descubierto un pigmento microsómico (P) asociado al bioxido de carbono cuyo espectro de acción fotoquímico demostró ser una oxidasa terminal del sistema enzimático hepático responsable del metabolismo oxidante de medicamentos. Por su único pico de absorbancia a 450 nm se le llamó citocromo P-450 (cit P-450), el cual fue aislado, caracterizado e identificado como una hemoproteína con un átomo de hierro unido al azufre de un residuo de cisteína (Nebert y Gonzalez, 1987)

El cit P-450 de procariontes se encuentra en el citoplasma y en todos los eucariontes desde microorganismos, hongos, invertebrados, peces, anfibios, aves, reptiles, mamíferos y plantas, son proteínas unidas a membrana. En los peces, anfibios, reptiles y aves han sido detectadas algunas formas de cit P-450 en retículo endoplasmático (RE) y en mitocondria de glándulas endocrinas (Nebert et al., 1984)

1.2 Reacciones catalizadas por el cit P-450

El cit P-450 constituye un amplio grupo de isoenzimas que metabolizan gran variedad de compuestos lipofílicos endógenos o exógenos, representa una monooxigenasa externa y cataliza la siguiente reacción:



donde S, es el sustrato y representa un esteroide, ácido graso o cualquier compuesto químico que tenga un grupo alcano, alqueno, anillo aromático o heterocíclico, el cual puede servir como sitio de reacción para que se produzca la oxigenación. La reacción es conocida como una monooxigenación, en la cual solamente uno de los dos átomos del oxígeno molecular es incorporado al sustrato y el otro pasa a formar agua.

En general el metabolismo de los xenobióticos en mamíferos involucra dos tipos de reacciones enzimáticas: las reacciones de Fase I y de Fase II, en las primeras los grupos polares son

hidrolíticos haciendo a estos, sustratos disponibles para las reacciones de Fase II El primer paso del metabolismo de los compuestos lipofílicos es la oxidación catalizada por el sistema monooxigenasa dependientes del citocromo P-450, localizado en el retículo endoplasmico del hígado y de otros tejidos Generalmente en esta oxidación se produce la incorporación de un grupo hidroxilo en el compuesto Los productos metabólicos de esta fase, sufren conjugación con varios sustratos endógenos tales como glutatión, sulfatos, ácido glucoronico, aminoácidos y otros Las reacciones de conjugación son denominadas de fase II, de las cuales resultan productos solubles en agua que son fácilmente excretados por el cuerpo via urinaria o en las heces, estos conjugados pueden ser hidrolizados, liberados y reabsorbidos en el tracto intestinal Fig 1 (Parke et al . 1991)

Las reacciones de fase I guían a la formación de metabolitos reactivos que pueden unirse covalentemente a las macromoléculas de los tejidos, tales como el ADN, los aminoácidos, las proteínas, etc ocasionando daño subcelular, carcinogénesis, mutagenesis o efecto teratogénico (Nebert, 1991), pero no significa que el daño subcelular o el cancer siempre ocurra, ya que existen múltiples factores que determinan que el metabolito pueda ser tóxico o no, por ejemplo, el mecanismo de desintoxicación enzimática llevado a cabo por el organismo, el estatus del sistema inmune, el estado nutricional, la predisposición genética y los factores ambientales (Guengerich, 1988).

1.3 Funciones metabólicas del cit P-450

Los citocromos P-450 en las fracciones microsómicas hepáticas tienen como papel fundamental llevar a cabo la desintoxicación o la modificación de toxicidad (incrementandola, disminuyendola, anulandola o formando especies de oxigenos altamente reactivos para el ADN) (Parke et al . 1991)

En todos los eucariontes, la enzima citocromo P-450 es muy importante para el metabolismo de compuestos endógenos y exógenos En los insectos como *Drosophila* las monooxigenasas participan en el metabolismo de hormonas, en los procesos de desintoxicación e incluso en eventos como la resistencia a plaguicidas e insecticidas sintéticos (Gandhi et al . 1992) En los vertebrados participa principalmente en la biosíntesis de hormonas esteroideas y en los procesos de

desintoxicación de xenobióticos, en el ser humano es esencial ya que los diferentes cit P-450 son responsables de la producción esencial de esteroides, de la regulación de los niveles de los agentes terapéuticos en la sangre, de la eliminación de productos químicos no deseados, los cuales pueden acumularse por sus propiedades lipofílicas y en la generación de metabolitos tóxicos que pueden causar daño al material genético o producir cáncer o tumores (Porter y Coon, 1991)

1.4 Inducción e Inhibición del cit P-450

En 1960 se descubrió que los cit P-450 vegetales y animales son inducidos por sustancias exógenas y endógenas. Los mecanismos pueden ser a nivel transcripcional o postranscripcional, lo cual ha hecho difícil predecir el mecanismo de inducción. Por ejemplo el etanol, la acetona y el fenobarbital inducen a genes de diferentes subfamilias cit P-450, en un caso puede ser a nivel transcripcional y en otro postranscripcional, el 3-metilcolantreno induce el cit P-448 y el bifenilpoliclorinatado y el aroclor 1254 inducen ambos tipos de citocromos (Gandhi et al., 1992; Guttenplan et al., 1976). La expresión de los genes en los mamíferos presenta control a nivel transcripcional en respuesta a los xenobióticos, condiciones ambientales o situaciones específicas del tejido (Nebert y González, 1987).

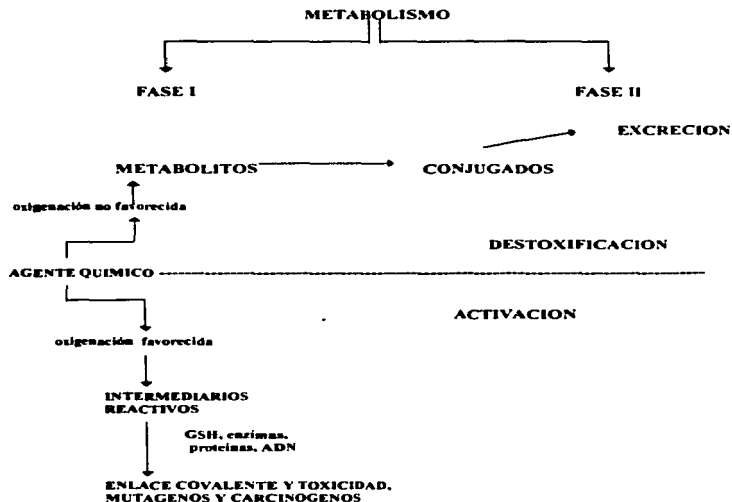


Fig. 1. Rutas utilizadas en el metabolismo de agentes químicos, mostrando las Fases I y II.

(Tomado de Parke, *et al.*, 1991)

1.5 NITROSAMINAS

Las nitrosaminas comprenden un amplio grupo de agentes químicos y muchas de ellas son conocidas por su potente actividad genotóxica. Han sido detectadas en productos industriales, alimentos, bebidas alcohólicas, productos cosméticos, humo de cigarro y contaminantes atmosféricos (Negishi et al., 1991; Tricker y Preussmann, 1991).

Algunos compuestos representativos de esta clase han inducido cáncer en las 40 especies animales analizadas, incluyendo grandes primates. Gran cantidad de experimentos y algunos datos epidemiológicos han sugerido que el ser humano es susceptible a la carcinogénesis causada por compuestos N-nitrosos, por lo cual la presencia de estos en algunos alimentos puede considerarse como un factor de riesgo etiológico para ciertos tipos de cáncer, como los de esófago, estómago y nasofaringe (Tricker y Preussmann, 1991; Jiao et al., 1993).

Las nitrosaminas y nitrosamidas pueden formarse a partir de la ingestión de nitratos con las condiciones ácidas del estómago. Además los nitratos juegan un papel importante al ser reducidos a nitritos en la cavidad oral del ser humano. De acuerdo a Stephany y Schuller (1980), aproximadamente el 6% de los nitratos ingeridos se reducen endógenamente a nitritos (Shephard et al., 1987; Goldstein et al., 1974).

La nitrosación de las aminas en los alimentos es un proceso complejo. Durante el procesamiento, preservación y preparación de los alimentos, se forman óxidos de nitrógeno (en estado de oxidación +3 y +4) que pueden reaccionar con los compuestos amino y otros nucleófilos para producir compuestos N-nitrosos (NOC) y S-nitrosos (SOC). Las dos fuentes principales de óxidos de nitrógeno (agentes nitrosantes) resultan de la adición de nitratos y/o nitritos a los alimentos y del calentamiento y/o desecación de los alimentos por medio de la combustión de gases donde el nitrógeno molecular pasa a óxido de nitrógeno (Shephard et al., 1987; Tricker y Preussmann, 1991).

1.6 ACTIVACION DE LA DIMETILNITROSAMINA

La N-nitroso-dimetilamina (DMN ó NDMA) es ampliamente usada en estudios de mutagénesis, es un agente alquilante, promutágeno y un carcinogeno potente. Induce tumores en diferentes partes del organismo dependiendo de la ruta de administración (Jiao et al., 1993; Krishna et al., 1990). Concentraciones de 25 ppm y 50 ppm de DMN en la dieta de conejos ocasionan carcinomas hepatocelulares, en ratas sometidas a inhalaciones repetidas se generan tumores en las cavidades nasales y en el riñón, la administración por vía oral a diferentes líneas de ratones provoca sarcomas, carcinomas y adenomas en pulmón (Jiao et al., 1993). Los tratamientos aplicados a *Drosophila melanogaster* inducen letales recesivos ligados al sexo y pérdida cromosómica (Vogel y Natarajan, 1979 a y b).

Con la demostración de la actividad carcinogénica de la dimetilnitrosamina se ha podido establecer que los compuestos N-nitrosos y otros agentes alquilantes pertenecen a un grupo importante de compuestos carcinogénicos (Laval et al., 1990). La DMN se ha detectado en pequeñas cantidades en condensados de humo de cigarro (Jiao et al., 1993), en carnes ahumadas como el tocino y el pescado (Richardson, 1993), también se utiliza en la preparación de solventes y en la síntesis del combustible 1,1-dimetilhidrazina. Es usado como solvente en la industria del plástico y la fibra, como aditivo para lubricantes, en condensadores para incrementar la constante dieléctrica y como nematocida (Index Merk, 1989).

La DMN es un líquido amarillo de baja viscosidad, miscible en agua, soluble en la mayoría de los solventes orgánicos y en lípidos, es muy volátil, está formado por 32% de C, 8.16% de H y 21.60% de O, su peso molecular es 74.08 g y su densidad de 1.0048 (Index Merk, 1989).

FORMULA

$(CH_3)_2NNO$

Las nitrosaminas se convierten por reacciones de hidroxilación en agentes alquilantes (Goldstein et al., 1974). Estos agentes químicos transfieren grupos alquilo hacia macromoléculas biológicamente importantes (ADN, ARN, proteínas). Su forma de acción depende de dos propiedades importantes: el tipo de alquilo transferido y el número de grupos alquilo que la molécula puede donar. La DMN es un agente alquilante monofuncional, es decir con un grupo reactivo (Vogel, 1991), que puede metilar al ADN (Ong y Malling, 1975). Se forma por la interacción del nitrito con dimetilamina y por la acción de bacterias reductoras de nitrato. Su activación ocurre inicialmente por la hidroxilación en el carbono alfa para transformarse en hidroximetil-metil-nitrosamina inestable, por lo que el rompimiento se produce espontáneamente (Ong y Malling, 1975), dando lugar al mutágeno N-metil-diazohidróxido. La Figura 2 muestra la biotransformación de la N-nitroso-dimetilamina.

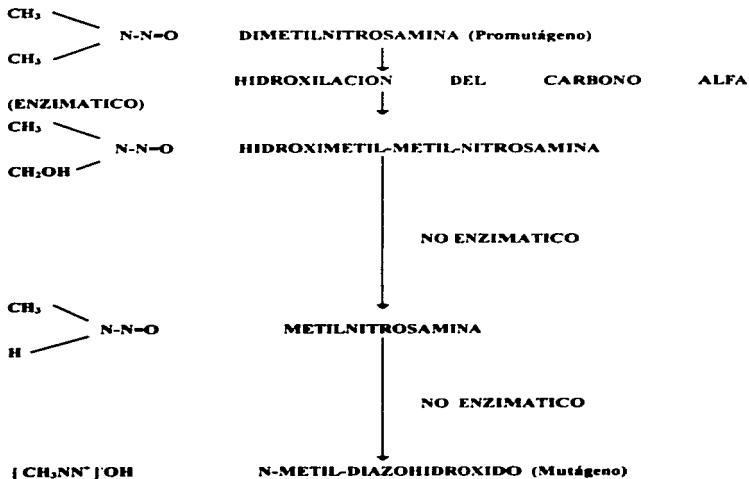


Figura 2. Activación Metabólica de la Dimetilnitrosamina (Vogel, 1987)

1.7 ETANOL

El etanol se consume en forma de bebidas alcoholicas, las cuales además de agua contienen una gran variedad de compuestos responsables del aroma y el sabor. Entre los componentes aromáticos de las bebidas alcoholicas se citan aproximadamente 1300, entre ellos diferentes tipos de alcoholes, aldehidos como el acetaldehido, aminas tales como N-nitrosodimetilamina (NDMA) y la N-nitrosodietilamina (NDEA), compuestos fenolicos como los taninos, hidrocarburos como benceno, tolueno, estireno y benzo[a]pireno , ésteres, así como un gran número de compuestos orgánicos e inorgánicos (Obe y Ristow, 1979 , Obe y Anderson, 1987)

La ingestion de etanol forma parte de la vida social del hombre en casi todo el mundo, estudios epidemiologicos han demostrado que el exceso en su consumo ocasiona daños severos. Es mutagénico, carcinogenico y teratogénico e incrementa el riesgo de cancer en la cavidad bucal, faringe, laringe, esofago e higado (Obe y Ristow, 1979 , Ristow et al., 1995) Induce el incremento de la frecuencia de aneuploidias, aumento de aberraciones cromosómicas, intercambios entre cromatidas hermanas de linfocitos humanos e intercambios entre eslabones en la cadena de ADN (Hayes, 1985 , Ristow et al. , 1995). se ha comprobado que la cantidad de daño puede ser mayor en pacientes alcohólicos y fumadores , se sugiere que el etanol puede ser mutagénico cuando el metabolismo de los alcohólicos es anormal y no tienen la posibilidad de detoxificar otros agentes xenobioticos (Obe y Anderson, 1987)

Experimentos previos han demostrado que el etanol traspasa la placenta y se distribuye en el feto, la eliminación en fetos de rata es bajo en comparación con la madre (Obe y Ristow, 1979) La actividad teratogénica del etanol ha sido experimentalmente inducida en pollos, ratones y ratas, comparando las anomalias de estos organismos con las de los niños que presentan el síndrome fetal por alcohol, caracterizado por una variedad de defectos tales como retraso en el desarrollo físico y mental (88%), hiperactividad (70%), anomalias típicas de la cara, tales como deformaciones labiales y nasales (53-74%) (Obe y Ristow, 1979 , Ranganathan et al. , 1987 a y b).

Por otra parte, el acetaldehido, primer metabolito del etanol induce daños severos en la cadena de ADN (Ristow et al. , 1995) En los mamíferos el acetaldehido se produce a partir del etanol por

acción de la enzima alcohol deshidrogenasa, que no solo se encuentra en el hígado, sino en muchos otros órganos como estómago, intestinos, útero, riñones, corazón y cerebro (Hayes, 1985; Halliwell y Gutteridge, 1989) Kissin y Kaley (1974) han discutido algunos factores mediante los cuales el alcohol incrementa los procesos carcinogénicos.

- 1) El cambio de la susceptibilidad de los tejidos a través de los efectos tóxicos que provoca el etanol, aunado a una mala nutrición ocasionando enfermedades como la cirrosis hepática. Con frecuencia los alcohólicos muestran estas deficiencias alterando su metabolismo
- 2) Las sustancias carcinogénicas disueltas en bebidas alcohólicas, tanto de tipo orgánico como inorgánico
- 3) El incremento de la difusión de sustancias carcinogénicas dentro de las células por ejemplo, modifica la permeabilidad de la mucosa del esófago para los iones H^+
- 4) La inhibición de la salivación, que puede ocasionar una alta concentración de carcinógenos en la cavidad bucal cuando se consume junto con humo de cigarro (Obe y Ristow, 1979)

Con respecto a *Drosophila melanogaster*, se sabe que estos organismos presentan la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) y que es abundante, lo que ha permitido trabajar con variabilidad genética y regulación así como a nivel bioquímico. Heinstra et al (1983) reportaron que la ADH en estos eucariontes desempeña una doble función 1) el etanol se oxida a acetaldehído y 2) este metabolito altamente tóxico se oxida a acetato (Ranganathan et al, 1987a)

Otros experimentos realizados con *Drosophila* sobre la actividad de la ADH durante sus diferentes estados de desarrollo, han mostrado que la actividad de la enzima es baja en el primer estadio larvario, mientras que incrementa considerablemente en el segundo y tercer estadio larvario, disminuyendo significativamente durante la pupación y aumentando su actividad nuevamente en las moscas adultas (Ranganathan et al, 1987b), además la frecuencia observada de malformaciones se incrementa con exposiciones prolongadas de ADH

1.8 CICLOHEXANOL

El ciclohexanol es un solvente usado en el procesamiento de cuero, en la producción de lacas, pinturas, barnices, pulidores, agentes degradantes, plásticos, jabones, detergentes, textiles, tintes e insecticidas y como intermediario en la preparación de otros agentes químicos (Richardson, 1993). Este alcohol cíclico también surge como producto del metabolismo de los mamíferos de una manera semejante a la forma en que se obtiene con los solventes industriales tales como la ciclohexanona y ciclohexano (Espinosa-Aguirre et al., 1997)

Estudios realizados con ratones, utilizando diferentes dosis de ciclohexanol en sus alimentos, provocaron una considerable disminución en el crecimiento tanto de hembras como de machos en la primera generación, mientras que en la segunda generación los ratones fueron normales. Se ha comprobado que la inhalación en altas concentraciones de vapores de ciclohexanol producen intoxicación, lagrimeo, narcosis y convulsiones en conejos, acompañados por daño en el cerebro, corazón, hígado y riñones. En el hombre el ciclohexanol produce efectos narcóticos, dolor de cabeza y ojos e irritación de nariz y garganta (Richardson, 1993)

La exposición de ratas a ciclohexanona induce un incremento en el contenido de citocromo P-450 en el hígado (Parmar y Burka, 1991; Espinosa-Aguirre et al., 1997)

Sin embargo, experimentos realizados con *Salmonella typhimurium* TA100 han demostrado que el ciclohexanol inhibe la mutagenicidad ejercida por la N-nitrosodietilamina (NDEA) y por NNK. Se ha sugerido que el mecanismo antimutagénico del ciclohexanol se relaciona con la inhibición del metabolismo de las nitrosaminas (Espinosa-Aguirre, et al., 1996)

1.9 DROSOPHILA COMO SISTEMA DE PRUEBA

Drosophila melanogaster es un organismo eucarionte con un ciclo de vida corto, fácil de manejar en el laboratorio, su mantenimiento a nivel de laboratorio es económico, se cuenta en la actualidad con una gran variedad de cepas portadoras de mutantes adecuados para el diseño de diferentes experimentos y poseen la capacidad de activar enzimáticamente promutágenos y procarcinógenos *in vivo* (Graf y Singer, 1992 . Guzmán et al ., 1990 . Guzmán y Graf, 1995 . Vogel, 1987) por todo lo anterior, constituye un sistema biológico adecuado para el estudio y detección de mutágenos de manera rutinaria. Mediante el uso de diferentes ensayos puede analizarse un amplio espectro de alteraciones genéticas inducidas por agentes ambientales, tanto en células somáticas como en células germinales (Rodríguez-Arnaiz y Ramos, 1992)

El ciclo de vida de la mosca de la fruta presenta un periodo de embriogénesis dentro del huevo y una sucesión de estadios larvarios que culminan con la metamorfosis completa (holometábola), de la que finalmente surge un imago o adulto. La duración del ciclo de vida completo es de 9.5 a 10 días en condiciones controladas de temperatura y humedad relativa, 25°C y 60 % respectivamente. La secuencia y duración de los diferentes estadios en el ciclo de vida son: huevo, 24 hrs., larva de primer estadio, 24 hrs., de segundo, 24 hrs., y de tercero, 24 hrs., pupa 120 hrs., Fig. 3. En su hábitat natural la duración del ciclo es más variable como resultado de los cambios ambientales. Después de 24 hrs. de desarrollo embrionario, eclosiona del huevo una pequeña larva, su cuerpo se encuentra formado por doce segmentos no aparentes: 1 segmento de la cabeza, 3 torácicos y 8 abdominales. La pared de su cuerpo está formada por una cutícula externa y una epidermis celular interna, la cutícula está formada por dos capas: la exocutícula y la endocutícula (Ramos y colaboradores, 1993).

La larva presenta células larváticas que forman el cuerpo de la larva, se caracterizan porque han perdido la capacidad de división y sólo aumentan su volumen; en algunas se presentan cromosomas politénicos, son poliploides, están determinadas y diferenciadas genéticamente. Las células imágales no están involucradas en la formación del cuerpo de la larva, son de tamaño pequeño, constitución cromosómica diploide, conservan la capacidad de división celular, están determinadas genéticamente pero se diferencian hasta que la larva sufre la metamorfosis, estas

células se localizan en estructuras denominadas discos imagales, los cuales aumentan de tamaño por divisiones mitóticas que ocurren en determinados tiempos durante el desarrollo larvario Fig 4 (Demerec y Kaufmann, 1975)

Durante la metamorfosis, la hormona ecdisona desencadena una serie de cambios en el organismo, este proceso involucra la destrucción de ciertos tejidos y órganos de la larva, y la organización de las estructuras del adulto, a partir de un complejo de células primitivas, los discos imagales, de los cuales se forman todos los órganos del adulto. Los tubulos de malpighi se alteran poco durante la metamorfosis, aunque sí sufren algunos cambios en su composición estructural, el torax se forma por la combinación de varios discos imagales. Las extremidades, ojos, antenas, alas y el aparato genital se diferencian a partir de su disco imagal respectivo que sufre una histogénesis durante el desarrollo pupal, dando origen a las distintas partes del cuerpo del adulto (Ramos y col., 1993)

Los análisis bioquímicos realizados tanto en larvas como en organismos adultos de *Drosophila melanogaster*, han revelado que tienen capacidad de activación-desintoxicación de compuestos exógenos como drogas, carcinógenos, solventes y pesticidas, así como de sustancias endógenas (Hallström y Blanck, 1985), gracias a la presencia de enzimas dependientes del citocromo P-450, similares a la fracción S9 del hígado de mamíferos (Baars et al., 1980)

El sistema citocromo P-450 de estos organismos se encuentra distribuido principalmente en el intestino medio, en los cuerpos grasos y en los tubulos de malpighi. A nivel subcelular, las monooxigenasas se encuentran localizadas en retículo endoplasmico liso y en las mitocondrias (Hodgson y Randy, 1991)

En años recientes se han desarrollado nuevos ensayos como la prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART), se basa en la expresión de mutaciones recesivas en células somáticas, para ello se requiere de organismos heterocigóticos para detectar la pérdida del alelo dominante en algún momento del desarrollo y así obtener la mutación recesiva, presentándose fenotípicamente como una mancha sobre la cutícula del ala en el adulto (Graf et al., 1984)

Una de las ventajas más importantes de esta prueba es que solamente se necesita de una generación de *Drosophila melanogaster* para la obtención de resultados, también permite reconocer si los compuestos químicos actúan en el momento del tratamiento o si lo hacen posterior a él, ya que el tamaño de las manchas observadas en la cutícula de las alas depende del tiempo en el que se induce el clon, o sea que, si ocurre tempranamente la mancha es de mayor tamaño que cuando sucede a la mitad o al final del desarrollo larvario. La formación de las manchas en las células de las alas puede deberse a mutación, delección o recombinación mitótica (Graf et al., 1984; Vogel y Zijlstra, 1987).

Las células de las larvas de *D. melanogaster*, se diferencian en dos direcciones, un grupo da lugar a las estructuras de la larva propiamente, y el otro se separa en forma de paquetes discretos (discos imagales) que durante la metamorfosis darán lugar a las estructuras de la mosca adulta. Cualquier alteración genética ocurrida en alguna de las células de los discos imagales durante la proliferación mitótica, estará presente en todas las células descendientes y formarán un clon de células mutantes, este fenómeno es llamado expansión clonal. Si la alteración genética produce un cambio visible en el fenotipo, el clon de células mutantes puede ser detectado en el cuerpo del adulto (Guzmán et al., 1990; Guzmán y Graf, 1995). Estas propiedades han permitido trabajar en dos direcciones, la prueba del ala y la prueba del ojo.

Para la prueba del ala, se han utilizado principalmente dos marcadores: *flr* y *mwh*.

flr: "flare" pelos en forma de flama. Se ubica a 38.8 unidades de mapa sobre el cromosoma 3 y en condición homociga es letal, por lo que es necesaria la presencia de un cromosoma balaceador con inversiones múltiples (TM3), que además porta el marcador dominante "serrata" (Ser), el cual permite el reconocimiento fenotípico de la línea *flr3/TM3.Ser* (Lindsley y Zimm, 1992; Frolich y Wurgler, 1989).

mwh: "multiple wing hair" pelos múltiples en el ala. Este locus se localiza en el cromosoma 3 a 0.3 unidades de mapa. Se reconoce fenotípicamente porque expresa una alteración en el número de tricomas por célula en el ala, llegando a presentar de 2 hasta 5 en lugar de 1, como sería en el fenotipo silvestre (Sierra et al., 1991).

Hasta el momento, con la prueba de SMART se han evaluado más de 300 compuestos en el ojo y el ala de *Drosophila melanogaster*. La prueba ha mostrado gran sensibilidad para la detección de agentes genotóxicos, tanto químicos como físicos (Guzmán y Graf, 1991). Además, esta prueba se ha utilizado para evaluar mezclas complejas que forman parte de la dieta del ser humano (Guzmán et al., 1994; Guzmán y Graf, 1995; Graf et al., 1996).

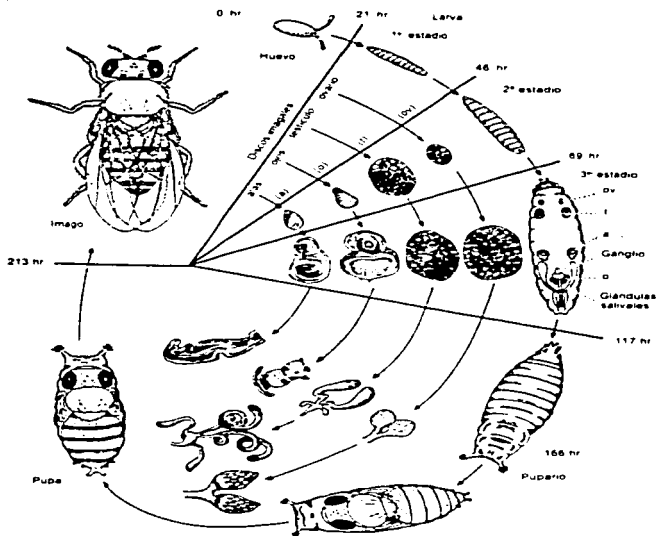


Fig. 3. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* que muestra el desarrollo de las estructuras de los órganos del adulto. (Tomado de Ramos y col., 1993).

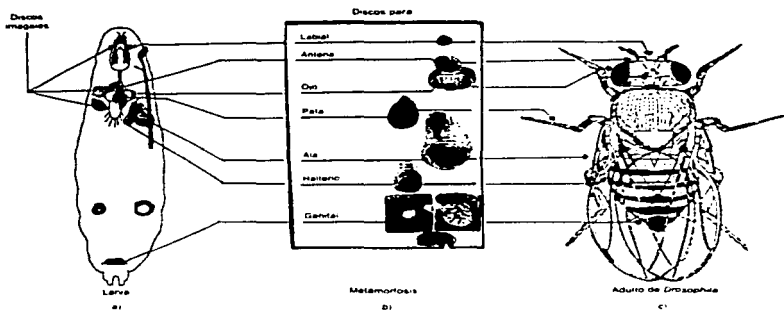


Fig. 4. Los discos imagales de *Drosophila melanogaster* darán lugar a las diversas estructuras del adulto por una serie de divisiones mitóticas.

(Tomado de Ramos y col., 1993).

OBJETIVOS

GENERAL :

1.- Evaluar la modulación del efecto genotóxico inducido por la N,N-dimetilnitrosamina, debido al pretratamiento de ciclohexanol y de etanol como inductores metabólicos en *Drosophila melanogaster*, utilizando la Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART).

PARTICULARES:

- 1) Determinar el efecto mutagénico de la N,N-dimetilnitrosamina.
- 2) Evaluar el efecto genotóxico del ciclohexanol
- 3) Evaluar el efecto genotóxico del etanol
- 4) Determinar la capacidad de inducción del ciclohexanol y del etanol como posibles activadores metabólicos, utilizando la N,N-dimetilnitrosamina como agente mutagénico en *Drosophila melanogaster*.

(Todos los objetivos se evaluaron mediante la Prueba de Mutación y Recombinación Somática en *Drosophila melanogaster*)

3.- MATERIALES Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Las líneas progenitoras utilizadas serán las siguientes :

- a) flr³/TM3,Ser
- b) mwh/mwh

OBTENCION DE HEMBRAS VIRGENES

Para llevar a cabo la prueba de SMART-ala, fue necesario hacer cruza entre organismos de las cepas a y b. Por lo tanto se aislaron hembras vírgenes de la línea a mediante la esterización de los organismos, observándolos en el microscopio de disección. Separándose aproximadamente cada 6 hrs., ya que a las 8 hrs. de edad alcanzan su madurez sexual (Rodríguez-Arnaiz y Ramos, 1992).

CRUZA

Hembras flr³/TM3,Ser x Machos mwh/mwh (cruza estándar)

OBTENCION DE LARVAS

Las hembras vírgenes se colocaron durante una semana en frascos con medio de cultivo fresco y levadura con el fin de aumentar el número de huevos depositados por las hembras. Una vez realizada la cruza se colectaron huevos en frascos con medio de cultivo fresco durante 6 hrs a 25° C., se eliminaron los progenitores y se incubaron los huevos durante 72 hrs bajo las mismas condiciones de laboratorio. Posteriormente, se removieron las larvas utilizando el método de Nothinger (1970), el procedimiento se basa en la formación de un gradiente de densidad que hace que las larvas que se encuentran en el frasco, floten, separándose del medio de cultivo, disminuyendo así el efecto de manipulación. Para protegerlas de la alta osmolaridad, se utilizó una solución de sacarosa al 20%

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se administraron pretratamientos a individuos (larvas transheterocigóticas) de 48 hrs de edad.

El protocolo seleccionado consistió en la exposición crónica por vía oral de las larvas de segundo estadio a un pretratamiento durante 24 hrs con etanol (1.8, 3.2 y 7.5%), ciclohexanol (0.15, 0.31 y 0.62%) y fenobarbital 12 mM, posteriormente se les dio un tratamiento con DMN (0.0, 0.78, 0.156 y 0.312 mM) durante el resto del desarrollo larvario.

Las larvas se dividieron en 32 grupos con aproximadamente igual número de individuos y fueron colocados en tubos homeopáticos (viales) con 0.7g de puré de papa y 5 ml de agua o de las soluciones a probar, utilizando como control positivo de activación enzimática al fenobarbital en una concentración 12 mM.

Los tubos se cubrieron con tapones de poliuretano y se incubaron a 25° C durante aproximadamente 10 días hasta que los adultos emergieron.

Los adultos emergidos se conservaron en etanol al 70% y posteriormente se hicieron preparaciones permanentes montando las alas con solución de Fauré para su análisis al microscopio (Graf et al., 1984).

El análisis microscópico se realizó de acuerdo a Graf et al., (1984), tomando en consideración los siguientes criterios:

- 1) Ubicación de las manchas en el ala: La región distal queda dividida en siete secciones: A, B, C, C', D, D' y E, Fig. 5 (García-Bellido y Merriam, 1971).
- 2) Tamaño de las manchas.
 - a) Pequeñas de 1 a 2 células afectadas.
 - b) Grandes con 3 ó más células afectadas.
- 3) Fenotipo de mancha, (Fig. 6-8)
 - a) Pequeñas simples con fenotipo mwh o flr³.
 - b) Grandes simples con fenotipo mwh o flr³.

c) Gemelas con fenotipo mwh y flr³ en una area adyacente."

ANALISIS ESTADISTICO DEL SISTEMA SMART

Frei y Wurgler (1988) publicaron una comparación de métodos estadísticos para decidir a través de la prueba de mutagénesis SMART-ala , los tipos de respuesta. Los métodos estadísticos comparados fueron la prueba binomial condicional, la prueba de X^2 y un método alternativo basado en el establecimiento de límites de confianza observados en las frecuencias de mutación.

En principio estos métodos son equivalentes y conducen a las mismas conclusiones, por lo que Frei y Wurgler utilizando el método que establece intervalos de confianza, generan el software SMART versión PC, el cual permite un manejo más agil y una forma estandarizada en el análisis de los resultados para esta prueba.

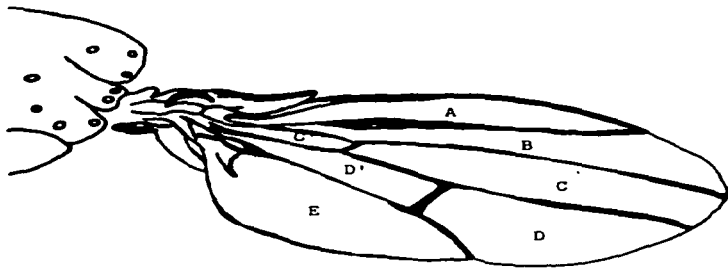


Fig. 5. Secciones en que se divide el ala de *D. melanogaster*, (García-Bellido, 1971).

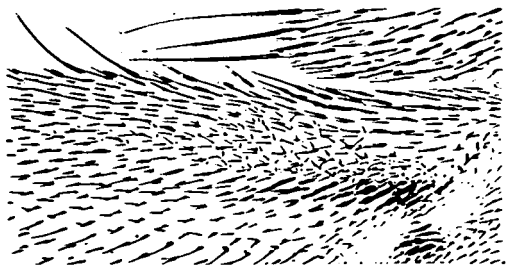


Fig. 6. Fenotipo del marcador mwh (Mancha Simple).



Fig. 7. Fenotipo del marcador fl^2 (Mancha Simple).

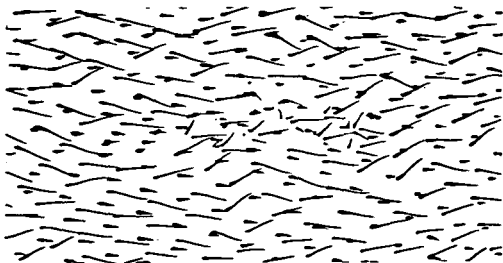


Fig. 8. Fenotipo de los marcadores mwh y fir³ (Mancha Gemela).

DIAGRAMA DE FLUJO

Realizar la cruce estandar utilizando las lineas :

- a) Hembras $f1r^3/TM3, Ser$
- b) Machos mwh/mwh



Colecta de huevos en medio de cultivo fresco durante 6 hrs.



Obtención de larvas de 48 hrs



Pretratamiento de las larvas con etanol o con ciclohexanol disueltos con agua durante 24 hrs. en las siguientes dosis

- Etanol (18,32 y 75%)
- Ciclohexanol (0,15, 0,31 y 0,62%)
- Agua (Testigo negativo)
- Fenobarbital (Testigo positivo)



Tratamiento crónico de las larvas de 72 hrs. con DIMETILNITROSAMINA en las siguientes concentraciones

- DMN 0,0 (Testigo)
- DMN 0,078 mM
- DMN 0,156 mM
- DMN 0,312 mM
- Ciclofosfamida 1 mM (Testigo positivo)



Incubación a 25° C Hasta el estado adulto



Conservación en etanol al 70%



Montaje de alas de los individuos heterocigotos en preparaciones permanentes



ANALISIS MICROSCOPICO

40 alas por tratamiento en un microscopio óptico a 400 aumentos



ANALISIS ESTADISTICO

De acuerdo a Frei y Wurgler (1988)

PROTOCOLO I

PRETRATAMIENTO

CRUZA : Hembras fir3/TM3, Ser 1 Machos mwh/mwh

COLECTA DE HUEVOS : 6 hrs.

EDAD DE LAS LARVAS : 48 Hrs.

PRETRATAMIENTO : Crónico vía oral durante 24 hrs.

ACTIVADORES ENZIMATICOS

Ciclohexanol

Etanol

CONCENTRACIONES

0.15, 0.31 y 0.62%

1.8, 3.2 y 7.5%

DISOLVENTE : Agua

TESTIGO NEGATIVO: Agua

TESTIGO POSITIVO : FENOBARBITAL 12 mM

MEDIO : 0.7g de puré de papa (Maggi) con 5 ml de las soluciones con ciclohexanol, etanol, fenobarbital o agua.

PROTOCOLO 2

TRATAMIENTO

CRUZA : Hembras σ^7 /TM3, Ser x Machos mwh/mwh

EDAD DE LAS LARVAS : 72 Hrs.

TRATAMIENTO : Crónico vía oral hasta el desarrollo de los adultos.

MUTAGENO : **CONCENTRACIONES :**
DMN (Sigma) 0.078, 0.15 y 0.31 mM

DISOLVENTE : Agua

GRUPO TESTIGO : Agua

TESTIGO POSITIVO : Ciclofosfamida 1mM

MEDIO : 0.7g de puré de papa (Maggi) con 5 ml. de las soluciones con mutágeno.

4. RESULTADOS

En todos los tratamientos y en sus diversas concentraciones las manchas simples pequeñas fueron las más abundantes (Tablas 1-7 y Gráficas 1-7)

Al aplicar los tratamientos de etanol simple a las concentraciones de 1.8, 3.2 y 7.5% (Tabla 1, Gráfica 1) o de ciclohexanol simple a las concentraciones de 0.15, 0.3125 y 0.625% (Tabla 2, Gráfica 2) se pudo determinar que ninguno de ellos incrementó significativamente la frecuencia de las manchas pequeñas, grandes, gemelas o totales, mientras que el fenobarbital solo, dio una respuesta débilmente positiva para la frecuencia de manchas grandes y de manchas totales y una respuesta claramente positiva para las frecuencias de manchas gemelas. En todos los casos la viabilidad de los grupos tratados con estas dosis fue semejante a la del testigo negativo (H₂O)

Tabla 1. Frecuencia de manchas obtenidas en alas de *D. melanogaster* en la cruce estándar tratadas con diferentes dosis de etanol

MANCHAS					
TRATAMIENTO	No. ALAS	PEQUEÑAS	GRANDES	GEMELAS	TOTALES
TESTIGO (H ₂ O)	240	0.30 (73)	0.05 (13)	0.00 (1)	0.36 (87)
ETANOL 1.8%	40	0.25 (10)-	0.03 (1)-	0.03 (1)	0.30 (12)-
ETANOL 3.2%	80	0.30 (24)-	0.06 (5)-	0.01 (1)	0.37 (30)-
ETANOL 7.5%	80	0.29 (23)-	0.04 (3)-	0.00 (0)	0.32 (26)-
FENO 12 mM	240	0.35 (83)-	0.13 (31)w	0.04 (9)+	0.51 (123)w

p < 0.05

+ = resultado positivo - = resultado negativo w = resultado débil-positivo

Tabla 2. Frecuencia de manchas obtenidas en alas de *D. melanogaster* en la cruza estandar tratadas con diferentes dosis de Ciclohexanol.

MANCHAS					
TRATAMIENTO	No. ALAS	PEQUEÑAS	GRANDES	GEMELAS	TOTALES
TESTIGO (H ₂ O)	240	0.30 (73)	0.05 (13)	0.00 (1)	0.36 (87)
CH 0.15 %	80	0.31 (25)-	0.05 (4)-	0.01 (1)	0.37 (30)-
CH 0.31 %	120	0.29 (35)-	0.03 (4)-	0.01 (1)	0.33 (40)-
CH 0.625 %	96	0.24 (23)-	0.05 (5)-	0.01 (1)	0.30 (29)-
FENO 12 mM	240	0.35 (83)-	0.13 (31)w	0.04 (9)+	0.51 (123)w

p < 0.05

+ = resultado positivo - = resultado negativo w = resultado débil-positivo

La dimetilmitrosamina mostró un incremento en la frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales con las concentraciones de 0.78, 0.15, observandose una relación dosis-respuesta (Tabla 3, Gráfica 3), en cambio la dosis de 0.3125 mM resultó ser sumamente tóxica para los individuos, observandose una viabilidad casi nula. La ciclofosfamida por su parte presentó incrementos significativos de manchas pequeñas y totales, sin embargo no se encontraron diferencias para las manchas grandes, el resultado no fue concluyente para las manchas gemelas con relación al testigo negativo (H₂O) (Tabla 3).

Tabla 3. Frecuencia de manchas obtenidas con diferentes dosis de DMN y Ciclofosfamida

MANCHAS					
TRATAMIENTO	No. ALAS	PEQUEÑAS	GRANDES	GEMELAS	TOTALES
Testigo (H ₂ O)	240	0.30 (73)	0.05 (13)	0.00 (1)	0.36 (87)
DMN 0.078 mM	120	1.17 (141)+	0.60 (72)+	0.22 (27)+	2.00 (240)+
DMN 0.15 mM	120	2.75 (330)+	1.48 (177)+	0.46 (55)+	4.68 (562)+
Ciclofos 1 mM	80	1.09 (87)+	0.09 (7)-	0.04 (3)	1.21 (97)+

p < 0.05 + = resultado positivo - = resultado negativo w = resultado débil-positivo

Con relación a los tratamientos combinados de etanol (1.8, 3.2 y 7.5%) y DMN 0.078 mM, se pudo observar que el pretratamiento de etanol 1.8% no modificó significativamente las frecuencias de manchas chicas, grandes, gemelas y totales, sin embargo, las dosis de 3.2 % dieron una respuesta débilmente positiva para las manchas chicas y grandes (1.84, 1.49) y una respuesta positiva para las manchas totales (3.62) respectivamente, un comportamiento semejante observamos cuando las larvas fueron pretratadas con una dosis de 7.5% de etanol encontrándose diferencias significativas para manchas chicas y totales (2.05 y 3.54) y diferencias débilmente positivas para manchas grandes y gemelas (1.0 y 0.49) respectivamente (Tabla 4, Gráfica 4) Estos resultados coinciden con los encontrados en los grupos pretratados con DMN y Fenobarbital 12 mM, donde se obtuvieron diferencias significativas en manchas chicas y totales (2.66 y 4.25) y débilmente positivas en manchas grandes (1.34)

Tabla 4 Frecuencia de manchas obtenidas con DMN 0.078 mM y diferentes dosis de Etanol.

MANCHAS					
TRATAMIENTO	No ALAS	PEQUEÑAS	GRANDES	GEMELAS	TOTALES
DMN 0.078 mM	120	1.17 (141)	0.60 (72)	0.22 (27)	2.00 (240)
DMN+ET 1.8%	40	1.30 (52)-	0.47 (19)-	0.12 (5)-	1.90 (76)-
DMN+ET 3.2%	80	1.84 (147)w	1.49 (119)w	0.30 (24)-	3.62 (290)+
DMN+ET 7.5%	80	2.05 (164)+	1.00 (80)w	0.49 (39)w	3.54 (283)+
DMN-FENO 12 mM	160	2.66 (426)+	1.34 (215)w	0.24 (39)-	4.25 (680)+

p < 0.05 + = resultado positivo - = resultado negativo w = resultado débil-positivo

En la tabla 5 y gráfica 5 se muestran los resultados obtenidos en los grupos pretratados con etanol (1.8, 3.2 y 7.5%) y tratados con DMN 0.15 mM. El pretratamiento con etanol 1.8% no modificó la frecuencia en ninguno de los tipos de manchas, el pretratamiento con etanol 3.2% incremento débilmente la frecuencia de manchas grandes, el pretratamiento con 7.5% de etanol modificó débilmente la frecuencia de manchas grandes y totales (2.96 y 6.66) respectivamente y el pretratamiento con fenobarbital incremento débilmente las frecuencias de manchas chicas, grandes y totales (3.54, 2.16 y 6.0) respectivamente.

Tabla 5. Frecuencia de manchas obtenidas en alas de *D. melanogaster* en la cruce estandar tratadas con DMN 0.15 mM y diferentes dosis de Etanol.

MANCHAS					
TRATAMIENTO	No. ALAS	PEQUEÑAS	GRANDES	GEMELAS	TOTALES
DMN 0.15 mM	120	2.75 (330)	1.48 (177)	0.46 (55)	4.68 (562)
DMN+ ET 1.8%	40	2.28 (91)-	0.87 (35)-	0.17 (7)-	3.33 (133)-
DMN+ ET 3.2%	110	2.70 (297)-	2.42 (266)w	0.46 (51)-	5.58 (614)-
DMN+ ET 7.5%	80	3.10 (248)-	2.96 (237)w	0.60 (48)-	6.66 (533)w
DMN+ FENO 12 mM	120	3.54 (425)w	2.16 (259)w	0.30 (36)-	6.00 (720)w

p < 0.05 + = resultado positivo - = resultado negativo w = resultado debil-positivo

Con respecto a los tratamientos combinados, tenemos que cuando se aplicaron diferentes dosis de ciclohexanol previamente a los tratamientos con DMN 0.078 mM se encontró que las frecuencias para manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales no eran significativamente diferentes a aquellas observadas en los grupos tratados únicamente con DMN a la misma dosis. Sin embargo, la frecuencia de manchas grandes en los grupos pretratados con CH 0.15 y 625% fue débilmente positivo (Tabla 6, Gráfica 6).

Con relación a los tratamientos combinados de DMN 0.15 mM y ciclohexanol a las diferentes dosis determinadas no se encontraron diferencias significativas para ningún tipo de mancha, cuando se compararon con los tratamientos sencillos de DMN a la misma concentración (Tabla 7, Gráfica 7).

Tabla 6. Frecuencia de manchas obtenidas en alas de *D. melanogaster* en la cruz estandar tratadas con DMN 0.078 mM y diferentes dosis de Ciclohexanol

MANCHAS					
TRATAMIENTO	No ALAS	PEQUEÑAS	GRANDES	GEMELAS	TOTALES
DMN 0.078 mM	120	1.17 (141)	0.60 (72)	0.22 (27)	2.00 (240)
DMN-CH0.15%	80	1.21 (97)-	0.80 (64)w	0.21 (17)-	2.22 (178)-
DMN+CH0.31%	120	1.25 (150)-	0.68 (81)-	0.19 (23)-	2.12 (254)-
DMN+CH0.62%	120	1.24 (149)-	0.88 (105)w	0.22 (26)-	2.33 (280)-
DMN+FENO12 mM	160	2.66 (426)+	1.34 (215)w	0.24 (39)-	4.25 (680)+

p < 0.05 + = resultado positivo - = resultado negativo w = resultado débil-positivo

Tabla 7. Frecuencia de manchas obtenidas en *D. melanogaster* en la cruz estandar tratadas con DMN 0.15 mM y diferentes dosis de Ciclohexanol.

MANCHAS					
TRATAMIENTO	No ALAS	PEQUEÑAS	GRANDES	GEMELAS	TOTALES
DMN 0.15 mM	120	2.75 (330)	1.48 (177)	0.46 (55)	4.68 (562)
DMN+ CH 0.15%	80	2.66 (213)-	1.41 (113)-	0.30 (24)-	4.37 (350)-
DMN+ CH 0.31%	120	2.03 (244)-	1.57 (188)-	0.32 (39)-	3.92 (471)-
DMN+ CH 0.62%	120	2.48 (298)-	1.37 (165)-	0.44 (53)-	4.30 (516)-
DMN+ FENO 12 mM	120	3.54 (425)	2.16 (259)+	0.30 (36)+	6.00 (720)+

p < 0.05 + = resultado positivo - = resultado negativo w = resultado débil-positivo

5. DISCUSION

El proceso de inducción de mutaciones por agentes químicos involucra una serie de eventos entre los cuales se encuentra la biotransformación mediada por enzimas metabólicas, en algunos casos generando productos electrofílicos que interactúan con el ADN. Para expresar su mutagenicidad, las nitrosaminas deben ser transformadas a un intermediario reactivo, α -hidroxinitrosodimetilamina (Negishi y Hayatsu, 1984), esta transformación se lleva a cabo con la participación de las isoenzimas del citocromo P-450, que tienen como papel fundamental facilitar la desintoxicación de los agentes químicos xenobióticos, para ello estas enzimas actúan sobre los mutágenos modificando su toxicidad, incrementándola, disminuyéndola, anulándola o formando especies de oxígeno altamente reactivas para el ácido desoxirribonucleico. Las lesiones premutagénicas, con frecuencia son reparadas mediante la participación de otro grupo de enzimas, ya sea por mecanismos de reparación libres de errores, en cuyo caso la alteración se elimina, o esta sujeta a errores, mecanismo de reparación que promueve y fija mutaciones (Ramel, 1986).

La determinación de la actividad genotóxica de un compuesto usando el bioensayo SMART, está dada por la comparación entre la frecuencia de manchas en los grupos tratados y la del lote testigo. Esta frecuencia está en relación con el número de células expuestas al mutágeno y que dan origen a un clon. Para estimar la cantidad de células presentes al momento del tratamiento se debe considerar la edad de la larva y el número final de células en el órgano adulto (Wurgler y Vogel, 1986; Graf y Wurgler, 1988). Para realizar la evaluación de genotoxicidad de la DMN, se seleccionaron larvas de 72 hrs de edad a las cuales se les dio un tratamiento crónico *via* oral con este mutágeno en concentraciones de 0.078 y 0.15 mM, observando un incremento significativo en la frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales. Las subfamilias CYP 2E1 y CYP2B1 del citocromo P-450 están involucradas en la activación de las nitrosaminas con diferentes estructuras químicas (Parke *et al.*, 1991), en particular la DMN es activada por la CYP2E1, lo mismo ocurre con la ciclofosfamida, por esta razón, se utilizó ciclofosfamida 1 mM como testigo positivo. Este compuesto se ha probado en una amplia variedad de sistemas tanto *in vivo* como *in vitro*, originando una respuesta positiva consistente en todos ellos. En células de riñón, hígado y pulmón en roedores tratados *in vivo* induce mutaciones letales dominantes, aberraciones cromosómicas, micronúcleos, intercambio de cromátidas hermanas y cambios en el

ADN . En cultivos *in vitro* de células humanas, induce aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas (Richardson, 1993)

Los resultados obtenidos presentaron una frecuencia de manchas totales de (2 0, 4 68 y 1 21) para los tratamientos sencillos de DMN 0 078, 0 15 mM y ciclofosfamida 1 mM respectivamente, mostrando claramente una relación dosis-respuesta La respuesta positiva del promutágeno a estas concentraciones coinciden con los descritos por Hallstrom et al . 1982 y Rodríguez-Arnaiz et al . 1996.

En la Prueba de Mutación y Recombinación Somática, la DMN ha probado inducir todo tipo de manchas, sin embargo, al probar la DMN en tratamientos combinados con fenobarbital se encontro que hubo diferencias significativas en la frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales, debido a la concentración de enzimas activadas posiblemente por dicho inductor Reportes previos de laboratorio han demostrado una correlación entre los niveles de citocromo P-450 y la capacidad para dimetilar la DMN y activarla a mutágeno (Guttenplan et al . 1976)

La Dimetilnitrosamina como ya se menciono, es un promutágeno monofuncional que al reaccionar con oxigenos y nitrógenos de las bases que conforman los ácidos nucleicos (excepto el nitrógeno del enlace glucosídico), produce aductos en aproximadamente 20 sitios diferentes (Vogel, 1992) , ademas produce rompimientos en las bases del ADN, lo que se traduce a nivel celular en actividad recombinogénica dependiente de la concentración , el tiempo de exposición al mutágeno es tambien un factor importante en el numero de células afectadas Para evaluar si el etanol o el ciclohexanol inducen la actividad metabólica, se comparo la frecuencia de manchas inducidas por la DMN en larvas que no recibieron etanol o ciclohexanol, con la inducida por la DMN en presencia de estos alcoholes

El etanol posee la capacidad de alterar las propiedades biológicas en una forma compleja, existiendo una posible interacción entre el consumo de etanol y sus efectos mutagénicos a través de los compuestos nitrosos Este alcohol es aplicado frecuentemente como solvente en pruebas de mutagenicidad (Gichner y Valeminský, 1988) Algunos estudios realizados con etanol en *Drosophila melanogaster* utilizando concentraciones de 4, 8 y 14 % en exposiciones crónicas o prolongadas han demostrado que produce efectos teratogénicos observados en los organismos adultos (Ranganathan et al . 1987a y Ranganathan et al . 1987b)

Los primeros experimentos realizados en el presente estudio con etanol en concentraciones de 15 y 30 % dieron como resultado un alto grado de toxicidad en los organismos, por lo que fue necesario disminuir las dosis a 1.8, 3.2 y 7.5 %, con estas dosis se encontró que la frecuencia de daño inducido fue muy semejante a la frecuencia basal (testigo) para todos los tipos de manchas.

En la tabla 4 se pueden observar los resultados del tratamiento sencillo con DMN 0.078 mM, el cual fue utilizado como promutágeno para comparar el efecto de los tratamientos combinados con etanol en diferentes concentraciones, el tratamiento con etanol 7.5 % induce la mayor proporción en la frecuencia de manchas chicas y totales resultando ser positiva y debilmente positiva para la frecuencia de manchas grandes y gemelas, sin embargo el tratamiento combinado con DMN y Fenobarbital 12 mM (testigo positivo) mostró inducir aun mas la frecuencia de manchas chicas, grandes y totales, pero no las manchas gemelas, las cuales fueron mayores en el tratamiento con etanol 7.5 %.

En el tratamiento con DMN 0.15 % y etanol (tabla 5) se encontro el mismo efecto que con la dosis anterior de DMN, siendo la dosis de 7.5 % de etanol la que presento mayor inducción en la frecuencia de manchas grandes, gemelas y totales, aun comparandola con el tratamiento de fenobarbital, esto sugiere que el etanol induce alguno de los grupos de familias del citocromo P-450 a través de los cuales acelera la activación de la nitrosamina y la transforma en un producto mutagénico. A este respecto existen varios reportes de estudios *in vitro*, en los cuales se ha demostrado que la DMN y la NDEA son activados eficientemente a productos mutagénicos con fracciones S9 de hígado de rata en animales pretratados con dicho alcohol (Haag y Sipes, 1980, Garro et al., 1981). Por lo contrario Peng et al. (1982) administraron concentraciones de 10 y 15 % de etanol en el agua de beber a los animales tratados durante 3 o 6 días, mostrando que el etanol es un inhibidor de la isoenzima CYP 2E1. Mas tarde Mori et al. (1985), utilizando la prueba de Ames con *Salmonella*, encontro que el tratamiento con etanol disminuyo significativamente la actividad mutagénica de la DMN y la DEN. La presencia de etanol en concentraciones de 5-12.5 % en un ensayo con *Arabidopsis*, tambien redujo la mutagenicidad de la DMN y la NMBA (Gichner y Valeminsky, 1986). Los efectos antimutagénicos del etanol fueron explicados en ambos estudios por su acción sobre los procesos de detoxificación de las nitrosaminas probadas (DMN, DEN y NMBA). Esta suposición es sustentada por diversos estudios que han demostrado que el etanol inhibe el metabolismo de la DMN *in vivo* e *in vitro* (Schwarz et al., 1980; Peng et al., 1982).

Algunos autores que han trabajado con la técnica de electroforesis, reportaron que el tratamiento con etanol induce especies proteicas con pesos moleculares que oscilan entre los 50,000 y 52,000 Siguiendo de manera similar el protocolo de estos autores, Espinosa-Aguirre et al., 1996, demostraron un incremento en la activación de la DMN por microsomas hepáticos de ratas. Por otra parte, el estudio de electroforesis en gel de microsomas de ratas tratadas con ciclohexanol o etanol revelaron que ambos compuestos incrementaron la intensidad de algunas bandas proteicas en la región del peso molecular del cit P-450

Por otra parte, en las tablas 6 y 7 se pueden observar los resultados de los experimentos realizados para determinar la habilidad del ciclohexanol como posible inductor de la actividad metabólica del citocromo P-450 en *D. melanogaster* utilizando el promutágeno DMN, los resultados obtenidos, en general no mostraron diferencias significativas cuando se pretrataron las larvas con ciclohexanol en tratamientos combinados con DMN, al compararlos con los obtenidos en los grupos que solo habían sido tratados con DMN. En todos los casos observamos que las frecuencias para todos los tipos de manchas con el tratamiento de DMN 0.15 mM solo y para los grupos expuestos a las tres dosis de ciclohexanol y el tratamiento de DMN 0.15 mM fueron semejantes, lo mismo ocurrió cuando se aplicaron en tratamientos usando la concentración 0.078 mM de DMN, excepto en la frecuencia de manchas grandes con ciclohexanol 0.15 y 0.625%, donde encontramos una respuesta debilmente positiva, esto sugiere que aunque la nitrosamina es un promutágeno y por lo tanto de acción indirecta, el ciclohexanol en las condiciones en las que se llevaron a cabo los experimentos no mostró ser un inductor eficiente de los sistemas enzimáticos involucrados en el metabolismo de DMN.

Probablemente estos resultados nos indican que dentro de las larvas, el ciclohexanol pudo haber sido rapidamente absorbido, distribuido, metabolizado y eliminado del cuerpo, de tal forma que no fue retenido en cantidades apreciables para inducir las familias del citocromo P-450 responsables de la activación de la dimetilnitrosamina. De acuerdo al diagrama de las fases 1 y 2 del Metabolismo de Drogas, en donde se muestran las vias de detoxificación y activación (Fig. 1) pudiera considerarse que el ciclohexanol haya sido reducido y excretado como un conjugado glucurónico, tal como se ha comprobado en estudios previos con ratas tratadas con ciclohexanona, donde siguiendo la administración oral de este compuesto se ha visto que es convertido rápidamente a ciclohexanol, el cual es excretado predominantemente como ciclohexilglucuronido (Parmar y Burkar, 1991).

Contradictoriamente un estudio realizado con fracciones S9 obtenidas de ratas pretratadas oralmente por 5 días con ciclohexanol, demostró que tratamientos con este alcohol ciclico fueron capaces de inducir la activación del promutageno DMN en sus metabolitos altamente mutagenicos detectados en la cepa TA 100 de *Salmonella typhimurium*. La separación de proteínas microsomales a través de la tecnica de electroforesis, localizó bandas proteicas situadas en el rango de pesos moleculares entre los 50,000 y 52,000, concluyendo que el ciclohexanol induce las isoenzimas CYP 2E1 y CYP2B1/2B2 (Espinosa-Aguirre et al., 1997)

En otro estudio efectuado por Espinosa-Aguirre et al., 1993, se demostro previamente que el ciclohexanol inhibio los efectos mutagenicos de la DEN y del 4-(N-nitrosometilamina)-1-3-piridil)-1-butanona (NNK) en la cepa TA 100 de *Salmonella typhimurium*. Por otra parte, se ha reportado que tratamientos con ciclohexanol muestran un efecto antimutagenico contra la genotoxicidad del benzo(a)pireno (BP), del 2-aminoantraceno (2-AA) o de otros mutágenos de acción directa, tales como el metilmetanosulfonato (MMS) y el etil metanosulfonato (EMS), esto sugiere que el mecanismo antimutagenico del ciclohexanol puede estar relacionado con la inhibición del metabolismo de la nitrosamina en cuestion (Espinosa-Aguirre et al., 1996)

Este tipo de sustancias, tales como el etanol y el ciclohexanol tambien se han utilizado en estudios de localización de radioactividad en sitios de formación de tumores. En un trabajo donde se administro oralmente etanol y otros alcoholes como el n-butanol y t-butanol a ratones durante 20 minutos previos a la inyección de carbono 14-NNK, se encontro que disminuyo la localización de radioactividad en ductos epiteliales bronquiales y salivales, asi como en el higado. No se conoce a ciencia cierta el mecanismo por el cual estos alcoholes inhiben la localización de radioactividad en estos tejidos, pero se considera la información existente a cerca de las posibles enzimas involucradas, estas pueden ser la alcohol deshidrogenasa, que se encuentra en muy altas concentraciones en el epitelio bronquial de raton y la otra es la isoenzima P-450_{MDA}, que presenta una actividad catalitica alta cuando se combinan alcoholes y nitrosaminas (Waddell y Marlowe, 1983). En otros experimentos comentados en Espinosa-Aguirre et al., (1993), el ciclohexanol (CAS No 108-93-0) alteró la cinética de distribución del carbono 14-NNK cuando fue administrado inmediatamente despues de la inyección intravenosa de esta nitrosamina, de tal forma que la exposición al ciclohexanol provoco una disminución en los sitios de localización de radioactividad en ductos de epitelio bronquial y en higado de raton.

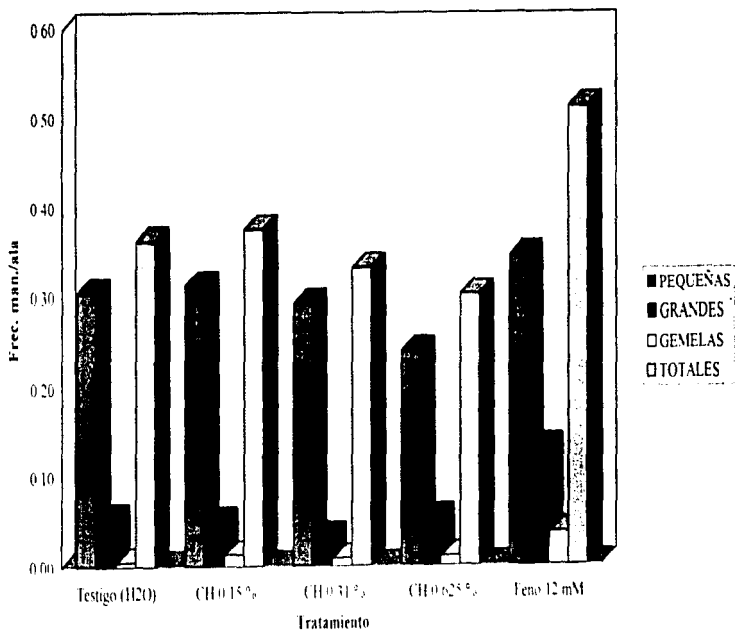
Durante muchos años se ha utilizado el Aroclor 1254 como un inductor potente. Las proteínas observadas en extractos microsomales de hígado en animales pretratados con este compuesto, han demostrado que es un inductor eficiente en la activación de las isoenzimas del citocromo P-450 y formas asociadas en el metabolismo de varios carcinógenos genotóxicos. La mutagenicidad de la DMN inducida por Aroclor en fracciones microsomales S9 depende de la concentración del mutágeno empleado. Con las concentraciones de 1 y 3 mM de DMN en microsomas de ratones pretratados con este inductor, se encontró una disminución en la habilidad para convertir la DMN a mutágeno y una alta habilidad cuando se utilizó en una concentración de 70 mM (Hagg y Sipes, 1980). De manera semejante, consideramos que tanto el etanol como el ciclohexanol pueden funcionar como inductores o inhibidores de la dimetilasa con la DMN y otras nitrosaminas. Para caracterizar eficientemente al etanol y ciclohexanol como posibles inductores de actividad metabólica, consideramos importante probarlos en la cruz de alta bioactivación, la cual posee un incremento en su capacidad enzimática, aumentando significativamente la sensibilidad del promutágeno.

6. CONCLUSIONES

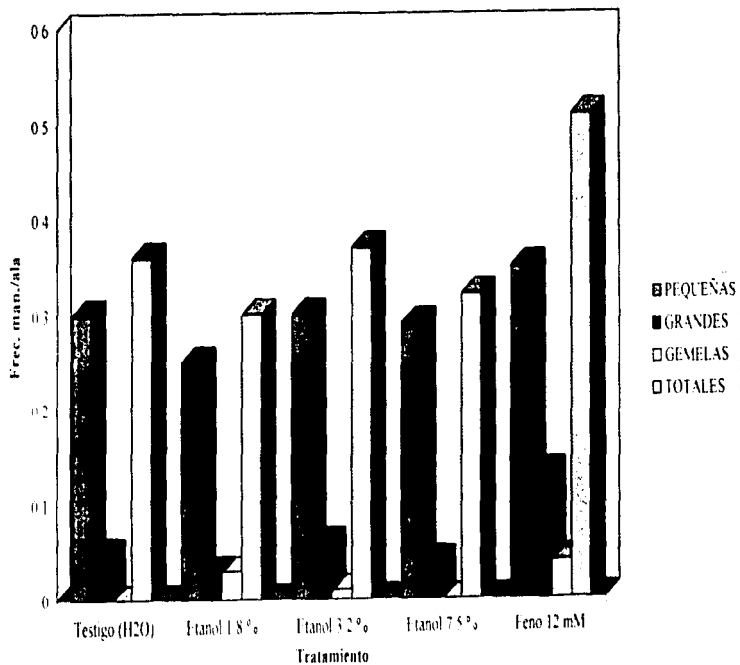
Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten obtener las siguientes conclusiones :

- 1) El bioensayo SMART demostró ser sumamente eficiente para detectar el efecto genotóxico de la DMN.
- 2) Los tratamientos simples de etanol (1,8, 3,2 y 7,5%) o de ciclohexanol (0,15, 0,312 y 0,625%) no incrementaron significativamente la frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales, por lo que no se les pudo considerar como genotóxicos a las concentraciones empleadas.
- 3) En general no se pudo detectar inducción de la actividad metabólica en *D. melanogaster* con el ciclohexanol a las dosis utilizadas.
- 4) Los tratamientos combinados de etanol y DMN sugieren un efecto inductor del citocromo P-450 con este alcohol.
- 5) Mediante el sistema SMART pudo ser detectada la actividad inductora del fenobarbital.

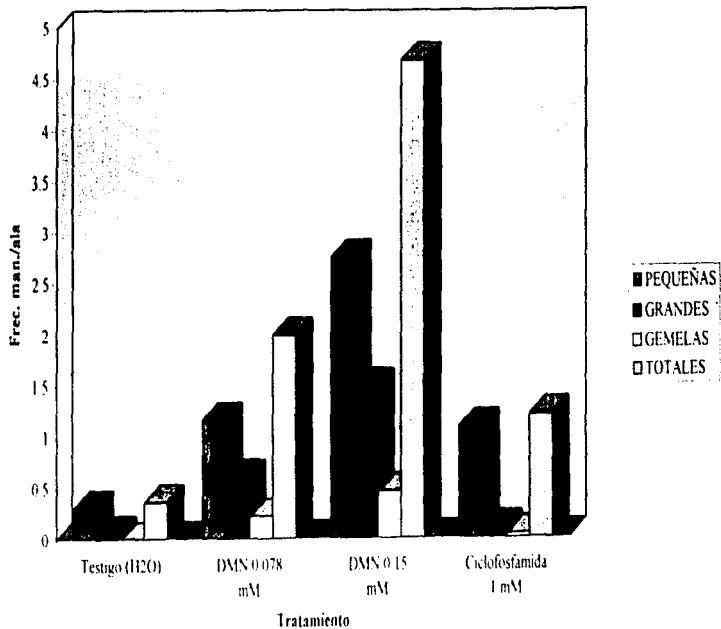
Gráfica 2 Frecuencia de manchas obtenidas con diferentes dosis de ciclohexanol.



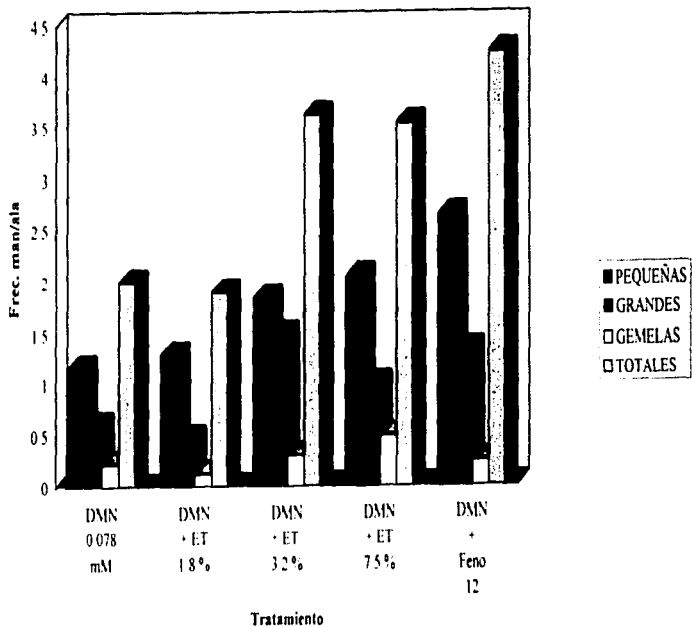
Gráfica 1. Frecuencia de manchas obtenidas con diferentes dosis de etanol.



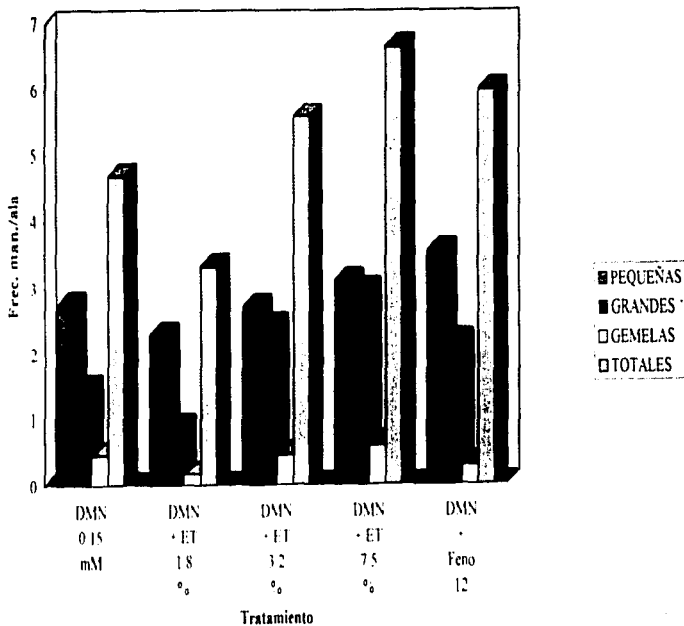
Gráfica 3. Frecuencia de manchas obtenidas con diferentes dosis de DMN y Ciclofosfamida.



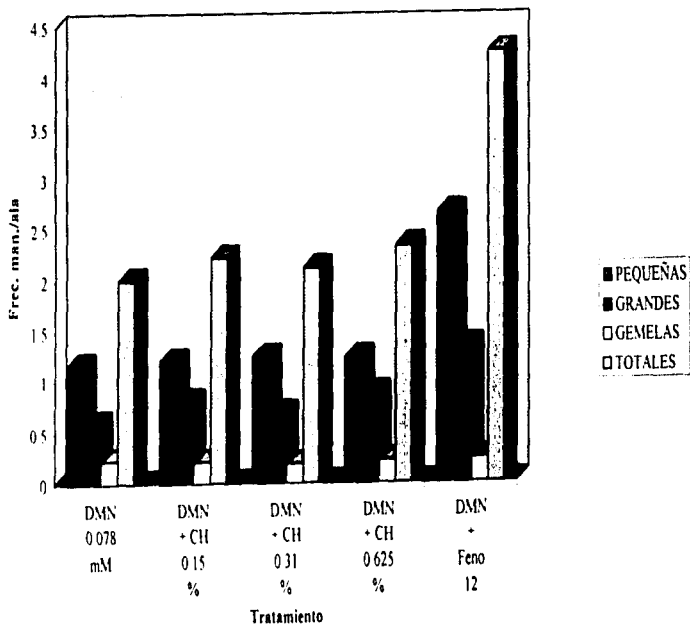
Gráfica 4. Frecuencia de manchas obtenidas con DMN 0.078 mM y diferentes dosis de Etanol



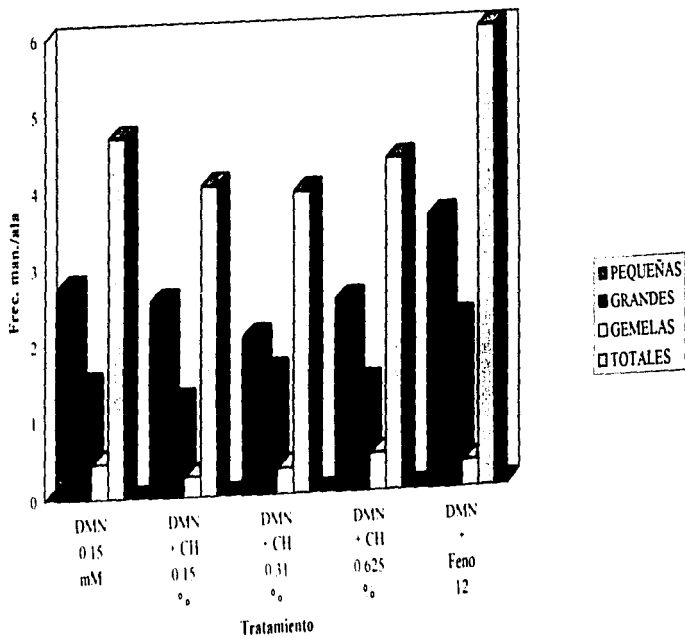
Gráfica 5. Frecuencia de manchas obtenidas con DMN 0.15 mM y diferentes dosis de Etanol



Gráfica 6. Frecuencia de manchas obtenidas en los tratamientos con DMN 0.078 mM y diferentes dosis de Ciclohexanol.



Gráfica 7. Frecuencia de manchas obtenidas con los tratamientos de DMN 0.15 mM y diferentes dosis de Ciclohexanol.



B. REFERENCIAS

- Ames, B., McCann, J. y Edith Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test *Mutation Res* 31 : 347-364.
- Baars, A.J., W.G.H. Blijleven, G.R. Monh, A.T. Natarajan y D.D. Breimer (1980) Preliminary studies on the ability of *Drosophila* microsomal preparations to activate mutagens and carcinogens. *Mutation Res.* 72 : 257-264.
- Demerec, M. y B. P. Kaufmann (1975) Introducción a la Genética y Citología de *Drosophila melanogaster*. México, D.F. 56 pp
- Espinosa-Aguirre, J.J., Vilchis, C., Ostrosky-Wegman, P., Benitez, L., Lares, I y J. Rubio (1993) Antimutagenicity of cyclohexanol towards 4-(N-nitrosodimethylamino)-1-(3-pyridil)-1-butanone and N-nitrosodiethylamine in *Salmonella typhimurium* strain TA100. *Mutation Res* 300 : 151-154
- Espinosa-Aguirre, J.J., Rubio, J., Cassani, M., Nosti, R., Caballero, S., González, I. y G. Martínez (1996) Induction of microsomal enzymes in liver of rats treated with cyclohexanol. *Mutation Res.* 368 : 103-107
- Espinosa-Aguirre, J.J., Rubio, J., López, I., Nosti, R. y J. Asteiza (1997) Characterization of the CYP isozyme profile induced by cyclohexanol. *Mutagenesis.* 3 : 159-162
- Frei, H. y F. E. Würgler (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutation Res.* 203 : 297-308
- Frolich, A. y F.E. Würgler (1989) New tester stains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. *Mutation Res.* 216 : 179-187.

Gandhi, R., Varak, E. y Goldberg, M. (1992) Molecular Analysis of a Cytochrome P-450 Gene of Family 4 on the *Drosophila* X Chromosome. DNA and Cell Biology, 11 : 397-404.

Garcia-Bellido, A. y J.R. Merriam (1971) Parameters of the wing imagal disc development of *Drosophila melanogaster*. Dev. Bio. 24 : 61-87.

Garro, A.J., H.K. Seitz y C.S. Lieber (1981) Enhancement of dimethylnitrosamine metabolism and activation to a mutagen following chronic ethanol consumption. Cancer Res. 41 : 120-124.

Gichner, T. y J. Veleminsky (1986) Organic solvents inhibit the mutagenicity of promutagens dimethylnitrosamine and methylbutylnitrosamine in a higher plant *Arabidopsis thaliana*. Mutagenesis 1 : 107-109

Gichner, T. y J. Veleminsky (1988) Inhibitors of N-nitroso compounds-induced mutagenicity. Mutation Res. 195 : 21-43

Goldstein, A., Aronow, L. y Summer M. k. (1974) Principles of drug action. The basis of pharmacology. Second edition. Wiley International Edition. pp 685-687.

Graf, U. y D. Singer (1992) Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Rev. Int. Contam. Ambient 8 : 15-27

Graf, U., Wurgler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B. y P.G. Kale (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environmental Mutagenesis 6 : 153-188

Graf, U. y F.E. Wurgler (1988) The sex-linked recessive lethal assay and somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Evaluation of short-term test for carcinogens. International Programme on chemical safety's collaborative study on in vivo assays. Vol. 2 Cambridge University Press Pp 2 301-2 309

Graf, U., Spano, M. A., Guzmán, R. J., Abraham, S. K. y Heloisa H. de Andrade (1996) The Wing Somatic Mutation And Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. Proceeding Second Conference of the Pan-African Environmental Mutagen Society (PAEMS).

Guengerich, F. P. (1988) Roles of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Res.* 48 : 2946-2954.

Guttenplan, J. B., Hutterer F. y Garro A. J. (1976) Effects of cytochrome P-448 and P-450 inducers on microsomal dimethylnitrosamine demethylase activity and the capacity of isolated microsomes to activate dimethylnitrosamine to a mutagen. *Mut. Res.* 35 : 415-422.

Guzmán, R. J. y U. Graf (1995) *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. Proceedings of the 37 Th Conference of the IAGLR Plenum Press.

Guzmán, R. J. y U. Graf (1991) Eficiencia del bioensayo SMART para detectar bajas dosis de radiación gamma. Informe técnico científico IB DR/017/91. Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.

Guzmán, R. J., Wurgler, F. E. y E. W. Vogel (1990) Training course on *Drosophila* somatic genotoxicity assays in Mexico. *Mutation Res.* 234 : 107-109.

Guzmán, R. J., Graf, U., Varela, A., Pollicroniades, R. y Arturo Delfin (1994) Mutación y Recombinación Somáticas inducidas por neutrones rápidos en la prueba de la mancha de ala de *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Cont. Ambient.* 10 : 29-30.

Haag, S. M. y G. Sipes (1980) Differential effects of acetone or aroclor 1254 pretreatment on the microsomal activation of dimethylnitrosamine to a mutagen. *Mutation Res.* 74 : 431-438.

Halliwell, B. y J. Gutteridge (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Second Edition. Clarendon Press. Oxford

Hallström, I. y A. Blanck (1985) Genetic regulation of the cytochrome P-450 system in *Drosophila melanogaster* I Chromosomal determination of some cytochrome P-450-dependent reactions. *Chem Biol Interactions*. 56 : 157-171.

Hallström, I., Magnusson, J. y C. Ramel (1982) Relation between the somatic toxicity of dimethylnitrosamine and a genetically determined variation in the level and induction of cytochrome P-450 in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res* 92 : 161-168.

Hayes, S (1985) Ethanol-induced genotoxicity. *Mutation Res*. 143 : 23-27

Heinstra, P. W. H., Eisses, K., Schoonen, W. G., Aben, W., Winter, A. J., van der Horst, D. J., van Marrewijk, M. J., Beenakkers, A. M., Scharloo, W. y G. E. W. Thorig (1983) A dual function of alcohol dehydrogenase in *Drosophila*. *Genetica*, 60 : 129-138

Hodgson, E. y R. Randy (1991) *Insect cytochrome P-450 En: Molecular aspect of monooxygenases and bioactivation of toxic compounds*. Arinc, E., J.B. Shenkman y E. Hodgson (Eds) Vol 202 Plenum Press. Nato Series pp 75-91.

Index Merck (1989) *Encyclopedia of chemical and drugs*. Published by Merck and Co., Inc. Rahway New York 11 e 1605 pp.

Jiao, J., Glickman, B. W., Anderson, M. W. y M. Zielinska (1993) Mutational specificity of N-nitrosodimethylamine: Comparison between *in vivo* and *in vitro* assays. *Mutation Res*. 301 : 27-31.

Kissin, B. y M. M. Kaley (1974) *Alcohol and Cancer* En: B. Kissin and H. Begleiter (Eds.), *The Biology of Alcoholism*. Vol. 3. Clinical Pathology. Plenum, New York. pp. 481-511.

Krishna, G. M.L., Kropko y J.C. Theiss (1990) Dimethylnitrosamine-induced micronucleus formation in mouse bone marrow and spleen. *Mutation Res* 242 : 345-351

Laval, J., Boiteux, S. y T.R. O'Connor (1990) Physiological properties and repair of apurinic/aprimidinic sites and imidazole ring-opened guanines in DNA. *Mutation Res.* 233 : 73-79.

Lindsley, D.L. y G.G. Zimm (1992) *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego 1133 pp.

Mori, Y., Yamazaki, H., Toyoshi, K., Emi, Y., Uchida, K., Tsutsumi, M. y Y. Konishi (1985) Inhibitory effects of organic solvents on the mutagenicity of N-nitrosodialkylamines in *Salmonella*. *Mutation Res* 142 : 153-158

Nebert, D.W., Kimura, S. y F.J. González (1984) Cytochrome P-450 genes and their regulation. *Symp. Mol Cell Biol* 19 : 309-329

Nebert, D.W. y Gonzalez, F.J. (1987) P-450 Genes: Structure, Evolution and Regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 56 : 945-993.

Nebert, D.W. (1991) Role of Genetics and Drug Metabolism in Human Cancer Risk. *Mut. Res.* 247 : 267-281

Negishi, T. y H. Hayatsu (1984) Inhibitory effect of saturated fatty acids on the mutagenicity of N-nitrosodimethylamine. *Mutation Res* 135 : 87-96

Negishi, T., Shiotani, T., Fujikawa, K. y H. Hayatsu (1991) The genotoxicities of N-nitrosamines in *Drosophila melanogaster in vivo*. The correlation of mutagenicity in the wing spot test with the DNA damages detected by the DNA-repair test. *Mutation Res* 252 : 119-128.

Nottinger, R. (1970) Sucrose Density Separation: A Method for Collecting Large Numbers of *Drosophila* Larvae. *Dros. Inform. Serv.* 45, 117

Obe, G. y H. Ristow (1979) Mutagenic, Cancerogenic and Teratogenic Effects of Alcohol
Mutation Res. 65 : 229-259.

Obe, G. y D. Anderson (1987) International commission for protection against enviromental
mutagens and carcinogens ICPEMC Working Paper No. 15/1. Genetic effects of ethanol
Mutation Res. 186 : 177-200.

Ong, T.M y H.V. Malling (1975) Microsomal activation of dimethylnitrosamine to metabolites
mutagenic in *Neurospora crassa* Mutation Res. 31 : 197-199.

Parke, D.V., C. Ioannides y D.F. Lewis (1991) The role of the cytochromes P450 in the
detoxificacion and activation of drugs and other chemicals. Can. J. Physiol Pharmacol. 69 : 537-
549.

Parmar, D y L. T. Burkar (1991) Metabolism and disposition of cyclohexanone oxime in male F-
344 rats. Drug Metabolism and Disposition. Vol. 19 No. 6, 1101-1107.

Peng, R., Tu, Y y C. S. Yang (1982) The induction and competitive inhibition of a high affinity
microsomal nitrosodimethylamine demethylase by ethanol. Carcinogenesis 3 : 1457-1461

Porter, T D y Coon M J (1991) Multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory
mechanisms J Biol Chem 266 (21) 13469-13472

Ramel, C (1986) Development of short-term assays for the detection of carcinogens genetic
and molecular considerations. Mutation Res. 168 : 327-342

Ramos, M.P., Abundis, H., Gaytan, J.C., Ordaz, G., Orozco, P., Maldonado, J., Hernández, J.,
González, E., Reyes, P., Galicia, E. y A. Muñoz (1993) Manual de Laboratorio de Genética para
Drosophila melanogaster. Mc. Graw-Hill. México, D.F. 131 pp.

Ranganathan, S., D.G. Davis y R.D. Hood (1987a) Developmental Toxicity of Ethanol in *Drosophila melanogaster*. *Teratology*. 36 : 45-49.

Ranganathan, S., D.G. Davis, J.D. Leeper y R.D. Hood (1987b) Effects of Differential Alcohol Dehydrogenase Activity on the Developmental Toxicity of Ethanol in *Drosophila melanogaster*. *Teratology*. 36 : 329-334.

Richardson, M.L y S. Gangolli (1993) The Dictionary of Substances and their Effects. De. Royal Society of Chemistry, Inglaterra Vol. 2, pp. 778-779.

Ristow, H., A Seyfarth y E.R. Lochmann (1995) Chromosomal damages by ethanol and acetaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae* as studied by pulsed field gel electrophoresis *Mutation Res.* 326 : 165-170.

Rodriguez-Arnaiz, R y M P Ramos (1992) *Drosophila* como sistema para detectar agentes genotóxicos Serie de Genética los pequeños manuales Facultad de Ciencias UNAM 50 pp

Rodriguez-Arnaiz, R., Orozco, S P., Gaytán, O J C y U Graf (1996) Analysis of mitotic recombination induced by several mono and bifunctional alkylating agents in the *Drosophila* wing-spot test *Mutation Res* 351 : 133-145

Shephard, S.E., Ch Schlatter y W.K. Lutz (1987) Assessment of the risk of formation of carcinogenic N-nitroso compounds from dietary precursors in the stomach *Chem Toxic* 25 : 91-108

Sierra, L.M., A.L. Barros, M. Garcia, J.A. Ferreiro y M.A. Comendador (1991) Acrolein genotoxicity in *Drosophila melanogaster* I. Somatic and germinal mutagenesis under proficient repair conditions *Mutation Res.* 260 : 247-256

Stephany, R. y P.L. Schuller (1980) Daily dietary intakes of nitrate, nitrite and volatile N-nitrosamines in the Netherlands using the duplicate portion sampling technique. *Oncology* 37, 203.

Schwarz, M., Apple, K. E., Schrenk, D. y W. Kunz (1980) Effect of ethanol on microsomal metabolism of dimethylnitrosamine. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 97 : 233-240.

Tricker, A.R. y R. Pressmann (1991) Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanism and carcinogenic potential. *Mutation Res.* 259 : 277-289.

Vogel, E.W. y A.T. Natarajan (1979a) The relation between reaction kinetics and mutagenic action of mono-functional alkylating agents in higher eukaryotic systems I: Recessive lethal mutations in *Drosophila*. *Mutation Res.* 62 : 51-100.

Vogel, E.W. y A.T. Natarajan (1979 b) Relation between reactions kinetics and mutagenic action of mono-functional alkylating agents in higher eukaryotic systems II: Total and partial sex chromosome loss in *Drosophila*. *Mutation Res.* 62 : 101-123.

Vogel, E.W. (1987) Evaluation of potential mammalian genotoxins using *Drosophila*: the need for a change in test strategy. *Mutagenesis.* 2 : 161-171.

Vogel, E.W. (1991) Genotoxic chemicals: an introduction into basic principles of genetic toxicology. (Laboratorium voor stralengenetica en chemische mutagenese, RU Leiden, Sylvius Laboratoria).

Vogel, E.W. (1992) Genotoxic chemicals: an introduction into the basic principles of genetic toxicology. (Laboratorium voor Stralengenetica en chemische mutagenese, RU Leiden, Sylvius Laboratoria. (Curso).

Vogel, E.W. y J.A. Zijlstra (1987) Mechanistic and methodological aspects of chemically-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 182 : 243-264.

Waddell, W.J. y C. Marlowe (1983) Inhibition by alcohols of the localization of radioactive nitrosonomicotine in sites of tumor formation. *Science*. Vol. 221 No. 4605, 51-52.

Wurgler, F.E. y E.W. Vogel (1986) In vivo mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*. En de Serres FJ. *Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection*, Vol. 10, New York, Plenum, pp 1-72.

Wurgler, F.E. (1991) Effects of chemical and physical agents on recombination events in cells of the germ line of male and female *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 250 : 275-290.