



0.0346 12
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

“EVALUACION ANTIGENOTOXICA DEL ACIDO ASCORBICO, CLOROFILINA Y ACIDO RETINOICO ANTE EL CONDENSADO DE HUMO DE CIGARRO Y DOS DE SUS COMPONENTES EN CELULAS SOMATICAS DE *Drosophila melanogaster*”.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)
P R E S E N T A :
BIOL. PATRICIA / RAMIREZ VICTORIA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. JUDITH GUZMAN RINCON

MEXICO, D. F.

1999.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

270871



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.

**A LA PRESENCIA DE LOS GRANDES MAESTROS
QUE HAN GUIADO Y SEGUIRÁN GUIANDO
MIS ESTUDIOS, MI PROFESIÓN Y MI VIDA**

**CON TODO MI AMOR, RESPETO Y AGRADECIMIENTO
A MIS PADRES**

JESÚS RAMÍREZ ESPINOSA

Y

MARÍA DE LA LUZ VICTORIA ESPINOZA

**POR SU CONFIANZA, APOYO Y COMPRENSIÓN, PERO SOBRE TODO
POR SU EJEMPLO Y CARIÑO QUE SERÁN MI GUÍA POR SIEMPRE**

A mis hermanos:

**TERE, GABRIEL, EMILIA, CRISTINA, ADRIANA,
LUZ MARÍA, DAVID Y CARLOS**

***Por su cariño, apoyo y por los grandes momentos
que hemos compartido***

CON AMOR PARA FRANK

Por ser parte de mi vida

A mis sobrinos:

**GABRIEL, MICHELLE, ALONSO, ALEJANDRA,
DANIEL, ABRAHAM Y DIANA**

Por la felicidad que nos han brindado

***Con mucho cariño para la Dra. JUDITH GUZMÁN RINCÓN
Por su ayuda, apoyo y confianza***

***Gracias por compartir conmigo sus conocimientos y
experiencias que han enriquecido mi carrera profesional.***

***Gracias por su invaluable
Amistad y cariño***

AGRADECIMIENTOS

DR. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
DR. JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO
DR. URLICH GRAF
M. en C. OLGA OLVERA RAMÍREZ
M. en C. PATRICIA OROZCO SOTO

*Gracias por los comentarios y sugerencias que
enriquecieron este manuscrito*

*A todo el personal del laboratorio de genética del
Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares
por el apoyo brindado.*

*A las autoridades del Instituto Nacional de
Investigaciones Nucleares por las facilidades otorgadas
para el desarrollo de este trabajo.*

A:

***Xóchitl, Susana, Claudia, Yolanda, Doris, Carolina,
Fernando e Isabel***

***A todas las personas que me han brindado su cariño,
amistad y apoyo incondicional que hicieron posible
la realización de esta tesis, en especial al
Ing. José Luis Castillo y M. en B. Judith Jiménez***

Gracias

ÍNDICE

ÍNDICE.	i
RESÚMEN	iv
ABSTRACT	v
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1. Condensado de humo de cigarro	4
1.1.1. Antecedentes	4
1.1.2. Estudios mutagénicos del CHC	5
1.2. El 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona y la N'-nitrosomnicotina	8
1.2.1. Antecedentes	8
1.2.2. Estudios mutagénicos del NNK y NNN	9
1.2.3. Metabolismo del NNK y NNN	10
1.3. Antimutagénesis	13
1.3.1. Antecedentes	13
1.4. Ácido ascórbico	16
1.4.1. Generalidades	16
1.4.2. Antecedentes	17
1.4.3. Toxicidad	18
1.4.4. Efectos antimutagénicos	19
1.4.5. Mecanismos de acción antimutagénica	20
1.5. Clorofilina	22
1.5.1. Generalidades	22
1.5.2. Antecedentes	22
1.5.3. Toxicidad	23
1.5.4. Efectos antimutagénicos	23
1.5.5. Mecanismos de acción antimutagénica	24
1.6. Ácido retinóico	27
1.6.1. Generalidades	27
1.6.2. Antecedentes	28
1.6.3. Toxicidad	29
1.6.4. Efectos antimutagénicos	30
1.6.5. Mecanismos de acción antimutagénica	31
1.7. Estudios antimutagénicos frente al CHC, NNK Y NNN	32
1.8. Sistemas de prueba	34
1.9. <i>Drosophila melanogaster</i> como bioensayo	35

1.10. Prueba de mutación y recombinación somática	37
1.11. Hipótesis	38
2. OBJETIVOS	39
2.1. Objetivo general	39
2.2. Objetivos particulares	39
3. MATERIALES Y MÉTODOS	40
3.1. Compuestos químicos	40
3.2. Biológicos	40
3.2.1. Líneas de <i>Drosophila. melanogaster</i>	40
3.2.2. Cruzas realizadas	44
3.3. Diseño experimental	44
3.3.1. Concentraciones	44
3.3.2. Tratamientos	45
3.4. Procesamiento del material	47
3.5. Análisis estadístico	47
4. RESULTADOS	51
4.1. Evaluación genotóxica de los antimutágenos	51
4.1.1. Pre-tratamiento	51
4.1.2. Co-tratamiento	52
4.2. Evaluación de la actividad genotóxica del CHC	53
4.3. Evaluación de la actividad genotóxica del NNK y NNN	54
4.3.1. Pre-tratamiento	54
4.3.2. Co-tratamiento	54
4.4. Análisis de los individuos con múltiples inversiones en el cromosoma III	57
4.5. Evaluación antigenotóxica de AA, CL y AR frente al CHC	62
4.5.1. Pre-tratamiento	62
4.6. Evaluación antigenotóxica del AA, CL y AR frente al NNK	63
4.6.1. Pre-tratamiento	63
4.6.2. Co-tratamiento	65
4.7. Evaluación antigenotóxica del AA, CL y AR frente al NNN	66
4.7.1. Pre-tratamiento	66
4.7.2. Co-tratamiento	68

5. DISCUSIÓN	69
5.1 Condensado de humo de cigarro	69
5.2 NNK y NNN	71
5.3 Antimutagénesis	75
5.4 Bioensayo SMART	77
8. CONCLUSIONES	79
9. REFERENCIAS	80

RESÚMEN

El 4(metilnitrosamino)1-1(3-piridil)-1-butanona (NNK) y la *N'*-nitrosornicotina (NNN) son dos de las principales nitrosaminas componentes del humo de cigarro las cuales han mostrado ser altamente mutagénicas en diferentes organismos y sistemas de prueba, comprobándose que ambas, necesitan activación metabólica para poder ejercer sus efectos mutagénicos. Por otro lado, existen sustancias de origen natural como las vitaminas y algunos otros compuestos como la clorofilina, que han despertado un gran interés, ya que han manifestado ser compuestos con actividad antimutagénica. Usando la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en alas de *Drosophila melanogaster*, se evaluó la actividad genotóxica del NNK, NNN, así como del condensado de humo de cigarro (CHC). Se evaluó también la genotoxicidad del ácido ascórbico (AA), la clorofilina (CL) y el ácido retinóico (AR) y finalmente se determinó la actividad antimutagénica del AA, CL y AR frente al daño producido por el NNK, NNN y el CHC, en larvas transheterocigotas de 72 hrs derivadas de las cruza estándar *flr³/TM3, Bd^S x mwh* (E) y de bioactivación elevada *OR(R)1;OR(R)2;flr³/TM3, Bd^S x mwh* (BE), en los protocolos de pre- y co-tratamiento. El NNK y NNN resultaron ser altamente genotóxicos en las larvas de ambas cruza, manteniendo una relación dosis-respuesta, por su parte, el CHC fue débil positivo. Se observó que el principal evento genético que conduce a la genotoxicidad de estos compuestos es la recombinación. Por otro lado, los antimutágenos *per se*, no fueron tóxicos ni genotóxicos a las larvas. No se observó ningún efecto protector ni del AA, CL o AR frente al daño producido por las nitrosaminas y el CHC en ninguno de los protocolos.

ABSTRACT

4(methylnitrosamine)1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) and *N*'-nitrosonornicotine (NNN) are two of the main nitrosamines of cigarette smoke which have been shown to be mutagenic in several organisms and in different test. Both compounds need metabolic activation in order to exert their genotoxic effects. On the other hand, natural substances, like vitamins and some other compounds as chlorophyllin, are of great interest because they show antigenotoxic activity. Using the Somatic Mutation And Recombination Test (SMART) in wing cells of *Drosophila melanogaster*, the genotoxicity of NNK, NNN and cigarette smoke condensate (CSC) was evaluated in larvae derived from the standard *flr³/TM3, Bd^S* x *mwh* (ST) and high bioactivation *OR(R)1;OR(R)2;flr³/TM3, Bd^S* x *mwh* (HB) crosses. Furthermore, the antigenotoxicity of ascorbic acid, chlorophyllin and retinoic acid in pre-treatment and co-treatment protocols was investigated. The results were: NNK and NNN were high genotoxic to larvae from both crosses with a clear dose-response relationship. On the other hand, CSC was weakly positive. The main genetic event to lead genotoxic damage of this compounds is the recombination. The three modulating agents alone were not genotoxic in both types of larvae and were not protective effects against NNK, NNN or CSC neither protocols.

1. INTRODUCCIÓN

Un elemento importante en el estilo de vida de los seres humanos desde hace algunos siglos es el consumo del tabaco, el cual presumiblemente incrementa el riesgo de padecer enfermedades crónicas. El hábito de fumar cigarro ha sido relacionado con el cáncer de laringe, cavidad oral, esófago, páncreas y pulmones (éste último de gran importancia por el número de casos que se ha reportado en décadas recientes), causando la muerte prematura y en el caso de mujeres embarazadas, ocasionando efectos tóxicos al feto, que incluye un retardo en su crecimiento, aborto espontáneo y muerte neonatal (USDHHS, 1980)

La preocupación sobre los efectos nocivos del tabaquismo empezó a principios del siglo XIX, pero no fue sino hasta mediados de éste, cuando se relacionaron con enfermedades de tipo cardíaco y se estableció también que existen efectos del humo de cigarro en los fumadores pasivos, además se demostró la correlación existente entre el cáncer de los labios y nariz con el uso del tabaco (Díaz Oliveros, 1997).

A partir de 1964 y hasta 1980 tuvo lugar en Estados Unidos una serie de eventos promovidos por el Departamento de Salud, Educación y Bienestar Público y se publicó el primer informe general de los daños que el tabaquismo ocasiona a la salud. Para 1995 se analizaron nueve causas de muerte evitables en los Estados Unidos (Fig. 1.1). La primera de ellas es por consumo de cigarro, que en 1990 alcanzó el 38% del total de muertes de entre estas nueve, seguida por las provocadas por problemas alimenticios con el 28%, después las producidas por el alcoholismo, que llegan al 10%, y otras de las que se esperaba mayor mortalidad, como el abuso de drogas, representa menos del 1%. Estos hechos reflejan una vez más el daño significativo a la salud que produce el tabaquismo (Bartecchi *et al.*, 1995).

En nuestro país la cantidad de fumadores y ex fumadores del sexo masculino alcanzan el 38 y 37%, mientras que para el sexo femenino representan el 16% y 14% respectivamente (Fig.1.2). Además se sabe que el mayor número de fumadores se encuentra en la edad más productiva de la vida, entre los 26 y 44 años. La suma actual de no fumadores es de 62%, lo cual puede significar que la mayoría de la población, gracias a acciones realizadas por la Secretaría de Salud ha cobrado conciencia del daño que produce el tabaco (Díaz Oliveros, 1997).

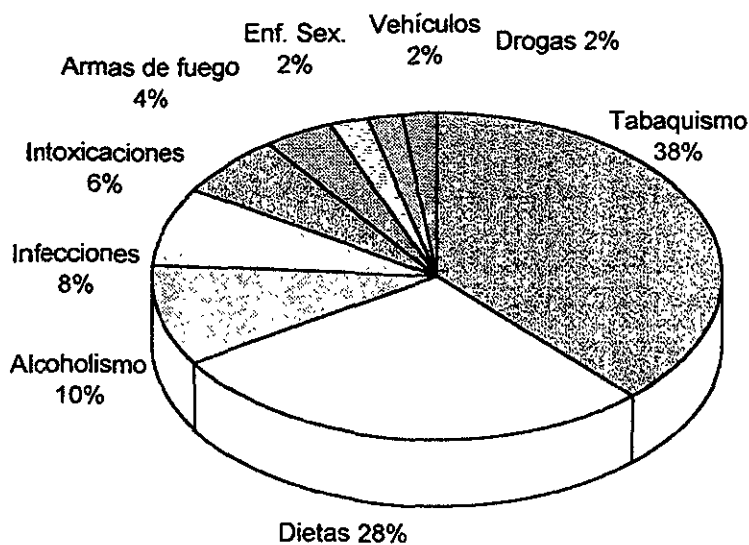


Fig. 1.1. Causas de muertes evitables en los E. U.
(Bartecchi *et al.*, 1995)

Las consecuencias del tabaquismo van desde efectos negativos sobre los mecanismos de defensa del aparato respiratorio, enfermedades cardiovasculares y

toxicidad fetal hasta la promoción y formación de algún tipo de cáncer, como ya se mencionó en un principio.

Los estudios epidemiológicos y experimentales apuntan hacia el hecho de que el humo de cigarro contiene sustancias que hacen a las células susceptibles de desarrollar un tumor incrementando el riesgo de cáncer a través de su exposición crónica (Hoffmann y Harris, 1986).

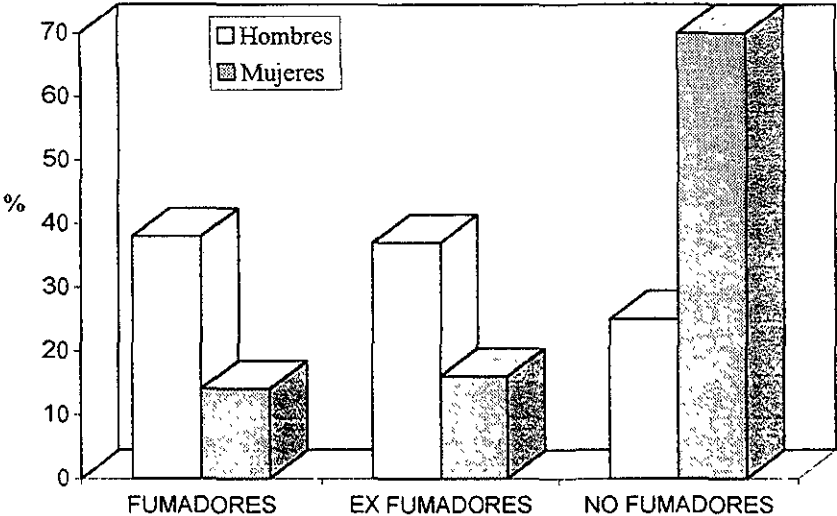


Fig. 1.2 Distribución del tabaquismo en México (Díaz Oliveros, 1997)

1.1. CONDENSADO DE HUMO DE CIGARRO

1.1.1. ANTECEDENTES

La combustión del tabaco tiene dos fases: la de gas y la de humo; en esta última se producen los dos cancerígenos más activos, que son: el benzo(a)pireno [B(a)P] (0.016 µg/cigarrillo) y el dibenzo(a)pireno [D(a)P] (0.002 a 0.01 µg/cigarrillo), que no se encuentran en las hojas del tabaco virgen, pero se forman por pirólisis debido a las altas temperaturas que generan los cigarrillos cuando se consumen. Por acción similar, la nicotina y la piridina se convierten en los cancerígenos mencionados. El análisis de las partículas contenidas en el humo de cigarro se puede observar en la Tabla 1.1 (USDHHS, 1980).

Existen varios componentes en el humo del cigarro, que por sí solos no son carcinogénicos; sin embargo, cuando se asocian con otros, pueden inducir el desarrollo de neoplasias. Entre ellos están los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (Rüdiger *et al.*, 1976; Brookes, 1977; Florin *et al.*, 1980; La Voie *et al.*, 1981; Hoffmann *et al.*, 1983), las nitrosaminas (Hoffmann *et al.*, 1981; Hecht y Hoffmann, 1988), ciertos compuestos N-heterocíclicos (Yoshida y Matsumoto, 1980; Curvall *et al.*, 1982), derivados del fenol (Jansson *et al.*, 1986, 1988; Hoffmann y Wynder, 1986), aldehídos (Obe y Beek, 1979, Jansson *et al.*, 1988) y aminas aromáticas (Yoshida y Matsumoto, 1978), los ésteres grasos de cadena larga y los ácidos grasos libres, todos los cuales se encuentran en abundantes cantidades en el humo de cigarro (Díaz Oliveros, 1997).

Es importante señalar que todos los componentes cancerígenos se forman en la fase del humo de la combustión del tabaco, porque la otra fase, la de gas, produce gran cantidad de sustancias irritantes de las vías respiratorias como son los formaldehídos, acetaldehídos, metanol, acetona, metil-etil-cetona, amoniaco, dióxido de nitrógeno y sulfito de hidrógeno, entre otros (Díaz Oliveros, 1997).

**Tabla 1.1 Componentes del humo de cigarro
(Díaz Oliveros, 1997)**

Sustancias	% Partículas	No. Compuestos	Toxicidad
Ácidos	7.7-12.8	25	Irritantes
Glicerol, glicol y OH	5.3-8.3	18	Irritantes
Aldehídos y cetonas	8.5	27	Irritantes
Hidrocarburos alifáticos	4.9	64	Irritantes
Hidrocarburos aromáticos	0.44	81	Carcinogénicos
Fenoles	1-3.8	45	Irritantes y cocarcinógenos

1.1.2. ESTUDIOS MUTAGÉNICOS DEL CONDENSADO DE HUMO DE CIGARRO

Existen evidencias tanto epidemiológicas como experimentales que sugieren el hecho de que el humo de cigarro es una mezcla compleja que contiene sustancias que promueven e inducen tumores incrementando el riesgo a un cáncer a través de una exposición crónica (Hoffmann y Harris, 1986).

El primer reporte de la mutagenicidad del condensado de humo de cigarro (CHC) fue de Venema (1959), usando una emulsión acuosa del CHC sin los HAPs, la cual demostró ser inductora de aberraciones cromosómicas en raíces de cebolla (*Allium cepa*); se encontró la presencia de cromosomas rezagados y fragmentos acéntricos, entre otros. Posteriormente Leuchtenberger y Leuchtenberger (1970) describieron que la exposición de células de ratón 3T3 a la fase gaseosa del CHC incrementó el índice mitótico y causó alteraciones al ADN. Asimismo, Izard *et al.*

(1970) reportaron que una fracción de CHC rica en compuestos heterocíclicos nitrogenados, inhibió la mitosis en las células de la raíz del ajo (*Allium sativum*).

Kier *et al.* (1974) fueron los primeros en demostrar en *Salmonella* TA1538, la capacidad del CHC para inducir mutaciones puntuales. Ellos detectaron que el CHC contenían mutágenos de acción directa, es decir, compuestos que son mutagénicos en la ausencia de S9, además de compuestos de acción indirecta que necesitan activación metabólica.

El primer reporte de la mutagenicidad del CHC en un organismo eucarionte fue realizado por Pescitelli (1979) en *Drosophila melanogaster* con la prueba de letales recesivos ligados al sexo. A partir de entonces, la capacidad mutagénica del CHC se ha puesto de manifiesto en diferentes organismos como levaduras (Sankaranarayanan y Rao, 1988), bacterias (Wilmer y Spit, 1986), ratones (Doolittle *et al.*, 1991) y en linfocitos (Hsu *et al.*, 1991), ya que contienen agentes genotóxicos los cuales causan daño en el ADN, ocasionando mutaciones (Balansky *et al.*, 1987), incremento en el intercambio de cromátidas hermanas (Benedict *et al.*, 1984), formación de células binucleadas (Balansky y Blagoeva, 1989), desarreglos mitóticos y anormalidades cromosómicas (Sabharwal *et al.*, 1985).

Se han estudiado también los efectos del CHC en humanos, dentro de los cuales se encuentran los efectos morfológicos del esperma, los teratogénicos y los de transformación celular.

a) Efectos en la morfología del esperma: Wyrobek y Bruce en 1975 describieron que la morfología anormal del esperma en ratones puede ser inducida por la exposición a mutágenos durante la espermatogénesis. Aunque el mecanismo exacto de este efecto no es conocido, la morfología anormal puede ser transmitida por lo menos a dos generaciones (Hugenholtz y Bruce, 1976), el

incremento en la frecuencia de esperma anormal se cree que es consecuencia de mutaciones puntuales o pequeñas deleciones (Heddle y Bruce, 1977).

Existen varios estudios en los que se ha demostrado en humanos una relación dosis-respuesta entre la morfología anormal del esperma y el número de cigarrillos fumados por día (Evans *et al.* 1981); sin embargo, existen otros que no revelan diferencias significativas entre fumadores y no fumadores (Godfrey, 1981)

b) Efectos teratogénicos: Diferentes compuestos presentes en el humo de cigarrillo como el B(a)P, uretano, antracenos, nitrosaminas e hidrazinas, han mostrado ser carcinógenos transplacentales en animales de laboratorio (Tomatis, 1979; Wynder y Hoffmann, 1979). En un estudio realizado en 1978, se encontró que una mujer que fumaba 20 o más cigarrillos diarios tenía un riesgo significativo de presentar en el feto malformaciones en el sistema digestivo, en las válvulas cardíacas, en la piel, defectos en el tubo neural y anomalías cromosómicas (Kelsey *et al.*, 1978).

Además de los defectos congénitos, se han encontrado otros efectos en el feto, tales como un incremento de la enzima hidroxilasa aril hidrocarburo (AHH) en las placentas de madres fumadoras, anomalías placentarias, reducción de la talla, peso y desarrollo normal del niño, e incremento del riesgo de abortos espontáneos (DeMarini, 1983)

c) Transformaciones celulares: La capacidad del CHC para transformar células *in vitro* fue estudiada por primera vez por Lasnitzki (1958) quien usó tejido pulmonar de feto probando 4 fracciones neutras del CHC, observando que estas inducen hiperplasia y otros cambios citológicos en el epitelio de los bronquiolos. Inui y Takayama (1971a,b) y Freeman *et al.* (1971) fueron los primeros en demostrar que el CHC puede transformar también cultivos

celulares, convirtiendo fibroblastos normales en células fusiformes que formaron tumores después de ser inoculadas en cricetos jóvenes.

También describieron que células L, tratadas con CHC causaron tumores cuando se inyectaban en ratones C3H recién nacidos (Inui y Takayama, 1971a). Entre algunas otras transformaciones celulares están la alteración en el índice mitótico, contenido de ADN y crecimiento anormal (DeMarini, 1983). Obe y Herha (1978) encontraron una alta frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos de personas fumadoras, comparada con la de no fumadoras. Entre las anomalías se observaron además intercambio de cromátidas hermanas (ICH), cromosomas dicéntricos y en anillos.

1.2 EL 4-(METILNITROSAMINO)-1-(3-PIRIDIL)-1-BUTANONA Y LA NITROSONORNICOTINA

1.2.1. ANTECEDENTES

Durante el procesamiento del tabaco hay tres tipos de N-nitrosaminas carcinógenas que se forman, estas son las nitrosaminas volátiles (NAV), nitrosaminas no volátiles (NANV) y las nitrosaminas específicas del tabaco no volátiles (NAET) (Fig.1.3) (Brunnemann *et al.*, 1986).

Las NAET se originan a partir de la nitrosación de los alcaloides de la nicotina durante la preparación del tabaco generando los siguientes compuestos. [4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona] (NNK); [1-nitroso-2-(3-piridil)-pirrolidina] o nitrosonornicotina (NNN) y [4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-butanal] (NNAL) (Fig. 1.4). El NNK y NNN han sido identificados en el humo de cigarro como dos de los principales componentes, por sus altas concentraciones de 0.13 a 0.74 y 0.22 a 7.0 ppm respectivamente, además de que son las nitrosaminas que más prevalecen

en el ambiente por lo que constituyen un alto riesgo para los humanos (Hoffmann *et al.*, 1979).

Existe evidencia de que la capacidad enzimática de algunos órganos para transformar a las nitrosaminas en agentes alquilantes es un factor determinante en la carcinogénesis y se ha demostrado que estas nitrosaminas específicas del tabaco necesitan activación metabólica para poder expresar sus efectos carcinogénicos (Zhu *et al.*, 1991, Foiles *et al.*, 1992a).

1.2.2. ESTUDIOS MUTAGÉNICOS DEL NNK Y NNN

Estudios comparativos realizados en ratas entre estos dos compuestos han mostrado que el NNK tiene una mayor actividad carcinogénica que la NNN. Dosis de 135ppm de NNN y sólo 27.5 ppm del NNK, mostraron que ambos inducen tumores en la cavidad oral y adenomas en el pulmón, sin embargo, el NNK provoca mas tumores por animal que la NNN (Hecht *et al.*, 1978). En ratas de la cepa F344, la inyección subcutánea del NNK produjo tumores en la cavidad nasal, el pulmón y el hígado, mientras que la NNN sólo en la cavidad nasal (Hecht *et al.*, 1980).

El NNK causa tumores en el hígado, mucosa nasal y páncreas teniendo una alta especificidad por el pulmón (Hecht *et al.*, 1980, 1984; Hoffmann *et al.*, 1981; Hecht y Hoffmann, 1988; Riverson *et al.*, 1988), induciendo mutaciones, aberraciones cromosómicas, micronúcleos (Padma *et al.*, 1989), ICH (Zimonjic *et al.*, 1989), aductos y síntesis desacoplada del ADN en varios sistemas de prueba (Alaoui-Jamali *et al.*, 1988, 1989; Belinsky *et al.*, 1986, 1988; Hecht *et al.*, 1983; Rossignol *et al.*, 1989; Williams y Laspia, 1979)

Se han llevado al cabo numerosos estudios de estas nitrosaminas, entre los que se tienen los epidemiológicos (Haley *et al.*, 1986) y farmacocinéticos (Hoffmann *et al.*, 1981), entre otros.

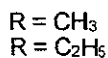
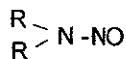
1.2.3. METABOLISMO DEL NNK Y NNN

Estudios realizados en nariz, pulmón e hígado fetal del criceto dorado, mostraron que el mecanismo por el cual se activan los metabolitos del NNK y NNN puede ser la α -hidroxilación (Chen *et al.*, 1978; Hecht *et al.*, 1980, 1984; Hoffmann *et al.*, 1981). Al hidroxilar al NNK se producen hidroxinitrosaminas inestables (4) y (5) (Fig. 1.4), las cuales se descomponen a su vez en diazohidróxidos electrofílicos (8) y (10). Estos diazohidróxidos producen finalmente un cetoácido (15). El origen del cetoácido (15) e hidroxiácido (16), es a través de la α -hidroxilación del NNAL (2), siendo los principales metabolitos del NNK detectado en orina de ratas F344 (Castonguay *et al.*, 1983).

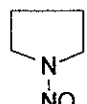
Los mecanismos que activan al NNN son muy similares a los del NNK (Fig. 1.4). En este caso los metabolitos (15) y (16) también son indicadores de una α -hidroxilación. El NNN puede transformarse en N óxido (3) a través de la N-oxidación piridina y la reducción carbonil del NNK, sin embargo, tanto el N-óxido como el NNAL, son menos tumorigénicos que el NNK en ratones A/J (Hecht *et al.*, 1990).

Posteriormente, Peterson *et al.* (1991) comprobaron que esta misma vía metabólica seguían estas nitrosaminas en los microsomas hepáticos y pulmonares de ratones A/J y que el principal evento que generaba a los metabolitos carcinogénicos era la α -hidroxilación formando finalmente al 4-oxo-1-(3-piridil)-1-butanona (OPB) y al 4-hidroxil-1-(3-piridil)-1-butanona (HPB) (Fig. 1.4)

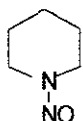
NITROSAMINAS VOLÁTILES



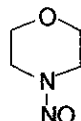
NDMA
NDEA



NPYR

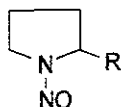
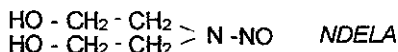


NPIP

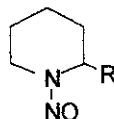


NMOR

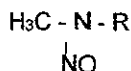
NITROSAMINAS NO VOLÁTILES



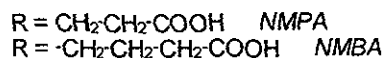
NPIC



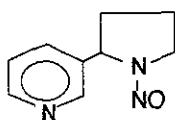
R = -COOH NPRO
R = -CH₂COOH NPYRAC



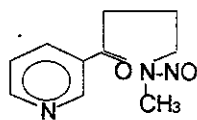
R = -COOH NPIC
R = -CH₂COOH NPIPAC



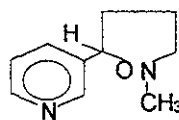
NITROSAMINAS NO VOLÁTILES ESPECÍFICAS DEL TABACO



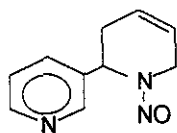
NNN



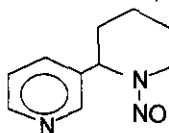
NNK



NNAL



NAT



NAB

Fig. 1.3. Principales nitrosaminas que se forman en el humo del tabaco (Brunnemann *et al.*, 1986)

NDMA, Nitrosodimetilamina; NDEA, Nitrosodietilamina; NPYR, Nitrosopirrolidina; NPIP, Nitrosopiperidina; NMOR, Nitrosomorfolina; NDELA, Nitrosodietanolamina; NPRO, Nitrosoprolina; NPIC, Ácido Nitrosopipecolico; NPYRAC, A. Acético Nitrosopirrolidina; NPIPAC, A. Acético Nitrosopiperidino; NMPA, A. Propiónico 3-(N-nitroso-N-metilamino); NMBA, A. Butírico 4-(N-nitroso-N-metilamino); NNN, Nitrosomonocotina; NNK, 4-(metilnitroamino)-1-(3-piridil)-butanona; NNAL, 4 (metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-butanona; NAT, Nitrosoanatabina; NAB, Nitrosoanabasina.

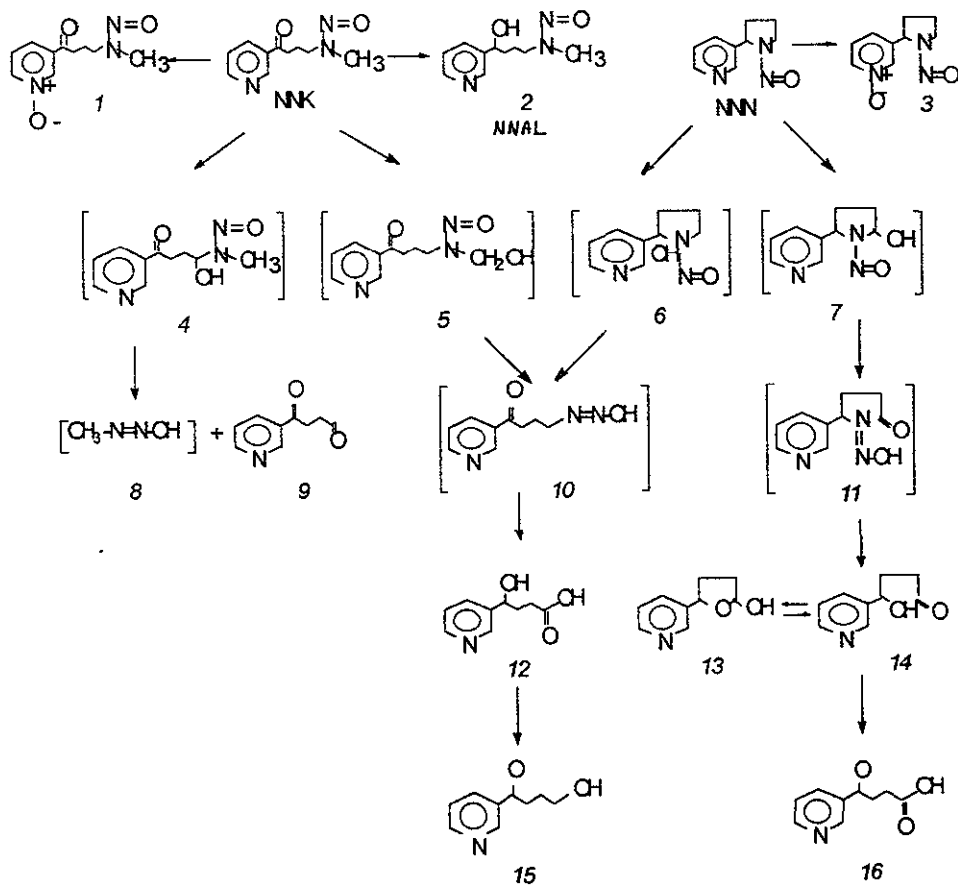


Fig. 1.4. Transformación metabólica del NNK y NNN
(Hoffmann *et al.*, 1981)

Las estructuras en corchetes indican los metabolitos hipotéticos intermedios.

1.3. ANTIMUTAGÉNESIS

Basándose en el uso de pruebas microbianas para la detección de mutágenos, se han identificado además de un gran número de mutágenos y carcinógenos, sustancias que disminuyen o anulan los efectos genotóxicos de los mutágenos. A estas moléculas se les conoce como antimutágenos (Hayatsu *et al.*, 1988).

1.3.1. ANTECEDENTES

La palabra "antimutagénesis" fue utilizada por primera vez por Novick y Szilard en 1952 para describir una tasa de mutación más baja que la espontánea. Desde entonces, Kada *et al.* (1986) han hecho de la antimutagénesis una palabra que describe, dos tipos de eventos: i) la inactivación de mutágenos o carcinógenos antes de que éstos puedan llegar al ADN, y ii) eventos en los cuales se restaura el ADN después de que han ocurrido las lesiones. Así mismo, usaron el término de "bioantimutagénesis" para definir la "inhibición" de la tasa de mutación espontánea a la cual Novick y Szilard se refirieron, sugiriéndola para todos los tipos de reacciones que actuaban a nivel del ADN incluyendo la inhibición de los procesos de reparación mutagénica.

Se han evaluado aproximadamente 500 compuestos para determinar si tienen propiedades como agentes quimiopreventivos (Boone *et al.*, 1990) y se ha probado que algunos de éstos, pertenecientes a por lo menos 25 clases químicas han mostrado algún efecto protector (Wattenberg, 1991).

Estos antimutágenos presentan una gran variedad de orígenes, mecanismos y niveles de acción tanto extracelular como intracelular a través de diferentes rutas de inhibición interviniendo en los múltiples procesos dentro de la mutagénesis, principalmente durante la prevención primaria del daño causado por algún mutágeno por lo que su capacidad protectora es muy amplia. Asimismo actúa

como una defensa importante en contra del daño a diversas macromoléculas celulares (De Flora y Ramel, 1988; Hayatsu *et al.*, 1988).

En años recientes, se ha estudiado una gran variedad de antimutágenos, con el fin de esclarecer sus mecanismos de acción y la forma en que pueden utilizarse para la prevención de enfermedades de origen genético (Abraham *et al.*, 1994).

En la mayoría de los sistemas experimentales, la protección ha sido llevada al cabo por la administración del agente quimiopreventivo previa y/o concurrentemente a la exposición al mutágeno. Dada esta relación temporal entre la administración del antimutágeno y mutágeno, parece probable que estos agentes actúen principalmente afectando el metabolismo y la disposición de mutágenos, por lo tanto, alterando eventos críticos en la iniciación de la mutagénesis.

Entre los antimutágenos probados están las porfirinas, presentes en animales y plantas en forma de bilirrubina, hemoglobina, biliverdina; clorofila y feofitina. Los ácidos grasos, las vitaminas (β -carotenos, α -tocoferoles, a. ascórbico), los polifenoles (taninos y flavonoides), que han llamado la atención al mostrar frente a distintos mutágenos, sus propiedades antimutagénicas disminuyendo o anulando el daño causado al ADN (Ong *et al.*, 1989).

Entre los antimutágenos más estudiados se encuentran el ácido ascórbico (vitamina C), el ácido retinóico (vitamina A) (Hayatsu *et al.*, 1988) y la clorofilina (Kato *et al.*, 1983). La Tabla 1.2 muestra diferentes mecanismos de inhibición de mutagénesis y carcinogénesis de algunos de estos compuestos.

**TABLA 1.2 Mecanismos de inhibición de la mutagénesis y carcinogénesis
(De Flora y Ramel, 1988)**

CLASIFICACIÓN	INHIBIDORES
<i>1. Inhibidores de la mutagénesis que actúan extracelularmente</i>	
1.1. Inhibiendo la ingestión de mutágenos o sus precursores.	
1.1.1. En el organismo.....	A través de lavados
1.1.2. En la célula.....	Ácidos grasos, a. aromáticas
1.2. Inhibiendo la formación de mutágenos endógenos	
1.2.1. En las reacciones de nitrosación	Ácido ascórbico, tocoferoles
1.2.2. En la flora intestinal	Fermentados
1.3. Desactivando mutágenos	
1.3.1. Por reacciones físicas corporales.....	Manteniendo el pH fisiológico en los fluidos corporales
1.3.2. Por reacciones químicas	Tioles y antioxidantes
1.3.3. Por reacciones enzimáticas	Homogeneizados de vegetales con actividad de peroxidasas.
<i>2. Inhibidores de la mutagénesis que actúan intracelularmente</i>	
2.1. Modulando el metabolismo	
2.1.1. Durante la división celular	Ácido retinóico
2.1.2. Durante la activación de promutágenos	Moduladores de las reacciones de la fase I
2.1.3. Durante los mecanismos de desintoxicación	Fenoles y tioles
2.2. Bloqueando moléculas reactivas	
2.2.1. En reacciones electrofílicas	
2.2.1.1. Por reacciones químicas	Sulfuros
2.2.1.2. Por reacciones enzimáticas	Tioles
2.2.2. Capturando oxígeno	Antioxidantes
2.2.3. Protegiendo sitios nucleofílicos del ADN	Retinóles
2.3. Modulando la duplicación y reparación del ADN	
2.3.1. Incrementando la fidelidad de la duplicación del ADN	Arsenito de sodio
2.3.2. Favoreciendo la reparación del daño al ADN.....	Cinamaldehídos y tioles

Tabla 3.1 Continuación

3. Inhibidores que actúan en procesos iniciales (células neoplásicas)	
3.1. Modulando la formación de tumores	
3.1.1. Inhibiendo efectos genotóxicos.....	Incisos 1 y 2
3.1.2. Capturando radicales libres	Antioxidantes
3.1.3. Inhibiendo la proliferación celular	Retinoles, glucocorticoides
3.1.4. Induciendo la proliferación celular	Calcio, vitamina D
3.1.5. Modulando las señales de traducción	Inhibidores de la cinasa C
3.2. Modulando la progresión de tumores	
3.2.1. Inhibiendo efectos genotóxicos	Incisos 1 y 2
3.2.2. Actuando en hormonas o factores de crecimiento.....	Tratamientos hormonales, proteasas inhibidoras
3.2.3. Actuando en el sistema inmune.....	Inmunorreguladores, anticuerpos monoclonales
3.2.4. Agentes antineoplásicos físicos, químicos o biológicos	Radiación
3.2.5. Modulando la señal de traducción	Inhibidores de la cinasa C.

1.4 ÁCIDO ASCÓRBICO

1.4.1. GENERALIDADES

El ácido ascórbico (AA) ó vitamina C, como también se le conoce, es una α -cetolactona cuya fórmula empírica es $C_6H_8O_6$ (Fig. 1.5). Es una sustancia soluble en agua. Está presente en abundancia en las frutas. Las soluciones acuosas de la vitamina C se oxidan rápidamente al contacto con el aire, mostrando así su naturaleza antioxidante.

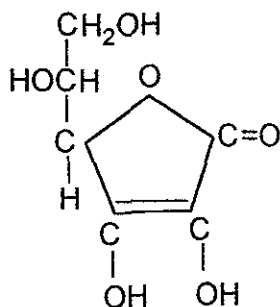


Fig. 1.5 Estructura molecular del ácido ascórbico (Shamberger, 1984)

El AA está distribuido parcialmente en todos los tejidos del cuerpo. Sus concentraciones más altas se encuentran en el tejido glandular y las más bajas en músculo y grasa. Tiene un papel activo en el metabolismo de tejidos y está relacionado con numerosos procesos en el transporte de electrones, en donde se comporta como un fuerte agente reductor (Odin, 1997).

1.4.2. ANTECEDENTES

A mediados del siglo XVIII, James Lind demostró que el jugo de frutas cítricas curaba el escorbuto. El agente activo que proporcionaba esta cura fue la forma enólica del 3-ceto-L-gulofuranolactona al que se le denominó ácido ascórbico o vitamina C que posteriormente fue aislado en 1928 por Albert Szebnt-Gyorgy (Shamberger, 1984).

Mirvish *et al.* (1972), demostraron que el ascorbato puede reducir la inducción de tumores causados por algunas nitrosaminas en animales debido a que el ascorbato inhibía la formación de compuestos N-nitrosos (NOC).

Actualmente existen distintos estudios epidemiológicos que han demostrado que el AA presenta propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas indicando una correlación negativa entre el consumo de la vitamina C y el riesgo a presentar cáncer (Chen *et al.*, 1988; Bartsch *et al.*, 1988), 1.0 g de AA más en la dieta, disminuye la presencia de alteraciones celulares en trabajadores ocupacionalmente expuestos a los HAPs y al benzeno (Sram *et al.*, 1983); También inhiben la formación endógena de nitrosoprolina (NPRO) en los fumadores (Nair *et al.*, 1986)

1.4.3. TOXICIDAD

Aunque se han demostrado los efectos preventivos y protectores del AA, se ha encontrado también que su administración a altas concentraciones provoca genotoxicidad en algunos sistemas biológicos.

- a) **Efecto en ácidos nucleicos:** Omura *et al.* (1978a) compararon el efecto del AA y dos tipos de reductones, el amino y el tiol, demostrando que estos compuestos causan escisiones en las hebras del ADN.
- b) **Efecto en bacterias:** Utilizando la prueba de Ames el AA indujo una frecuencia alta de revertantes his⁺ en *S. typhimurium* (TA100) a una concentración de 2.5 y 5 mM (Omura *et al.*, 1978b). Estos resultados concuerdan con los reportados por Ames *et al.* (1973) quienes observaron que el AA resultó ser débilmente positivo en esta misma cepa.
- c) **Efecto en células de mamíferos:** Se han observado mutaciones en el locus HGPRT en células CHO causadas por concentraciones de 2 a 5 x10⁻⁴ M de AA (Rosin *et al.*, 1980). Estas dosis fueron tóxicas también y se demostró en ese mismo experimento que cuando se añadió catalasa al AA se pudo prevenir tanto la mutagenicidad como la toxicidad del mismo. Estos resultados sugirieron que los metabolitos mutagénicos del ascorbato probablemente involucraron a los

radicales peróxidos (Stich *et al.*, 1979). También se ha observado que el AA produjo ICH en células CHO a las dosis de 10^{-4} - 10^{-2} M (Macrae y Stich, 1979)

Por otro lado, aunque en muchos estudios *in vivo* el AA inhibe la formación intragástrica de los NOC, también se ha visto que incrementa la producción endógena de NPRO en la cavidad oral de fumadores (Nair *et al.*, 1986). A un pH de 1 a 2 el AA ha mostrado acelerar la nitrosación de aminas básicas débiles como la N-metilaniлина y difenilamina, a través de la producción de ácido oxihiponitro, un poderoso agente nitrosante (Chang *et al.*, 1979).

1.4.4. EFECTOS ANTIMUTAGÉNICOS

Las propiedades anticarcinogénicas y antimutagénicas del AA han sido demostradas en diferentes organismos.

a) **En bacterias:** Se ha evidenciado que el AA previene la mutagenicidad del cromo hexavalente en cepas de *Salmonella typhimurium* (Shamberger, 1984), así como del N-nitrodimetilamina, N-nitrodietilamina, N-nitromorfolina y sus analogos N-nitrosos, N-nitrosodimetilamina y N-nitrosomorfolina. Además, disminuye alrededor del 80 al 90% la frecuencia de mutaciones producidas por el fenacetín y el acetaminofen en cepas TA100 y TA98 (Khudoley *et al.*, 1981). Se ha encontrado además un efecto radioprotector del AA a concentraciones de 0.5 M (Shamberger, 1984).

b) **En *Drosophila*:** Olvera *et al.* (1995) con la prueba SMART determinaron que el AA a las dosis de 25, 50 y 100mM reduce significativamente el efecto mutagénico y carcinogénico del trióxido de cromo VI (CrO_3) y de los rayos γ (20 Gy) cuando lo aplican en un pretratamiento de 24 h a larvas de estos organismos.

c) **En mamíferos:** Se ha detectado que la vitamina C puede inhibir en un 70% la carcinogénesis del B(a)P en células de ratas (Kallistratos y Fasske, 1980). Sus propiedades protectoras se han observado en contra de la mutagenicidad del etil metano sulfonato (EMS) en células V79 (Kuroda, 1986, 1987, 1990a; Kojima *et al.*, 1992); en contra del daño causado por el sistema xantina-xantina oxidasa (X/XO), el cual produce radicales superóxidos O_2^- .

También se han notado efectos anticarcinogénicos por la inhibición de la mitosis de células neoplásicas.

1.4.5. MECANISMOS DE ACCIÓN ANTIMUTAGÉNICA

Se han propuesto algunos mecanismos por los cuales el AA puede inhibir los efectos mutagénicos y carcinogénicos de ciertas sustancias, entre estos se encuentran:

a) **Inhibición de la formación de compuestos nitrosos:** Los nitratos presentes en la dieta son convertidos por bacterias que se localizan en el estomago en nitritos que pueden reaccionar con aminos para formar a las nitrosaminas. El AA reacciona con el nitrito a un pH ácido y lo convierte en óxido nitroso bloqueando la formación de compuestos N-nitrosos tanto *in vitro* como *in vivo*. Experimentos realizados *in vivo* en roedores y humanos usando la prueba para determinar NPRO en la excreción urinaria han confirmado las suposiciones de numerosos estudios *in vitro* en donde se ha demostrado que el ascorbato claramente inhibe la formación endógena de compuestos N-nitroso (Bartsch *et al.*, 1988).

b) **Inactivación de moléculas:** Se ha demostrado en bacterias que el AA inhibe la actividad recombinogénica de ciertos mutágenos químicos como el Dexon, captan, mitomicina C y 4-oxidonitroquinolina (Kuroda, 1987). También se ha observado que disminuye la mutagenicidad y clastogenicidad del N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina y de algunos otros compuestos N-nitrosos después de

su formación. Este efecto ha sido atribuido a la producción de peróxido de hidrógeno, conduciendo a la transformación subsecuente de los mutágenos por radicales libres (Norkus y Kuenzig, 1985).

c) **Captura de radicales libres:** Se ha considerado a la vitamina C como una molécula protectora de biopolímeros celulares, incluyendo al material genético y podría por lo tanto, proteger a las células durante las etapas de iniciación y promoción de la carcinogénesis. Este mecanismo ha explicado el efecto radioprotector en contra de los rayos γ en semillas de *Hordeum vulgare* (Shamberger, 1984).

d) **Agente antioxidante:** El AA actúa como un poderoso antioxidante biológico soluble en agua el cual es capaz de atrapar O_2 y OH (Odin, 1997). Frei *et al.* (1988) demostraron que el AA es el antioxidante más importante entre numerosos compuestos naturales bien conocidos. En general se espera que los agentes antioxidantes inhiban la mutagenicidad y carcinogenicidad a varios niveles, desde la captura de radicales libres que están involucrados en el inicio de estos procesos, por ejemplo, en la desaminación oxidante de las bases del ADN o por reacciones con la ADN-polimerasa hasta la inhibición del metabolismo de los mutágenos (De Flora y Ramel, 1988).

Algunos autores mencionan que existen otros mecanismos por los cuales el AA ejerce su efecto protector, uno de ellos es mediado indirectamente a través de la habilidad que tiene la molécula del ascorbato para generar otros agentes reductores importantes tales como los tocoferoles lipofílicos (Niki, 1987). El otro es a través de la interacción entre agentes alquilantes electrofílicos y el AA, especialmente con el anión ascorbil AH^- , actuando de la misma manera con mutágenos tanto de acción indirecta como directa (Odin, 1997).

1.5. CLOROFILINA

1.5.1. GENERALIDADES

La clorofilina (CL) es una sal de sodio y cobre derivada de la clorofila, pertenece al grupo de compuestos denominado porfirinas que contienen un ion metal quelado en el centro de la molécula (Fig. 1.6).

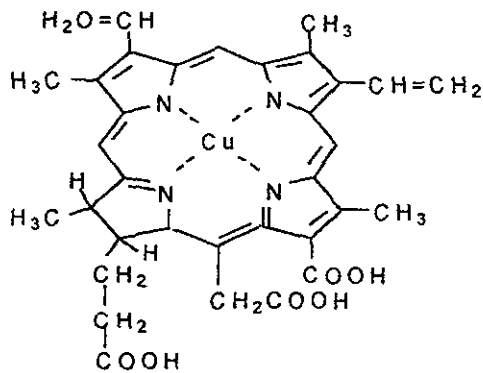


Fig. 1.6 Estructura de la clorofilina
(Hayatsu et al., 1993)

1.5.2. ANTECEDENTES

A principios de los años 40's, varios investigadores observaron la capacidad de la clorofila como agente terapéutico en la restauración de lesiones ulcerosas, ayudando a la formación de tejido epitelial y a su posterior cicatrización (Gruskin, 1940; Buergi, 1943). Tomando en cuenta esta propiedad Smith y Sano (1944) estudiaron su efecto en un cultivo de tejidos de fibroblastos para determinar si ésta posee propiedades que estimulan el crecimiento celular. Los resultados mostraron que la adición de clorofilina (0.05 a 0.5%) al medio de cultivo celular, provocó una

respuesta rápida en el crecimiento, eliminado el período de latencia, manteniendo esta capacidad de estímulo al continuar añadiéndola.

Posteriormente Lai *et al.* (1978) demostraron que un extracto acuoso de las hojas del tallo de trigo inhibió la actividad metabólica de algunos carcinógenos. Subsecuentemente algunos estudios sugirieron que la clorofila es uno de los principales componentes en este tipo de plantas.

1.5.3. TOXICIDAD

Desde principios de los años 50's se han realizado estudios en diferentes sistemas, para determinar la toxicidad de la clorofilina no encontrando ningún efecto adverso

Se han obtenido evidencias de que la CL no inhibe el crecimiento celular de *S. typhimurium* en diversos medios de cultivo (Lai, 1979; Kimm *et al.*, 1982; Ong *et al.*, 1986, 1989), ni de células Balb/3T3 cultivadas *in vitro*. Tampoco disminuye la viabilidad de *S. cerevisiae* (Bronzetti *et al.*, 1990). No induce citotoxicidad en células V79 (Kato *et al.*, 1983); tampoco disminuye la viabilidad en *Drosophila* (Negishi *et al.*, 1989); es inocua en células del epitelio colónico de ratas (Robins y Nelson, 1989), y en cultivos de *S. typhimurium* (Warner *et al.*, 1991) ni en células hepáticas de trucha arco iris (Dashwood *et al.*, 1991).

1.5.4. EFECTOS ANTIMUTAGÉNICOS

Este compuesto ha mostrado reducir o eliminar la mutagenicidad *in vitro* de diferentes mutágenos y mezclas complejas, incluyendo al B(a)P (Kato *et al.*, 1983), 2-aminoantraceno, aflatoxina B1 (AFB1) (Arimoto *et al.*, 1980a,b), productos de la pirólisis de aminoácidos (Munzner, 1981), condensado de humo de cigarro (Terwel y van der Hoeven, 1985), partículas de emisión de diesel y aeropartículas (Elías *et al.*, 1990), el pimiento negro y el vino tinto (Warner *et al.*, 1991), así como rayos γ (Zimmering *et al.*, 1990; Olvera *et al.*, 1993).

La clorofilina ha mostrado una mayor eficiencia como agente antioxidante que el retinol, β -caroteno, ácido ascórbico y α -tocoferol (Ong *et al.*, 1989). La capacidad antimutagénica de la clorofilina *in vitro* ha sido comprobada en varios sistemas *in vivo*, incluyendo la reducción de enlaces covalentes del 2-amino-3-metilimidazol-4,5-quinolina en el ADN en hígado de ratón (Dashwood, 1992), la inhibición del efecto clastogénico del cesio y del metil mercurio en ratones (Ghosh *et al.*, 1991a,b) y la disminución de enlaces de la AFB1 en el hígado de trucha (Dashwood *et al.*, 1991).

1.5.5. MECANISMOS DE ACCIÓN ANTIMUTAGÉNICA

Se ha demostrado que la clorofilina es un compuesto antioxidante, pero se desconoce el mecanismo exacto por el cual inhibe la mutagenicidad de un compuesto. Se han propuesto varios mecanismos que explican el efecto antimutagénico de la clorofilina, entre los que se encuentran la captura de radicales libres, la formación de complejos y el efecto sobre la actividad enzimática. (Shankel *et al.*, 1993).

a) Captura de radicales libres. En experimentos realizados por Hadnagy y Seemayer (1988) se observó la reducción de ICH en fagocitos polimorfonucleares causada por la clorofilina a través de la inactivación de radicales oxígeno como el O_2 , H_2O_2 y OH^\cdot involucrados en la formación de ICH y rupturas en las cadenas de ADN. Este mismo mecanismo ha sido apoyado por otros autores como Bronzetti *et al.* (1990) y Morales-Ramírez y García-Rodríguez (1994).

b) Formación de complejos. La clorofilina forma complejos moleculares cara a cara con compuestos planares actuando como capturadora de moléculas. Dashwood y Guo (1993) probaron la antimutagénesis de la clorofilina hacia diferentes aminas aromáticas heterocíclicas en *S. typhimurium*, demostrando que su efectividad depende de la dosis administrada.

Dashwood *et al.* (1991) utilizaron la unión de la AFB1 con el ADN hepático en trucha arco iris *in vivo*, y observaron que este enlace disminuyó en la dieta. Estos resultados apoyaron la idea de que la clorofilina interactuó directamente con el mutágeno reduciendo su distribución al órgano blanco. Posteriormente observaron que la co-incubación *in vitro* de clorofilina con el 2-amino-3-metilimidazol [4,5-f]-quinolina (IQ) atenúa significativamente la unión del mutágeno al ADN. Con la adición de clorofilina al medio, la absorbancia del IQ decae en el pico de 264 nm de manera dependiente de la dosis, lo cual dio evidencia de la formación de un complejo estable no covalente entre la clorofilina y el IQ (Daswood, 1992; Dashwood y Guo, 1992).

En estudios *in vitro* usando *S. typhimurium*, la clorofilina tuvo poco o ningún efecto en contra de carcinógenos de molécula no planar como los agentes alquilantes monofuncionales como la metil nitrosourea (MNU) o el EMS (Romert *et al.*, 1992).

Los trabajos de Arimoto *et al.* (1980a,b), Arimoto y Hayatsu (1989) y Negishi *et al.* (1989), también muestran que la clorofilina y ciertas porfirinas inactivan a los mutágenos por la formación de complejos, pero todavía no se conoce bien este mecanismo, por lo que es importante realizar investigaciones con otros tipos de mutágenos como los agentes alquilantes y las nitrosaminas.

c) Inhibición enzimática. Utilizando la prueba de Ames complementada con activación metabólica mediante la adición del complejo S9, Kimm *et al.* (1982) y Terwel y van der Hoeven (1985) sugirieron que la clorofilina actúa inhibiendo enzimas del citocromo P450, ya que tuvo un mayor efecto contra mutágenos indirectos que con los de acción directa. Este mecanismo ya se había propuesto anteriormente para compuestos con estructura química semejante, como la porfirina, la hemina y sus metabolitos la biliverdina y la bilirrubina (Arimoto *et al.*, 1980a,b).

Dashwood (1992) observó que la tasa del metabolismo del IQ se redujo notablemente en presencia de clorofilina. Esta interferencia en el metabolismo puede deberse a la inhibición de enzimas de activación.

Romert *et al.* (1992) encontraron que la clorofilina a bajas concentraciones, incrementó la mutagenicidad de diferentes nitrosaminas y a concentraciones altas disminuyó el número de mutaciones provocadas por la MNU y EMS en *S. typhimurium*. Estos autores sugirieron que este efecto debió ser causado por la interferencia de la clorofilina con la actividad de estos compuestos catalizada por el citocromo P450. Dashwood y Guo (1992, 1993) encontraron una inhibición similar del metabolismo del IQ *in vitro* que ocurría por la interacción directa entre la clorofilina y el IQ, sugiriendo que se une al citocromo microsómico de hígado de rata.

En otros trabajos realizados *in vivo* se ha reportado que la clorofilina afecta diferentes enzimas intra y extracelulares (Sato *et al.*, 1984). Se ha demostrado también que disminuye e inhibe la actividad de las enzimas hepáticas microsómicas que forman parte del sistema del metabolismo de drogas o genotoxinas. Entre estas enzimas se encuentran la aminopirina N-demetilasa, anilina-hidrogenasa y NADPH-citocromo c-reductasa (Imai *et al.*, 1986).

Asimismo, Kimm *et al.* (1982) y Terwel y van der Hoeven (1985) mencionan que otro de los posibles mecanismos de acción sea a través de la inactivación de mutágenos.

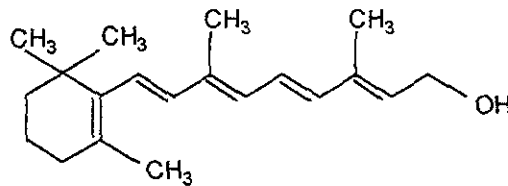
De acuerdo a lo anterior se puede decir que los mecanismos de acción antimutagénicos de la clorofilina son complejos y actúan de diferentes maneras dependiendo del compuesto mutagénico del que se trate, del bioensayo y finalmente, de la concentración empleada.

1.6. ACIDO RETINÓICO

1.6.1. GENERALIDADES

La vitamina A (retinol) y sus derivados (retinoides) son compuestos solubles en grasa y son esenciales en el crecimiento, mantenimiento de la función visual, en la reproducción y la diferenciación del tejido epitelial (Fig. 1.7).

La vitamina A ($R=CH_2OH$) cuenta con distintos metabolitos como el retinal ($R=CHO$), ácido retinóico ($R=COOH$) y sus ésteres, acetato de retinol ($R=CH_2OCOCH_3$), palmitato de retinol ($R=CH_2OCOC_{15}H_{31}$) y su provitamina A β -caroteno. Por su parte, los retinoides son compuestos sintéticos que han sido desarrollados para aplicaciones farmacéuticas.



**Fig. 1.7. Estructura química del ácido retinóico
(Love y Gudas, 1994)**

Una enzima intestinal es la responsable de convertir al β -caroteno a retinal (De Luca, 1993). El retinol está esterificado y se encuentra en el hígado como retinilpalmitato. Una enzima esterasa convierte al retinilpalmitato a retinol, el cual origina un complejo con las proteínas de unión al retinol (PUR) y es secretado a la sangre. La formación del ácido retinóico (AR) toma lugar en el tejido (Goodman, 1984)

La función de los retinoles está estrechamente regulada por la disponibilidad de varias proteínas específicas de unión a varios retinoides (Blomhoff *et al.*, 1990). Bajo condiciones normales, los retinoides se unen a estas proteínas específicas, algunas de las cuales tienen una función de transporte (p.e. PUR); otras pueden regular la concentración de retinoides libres, por ejemplo, las proteínas de unión al AR (PUAR) y otras más pueden funcionar como activadores transcripcionales (p.e. los receptores nucleares del AR (RAR α , β y γ) (De Luca, 1993)

1.6.2. ANTECEDENTES

Los retinoles están involucrados en muchas funciones fisiológicas de los organismos vivos. Una de las más importantes es en el procesamiento fotoquímico durante la percepción de la luz, además de participar en el control de la proliferación y diferenciación celular de tejidos epiteliales (Hicks, 1983). Desde que se descubrió que el cáncer es una enfermedad que involucra el desarrollo anormal del crecimiento y diferenciación celular, el AR fue uno de los primeros compuestos que se estudiaron con respecto al bloqueo del proceso carcinogénico.

Es considerado como un agente protector epitelial y puede prevenir la aparición de tumores que causan cáncer en diferentes partes del organismo (Moon *et al.* 1983), ya que inhibe el crecimiento de células tumorales (Elias y Williams, 1981).

La inducción de la diferenciación celular por el AR involucra la habilidad de esta molécula para alterar la expresión de una amplia variedad de genes. Por ejemplo, el AR afecta los niveles de hormonas peptídicas, factores de crecimiento y sus receptores, algunos tipos de enzimas, factores de transcripción y proteínas estructurales, los cuales, drásticamente alteran el estado de diferenciación de una estirpe celular en particular (Gudas *et al.*, 1994).

Existen proteínas de unión específicas al AR que se cree son las responsables del transporte del retinol y los retinoides dentro de la célula a través de la membrana

nuclear, sugiriendo que de esta manera controla la diferenciación celular. Además el AR tiene una amplia variedad de efectos en la membrana celular, como la síntesis de glicoproteínas, cambios en los receptores de las membranas los cuales influyen en la interacción célula-célula, adhesión celular y permeabilidad de la membrana (Love y Gudas, 1994).

La vitamina A y sus derivados han sido reportados como protectores contra tumores inducidos en animales de laboratorio, disminuyendo el riesgo de aparición en distintos órganos como en la piel (Bollag, 1974), hígado (Sporn, 1977) y mucosa oral (Shklar, 1982), entre otros.

Las propiedades biológicas de este compuesto parecen interferir no sólo con la promoción y el avance de un proceso carcinogénico, sino que quizá también modula los procesos de mutagénesis y carcinogénesis, inhibiendo ciertas formas de oxidasas de función mixta involucradas en el metabolismo de xenobióticos (Qin y Huang, 1985), o inhibiendo carcinógenos ligados al ADN (Weish *et al.* 1986).

1.6.3. TOXICIDAD

En un estudio realizado en células epiteliales pulmonares M3E3/C3 del criceto dorado, se demostró que el retinol indujo un incremento significativo de la frecuencia de ICH (Mohr y Emura, 1991). Este mismo efecto fue observado en cultivo de fibroblastos humanos (Tetzner *et al.*, 1980).

Varios investigadores han descrito además, un efecto de sinergismo entre el retinol y otros compuestos. Por ejemplo, en combinación con el melfalan y la cafeína, aumenta la frecuencia de ICH en cultivo de linfocitos humanos (Dozi-Vassiliades *et al.*, 1985); en presencia del complejo S9 potencia la mutagenicidad del 2-aminofluoreno y del 2-acetilaminofluoreno en la prueba de Ames (Balbinder *et al.*, 1983) y en combinación con los HAPs, acelera la formación de ICHs en células V79 (Qin *et al.*, 1985).

Algunos de estos autores establecen que la genotoxicidad de los retinoles fue mediada por el complejo S9 (Baldinger *et al.*, 1983; Qin *et al.*, 1985; Mohr y Emura, 1991) y otros más aseguran que es dependiente de la concentración de proteínas en el sistema de prueba (Tetzner *et al.*, 1980). Al parecer, es posible que el retinol por sí solo sufra una oxidación no específica (propia de su estructura de dobles ligaduras) y los productos de este proceso, tales como los epóxidos y peróxidos, entre otros, sean los responsables de los efectos genotóxicos observados.

1.6.4. ESTUDIOS ANTIMUTAGÉNICOS

Las propiedades anticarcinogénicas de los retinoles se han evidenciado en la piel, el tracto respiratorio, pecho, vejiga y tracto gastrointestinal de animales experimentales (Moon e Itri, 1984).

Los efectos de los retinoles en tumores inducidos experimentalmente en el tracto respiratorio son inconsistentes. En algunos casos los retinoles redujeron la presencia de tumores, mientras que en otros no se observó ningún efecto, sino al contrario aumentó el daño (Smith *et al.*, 1975; Stinson *et al.*, 1981; Beems, 1984). Existen varios estudios epidemiológicos que reportan una asociación inversa entre la ingestión del AR y el riesgo de cáncer en pulmón, vejiga y tracto gastrointestinal (Peto *et al.*, 1981; Ziegler, 1989)

Se ha demostrado que la vitamina A reduce las frecuencias de micronúcleos inducidos en la mucosa bucal de sujetos masticadores de tabaco (Rosin, 1990). También inhibe eficientemente el ICH y aberraciones cromosómicas en células V79 inducidas por la AFB1 y la ciclofosfamida (CFM), pero no fue efectivo en contra del benzoantraceno (BA), B(a)P, dimetil benzoantraceno (DMBA) y metilcolantreno (MCA); tampoco con los mutágenos directos, EMS y el metil nitro-nitroguanidina (MNNG) (Qin *et al.*, 1985).

En suma, existen varios estudios que determinan por un lado, la capacidad antimutagénica del AR y por otro, el efecto sinérgico que presenta con otros compuestos. Marnett (1987) sugiere que la diferencia entre éstas respuestas quizá se deba en parte, a que el AR es capaz de capturar especies de oxígeno reactivas; sin embargo, bajo ciertas condiciones, los retinoides pueden elevar la formación de radicales libres como el peroxil y el alcoxil.

Bertram *et al.* (1987) y Morse y Stoner (1993) han concluido que de todos los agentes potenciales quimiopreventivos, la vitamina A y sus análogos parecen ser los más prometedores.

1.6.5. MECANISMOS DE ACCIÓN ANTIMUTAGÉNICA

Es difícil determinar si existen mecanismos de acción antimutagénica mediante el cual el AR actúe solo o si su efecto se debe a la relación con otros compuestos. Sin embargo, se han propuesto varios mecanismos, entre los que se encuentran, la inhibición enzimática, la captura de radicales libres y la actividad antioxidante, entre otros.

a) Inhibición enzimática. Qin *et al.* (1985) demostraron la inhibición del daño producido por la AFB1 y la CFM a través del AR, sugiriendo que el probable mecanismo de acción es a través de la inhibición enzimática del citocromo P-450. Ellos se basan en el hecho de que los dos principales componentes del citocromo P-450 son el PB-P-450 (que es inducido por el fenobarbital) y el MCA-P-448 (que es inducido por el metilcolantreno) y que la AFB1 y la CFM son procarcinógenos activados por las isoenzimas del PB-P-450. Por su parte, los mutágenos B(a)P, BA, y DMBA, los cuales no fueron inhibidos por el AR, son HAPs activados principalmente por el MCA-P-448.

b) Captura de radicales oxígeno. Weitberg y Corvese (1997), demostraron el rompimiento de la doble hebra del ADN provocado por los radicales oxigenos

generados por las NAETs en células de pulmón de feto humano, este efecto fue disminuido por el AR, sugiriendo que este compuesto mediaba la cantidad de radicales libres que causaban daño, además, esta disminución se hizo más evidente conforme se aumenta la dosis del AR.

c) Agente antioxidante. El AR actúa como agente antioxidante inhibiendo la formación de aductos del ADN provocado por la AFB1 (Yu, *et al.*, 1994). Al parecer la capacidad que tiene el AR para actuar como antioxidante, es debida a su cadena poliena que sofoca los estados excitados de las moléculas, especialmente del oxígeno 1O_2 , sin embargo se requieren mas investigaciones para poder determinar este efecto (Peto *et al.*, 1981).

Aunque varios autores mencionan que de los antimutágenos naturales que se han estudiado a la fecha, el AR es uno de los más efectivos, se necesitan realizar mas investigaciones para poder determinar con claridad sus efectos protectores.

1.7. ESTUDIOS ANTIMUTAGÉNICOS FRENTE AL CHC, NNK Y NNN

Existen algunos estudios en los que se han evaluado compuestos antimutagénicos en contra del daño producido por el CHC y algunos de sus componentes.

Terwel y van der Hoeven (1985) probaron al ácido ascórbico, β -caroteno, ácido clorogénico, ácido elágico, butil hidroxianisol (BHA), clorofila a, clorofila b, clorofilina, riboflavina y tocoferol frente al CHC y el B(a)P en *S. typhimurium* mas complejo S9. La clorofilina, el ácido elágico y la riboflavina mostraron una considerable actividad antimutagénica hacia el CHC y B[a]P. De igual manera lo reportaron Ong *et al.* (1986 y 1989) y Nagabhushan y Bhide (1988). Por su parte el ácido ascórbico, BHA, el β -caroteno, el ácido clorogénico y el tocoferol tuvieron

muy poco o casi nula actividad moduladora. Estos resultados concuerdan con los realizados por Wilmer y Spit (1986).

Se ha demostrado también que el isocianato y algunos de sus análogos, disminuyen en un 50% la incidencia de tumores provocados por el NNK en ratas F344. Al parecer esta reducción se debe a la estructura similar que tienen el NNK y estos isocianatos (Chung *et al.*, 1992).

Por otra parte, también el té verde y dos de sus principales componentes, el galato de (-)-epigalocatequina (EGCG) y la cafeína mostraron ser efectivos en contra de la tumorigénesis de pulmón provocada por el NNK. Según los autores, la inhibición de estos compuestos se debe, al menos en parte, a las propiedades antioxidantes de los mismos (Xu *et al.*, 1992).

Espinosa-Aguirre *et al.* (1993) demostraron la habilidad que tiene el ciclohexanol de inhibir la mutagenicidad del NNK y de la N-nitrosodietilamina (NDEA) en *Salmonella typhimurium* TA100, encontrando una respuesta de disminución dependiente de la dosis en el número de revertantes inducidos por dosis, sugiriendo que el posible mecanismo antimutagénico del ciclohexanol es interferir con el metabolismo del NNK y NDEA tal como lo hacen algunos alcoholes como el etanol en contra de la mutagenicidad de la nitrosodimetilamina (NDMA). Esta suposición está basada en el hecho de que el ciclohexanol sólo disminuye la mutagenicidad de estas nitrosaminas de acción indirecta, pero no de compuestos de acción directa como el metil metano sulfonato (MMS) y el EMS.

Por otro lado, Romert *et al.* (1994) realizaron un estudio en el que probaron la capacidad antimutagénica de dos compuestos del selenio, el selenito de sodio y ebseleno; los flavonoides y polifenoles, ácido elágico, catequina, ácido clorogénico, escopoletina y el rutin trihidratado; algunos derivados de porfirinas como la hemina bovina, biliverdina dihidroclorada, clorofilina y extractos de plantas con un alto

contenido de clorofilina. Probaron también tres terpenoides, el β -caroteno, el retinol, y una mezcla de dos epímeros (4R) y (4S) del (1S,2E,6R,7E,11E)-cembra-2,7,11-trieno-4,6-dioles (CBD) y finalmente al ciclohexanol y ubiquinona en el ensayo de Ames en *Salmonella* con la adición de S9 en las cepas TA98 y TA100, además complementaron la información utilizando células de mamíferos V79.

Estos autores encontraron que los compuestos del selenio, los terpenoides, el ciclohexanol y la coenzima Q10, no mostraron claros efectos antimutagénicos. Por otro lado, los flavonoides y polifenoles (excepto el rutin trihidratado) manifestaron una clara actividad antimutagénica. La hemina bovina, clorofilina, los extractos de plantas, así como la escopoletina fueron los compuestos que inhibieron en un 100% los efectos mutagénicos del CHC en las dos cepas de *Salmonella*, siendo la escopoletina la que presentó resultados reproducibles en células V79.

1.8 SISTEMAS DE PRUEBA

Para realizar los estudios anteriores se cuenta con modelos animales o vegetales que implican el uso de un organismo que exhiba una respuesta genotóxica similar a la de humanos bajo condiciones de exposición comparables (Clements *et al.* 1990).

Los mamíferos han sido uno de los grupos más empleados para este tipo de pruebas, posteriormente perdieron popularidad con el descubrimiento del complejo S9 microsómico, el empleo de cultivo de células y el uso de animales pequeños de laboratorio, teniendo así nuevas alternativas para la realización de ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* (Frölich y Würigler 1991).

Los mamíferos están más relacionados fisiológicamente con el hombre, las pruebas *in vivo* pueden detectar rompimientos cromosómicos, mutaciones génicas

y no disyunción. Sin embargo, el tiempo requerido así como el costo de este tipo de estudios dificultan su realización (Victorin *et al.*, 1990).

Los microorganismos ofrecen la ventaja de poder detectar mutaciones génicas con rapidez, ser económicos y tener alta sensibilidad. Los sistemas huésped-intermediario permiten además que se realice la activación metabólica *in vivo* de algunos mutágenos, sin embargo, las conclusiones obtenidas con este sistema deben ser confirmadas en organismos pluricelulares, con metabolismo similar al del humano y en este sentido *Drosophila melanogaster* presenta algunas ventajas (Zordan *et al.*, 1991).

1.9 *Drosophila melanogaster* COMO BIOENSAYO

Entre las utilidades de este organismo como sistema de prueba está la posibilidad de mantener gran cantidad de individuos en espacios reducidos y el hecho de ser un sistema eucarionte, permite verificar la presencia de daño genético *in vivo* en un período de tiempo corto, ya que su ciclo de vida es aproximadamente de 10 días a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Ramos *et al.*, 1993). El espectro de valoración de riesgo genético que es detectado con el uso de este insecto es muy amplio (Katz y Foley, 1993).

Otra ventaja, es que *Drosophila* puede realizar la mayoría de las funciones enzimáticas que se efectúan en los microsomas del hígado humano, en donde se activan gran cantidad de los carcinógenos y mutágenos indirectos. El retículo endoplásmico es considerado el responsable del metabolismo de drogas y pesticidas en insectos; las enzimas involucradas tienen acción de oxidasas y se caracterizan por carecer de especificidad al substrato, tal como ocurre en el hígado de mamíferos (Frölich y Würigler, 1989; Guzmán-Rincón y Graf, 1995).

La importancia de la activación metabólica en la carcinogénesis radica en el hecho de que el órgano blanco es específico y cada especie susceptible puede estar determinada a través de la presencia o ausencia de vías de activación metabólica. El metabolismo de carcinógenos químicos frecuentemente involucra una oxidación inicial de dos electrones a un producto hidroxilado o epoxidado y es típicamente catalizado por el sistema del citocromo P-450. Colectivamente, las enzimas que catalizan la formación de estos reactivos intermedios son llamadas enzimas de la fase I.

El empleo de una cruz de bioactivación elevada en estos ensayos es importante por el hecho de que un componente clave para entender los eventos iniciales de la carcinogénesis fue el reconocer que muchos carcinógenos químicos *per se* no son reactivos químicamente, sino que deben experimentar activación metabólica para transformarse en sus formas electrofílicas reactivas (Miller y Miller, 1985). Estas especies reactivas pueden interactuar con grupos nucleofílicos en el ADN para inducir mutaciones puntuales y otras lesiones genéticas, guiando a la activación de proto-oncogenes e inactivación de genes supresores de tumor.

Con el objeto de resaltar la actividad de los promutágenos, Frölich y Würigler (1989 y 1991) construyeron dos nuevas líneas que incluyen genes que confieren la resistencia al DDT y que están en los cromosomas 1 y 2 de la línea Oregon R(R). Estos genes incrementan los niveles de citocromo P-450 lo que permite metabolizar mas eficientemente a los promutágenos, produciendo una mayor respuesta genotóxica debido a la actividad de esta monooxidasa (Graf y van Schaik, 1992).

1.10. LA PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICA

Las pruebas de genética toxicológica inicialmente se concentraban en la observación de mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas ya que estos cambios genéticos son considerados de gran importancia por la inducción de enfermedades heredables así como por la iniciación de algún tipo de cáncer. Fue menos conocido el impacto de la recombinación mitótica, conversión génica, amplificación génica y no disyunción.

Por esta razón es esencial contar con un ensayo genotóxico sensible, con un amplio espectro, capaz de detectar simultáneamente los cambios mutacionales clásicos así como ciertos tipos de rearrreglos dentro de los cuales se encuentra la recombinación mitótica. Además un aspecto adicional para este tipo de estudios es la posibilidad de que el ensayo se realice *in vivo*.

Uno de los bioensayos empleados para determinar la genotoxicidad de algunos tipos de sustancias, es la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) mediante la cual es posible detectar un amplio espectro de eventos genéticos como son las mutaciones, deleciones, ciertos tipos de aberraciones cromosómicas así como recombinación mitótica y conversión génica (Graf *et al.*, 1984; Würigler y Vogel, 1986; Vogel y Zijlstra, 1987).

SMART permite detectar cambios ocurridos en las células de los discos imagales de ojos y alas de los organismos adultos. Si ocurre una alteración heredable durante el proceso de diferenciación de las células de los discos, ésta dará origen a una estirpe celular con la misma característica alterada originando así un clon que podrá ser observado como una mancha en la estructura imagal correspondiente (van Schaik y Graf, 1993).

Otra de las ventajas de esta prueba es que solamente se necesita una generación de *D. melanogaster* para la obtención de resultados, permitiendo además, conocer si los compuestos evaluados tienen un efecto directo (mutágeno) o indirecto (promutágeno).

Por lo tanto, con base en los antecedentes mencionados se proponen la siguiente hipótesis y objetivos.

1.11. HIPÓTESIS

El ácido ascórbico, la clorofilina y el ácido retinóico, se han reportado como compuestos de origen natural que inhiben el daño genético causado por diversos agentes mutagénicos. Esta característica sugiere que estas sustancias podrían prevenir la mutagenicidad causada por el condensado de humo de cigarro y dos de sus componentes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General:

Valorar la capacidad antimutagénica del ácido ascórbico, ácido retinóico y clorofilina frente al daño producido por el condensado de humo de cigarro, el 4-(metilnitrosamino)-1-3-(piridil)-1-(butanona) y la N'-nitrosornicotina en larvas de las cruzas estándar y de bioactivación elevada de *Drosophila melanogaster*.

2.2. Objetivos Particulares:

Determinar el efecto genotóxico de los antimutágenos ácido ascórbico, clorofilina y ácido retinóico en larvas de *D. melanogaster* en las cruzas estándar y de bioactivación elevada.

Evaluar la actividad genotóxica del condensado de humo de cigarro y dos de sus componentes, 4-(metil nitrosamino)-1-(2-piridil)-1-butanona y la N'-nitrosornicotina en las larvas de *D. melanogaster* de ambas cruzas.

Valorar la capacidad antigenotóxica del ácido ascórbico, clorofilina y ácido retinóico frente al condensado de humo de cigarro, del 4-(metil nitrosamino)-1-(2-piridil)-1-butanona y de la N'-nitrosornicotina en las dos cruzas de *D. melanogaster*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. COMPUESTOS

El 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (CSL-92-359-5-25) y la N'-nitrosonornicotina (CSL-90-289-72-20) fueron adquiridos de Chemsyn Science Lab. E.U. El condensado de humo de cigarro fue obsequiado por la Cigarrera Monterrey y se obtuvo a través de una máquina fumadora estándar calibrada para una inhalación durante dos segundos cada minuto, en un volumen de 35 cc de etanol en condiciones ambientales de $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

El ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) (4026300127) fue adquirido de los laboratorios Merck de México; el ácido retinóico ($\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_2$) (1167687) de Roche, México y la clorofilina ($\text{C}_{34}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{Na}_3\text{MgO}_6$) (74H006) de Sigma, E.U.

3.2. BIOLÓGICOS

3.2.1. LÍNEAS EMPLEADAS

En la prueba SMART-ala se usaron las siguientes líneas:

- a) *flr*³/*TM3*, *Bd*^S
- b) *OR(R)1/OR(R)1*; *OR(R)2/OR(R)2*; *flr*³/*TM3*, *Bd*^S
- c) *mwh/mwh*

La línea "a" es portadora del marcador *flr* cuya descripción es la siguiente:

flr: "flare" (pelos en forma de flama). Se reconoce por la presencia de tricomas en forma irregular en tórax, abdomen y alas (Fig. 3.1). Se ubica a 38.8 unidades del mapa sobre el cromosoma 3 y en condición homocigota es letal, por lo tanto, para

mantener esta línea se necesita la presencia de un cromosoma balanceador con inversiones múltiples (*TM3*), que además porta el marcador dominante "Beaded serratia" (*Bd^S*), el cual permite el reconocimiento fenotípico de la línea *fir³/TM3, Bd^S* por la expresión de "serratia" (alas con bordes discontinuos). Siendo letal en condición homocigota, la línea está formada por individuos heterocigos para los marcadores *fir³* y *Bd^S* (Tabla 3.1) es decir, individuos *fir³/TM3, Bd^S* (Lindsley y Zimm, 1992).

TIPOS DE GAMETOS	<i>fir³</i>	<i>TM3, Bd^S</i>
<i>fir³</i>	<i>fir³/fir³*</i>	<i>fir³/TM3, Bd^S</i>
<i>TM3, Bd^S</i>	<i>fir³/TM3, Bd^S</i>	<i>TM3, Bd^S/TM3, Bd^S*</i>

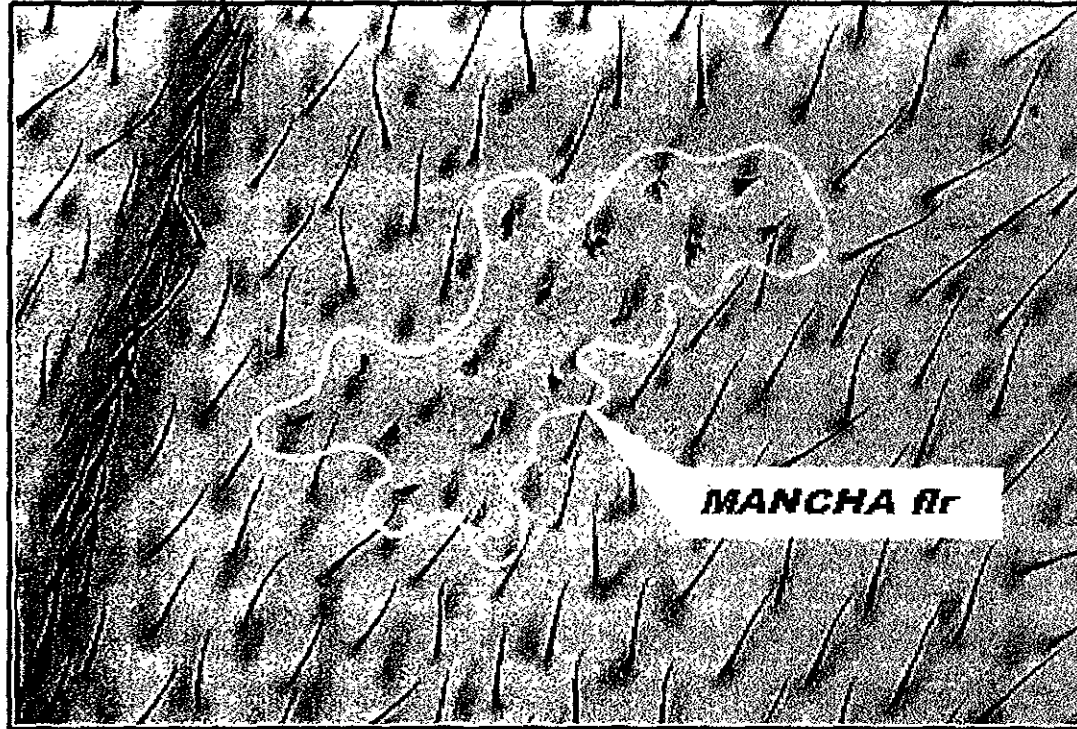
* Letal

Tabla 3.1. Esquema de letales balanceados en la cruza.

La línea "b" además de los marcadores descritos anteriormente, porta los cromosomas 1 y 2 de la línea Oregon R(R) resistente al DDT (Dapkus y Merrell, 1977) y se caracteriza por tener niveles elevados del citocromo P-450 (Hällström y Blanck, 1985). Su capacidad metabólica se debe al gen IR, ubicado en el cromosoma 2, a 65.0 unidades de mapa (Frölich y Würgler, 1989).

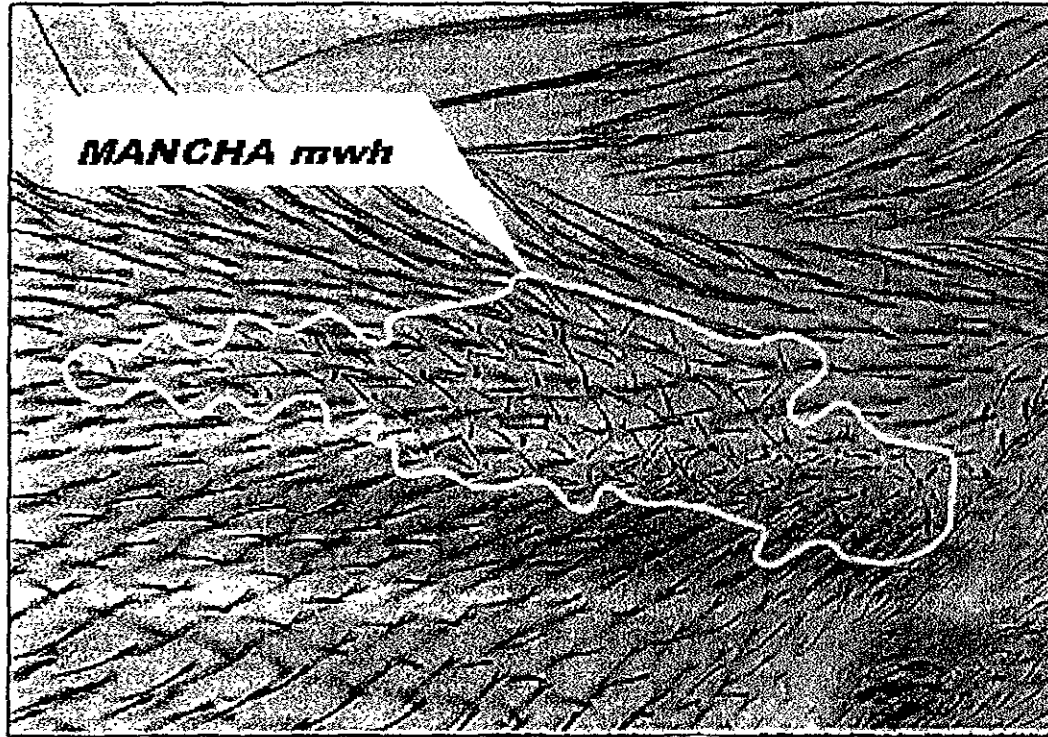
La línea "c" presenta el siguiente marcador:

mwh: "multiple wing hair" (pelos múltiples en el ala). La línea portadora de este genotipo, se reconoce fenotípicamente porque expresa una alteración en el número de tricomas por célula en el ala, llegando a presentar de 2 a 7 en lugar de 1, como sería en el fenotipo silvestre (Fig. 3.2). El incremento la cantidad de tricomas se relaciona con la reducción de la longitud y orientación normales. Este locus se localiza en el cromosoma 3 a 0.3 unidades de mapa (Lindsley y Zimm, 1990).



Fotografía cortesía del Dr. U. Graf Institute of Toxicology, ETH & University of Zurich

Fig. 3.1 Fenotipo del marcador *flr*³



Fotografía cortesía del Dr. U. Graf Institute of Toxicology, ETH & University of Zurich

Fig.3.2 Fenotipo del marcador *mwh*

3.2.2. CRUZAS REALIZADAS

- 1) ♀♀ $f1r^3/TM3, Bd^S$ x ♂♂ mwh/mwh [cruza estándar (E)]
- 2) ♀♀ $OR(R)1/OR(R)1;OR(R)2/OR(R)2; f1r^3/TM3, Bd^S$ x ♂♂ mwh/mwh [cruza de bioactivación elevada (BE)]

La cruce de bioactivación elevada fue diseñada y construida por Frölich y Würigler (1989) para mejorar la capacidad de la prueba SMART en el caso de promutágenos que se activan metabólicamente a través del citocromo P-450. Un amplio número de promutágenos han incrementado su capacidad genotóxica cuando se ha empleado esta cruce (Graf y Singer, 1992; Graf y van Schaik, 1992)

3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Es importante señalar que previamente al ensayo de valoración genotóxica a través de SMART, se debe seleccionar el protocolo adecuado, tanto para la ruta de administración como para la edad de la larva al momento de realizar el experimento de acuerdo al criterio establecido por Graf *et al.* (1992).

Realizadas las cruces, se colectaron los huevos en frascos de cultivo de 250 ml con agar y levadura durante 8 h y se incubaron a temperatura y humedad constantes hasta completar las 48 o 72 h de edad dependiendo del protocolo.

3.3.1. CONCENTRACIONES

En ensayos preliminares se realizaron pruebas para determinar la toxicidad de todos los compuestos, estableciéndose las siguientes dosis: 285 mM para el AA, 182 mM para la CL y 175 mM para el AR. Para los mutágenos las dosis seleccionadas fueron de 0.6, 1.2 y 2.4 mM para el NNK, de 7.2, 14.4 y 28.8 mM para el NNN y del 6% para el CHC.

3.3.2. TRATAMIENTOS

1. Evaluación genotóxica de los antimutágenos: se administraron pre-tratamientos a individuos de 48 h de ambas cruzas durante 24 h después de las cuales, se removieron las larvas y se colocaron en tubos homeopáticos conteniendo 0.7 g de puré de papa (pp) hidratados con 5 ml de agua destilada.

2. Evaluación genotóxica del NNK, NNN y CHC: se suministraron diferentes tratamientos crónicos a individuos de 72 h de edad de ambas cruzas, dando una dosis de nitrosamina o una dosis del CHC. El tratamiento se aplicó en tubos homeopáticos con 0.7 g de pp hidratados con 5 ml de las soluciones a probar; durante 48 h, hasta la pupación.

3. Evaluación del efecto antimutagénico del AA, CL y AR frente a la genotoxicidad del NNK, NNN y CHC (pre-tratamiento): se aplicaron a larvas de 48 h de edad de ambas cruzas, pre-tratamientos con alguno de los antimutágenos durante 24 h, posteriormente se removieron las larvas y se colocaron en tubos homeopáticos conteniendo 0.7 g de pp hidratados con 5 ml de las soluciones de los mutágenos a probar durante 48 h, hasta la pupación.

4. Evaluación antimutagénica del AA, CL y AR frente a la genotoxicidad del NNK, NNN y CHC (co-tratamiento): se administraron simultáneamente, a larvas de 72 h de edad de la craza de bioactivación elevada, los antimutágenos y los mutágenos correspondiente durante 48 h, hasta la pupación.

En todos los casos los tratamientos fueron por vía oral; los testigos negativos se realizaron en tubos homeopáticos conteniendo 0.7 g de pp hidratados con 5 ml de agua y para el caso de los testigos positivos fueron 5ml de solución con uretano a las dosis de 5, 10 y 20 mM. Los experimentos se mantuvieron a temperatura constante de 25°C y humedad relativa de 65%.

El diseño experimental está representado en la Fig. 3.3.

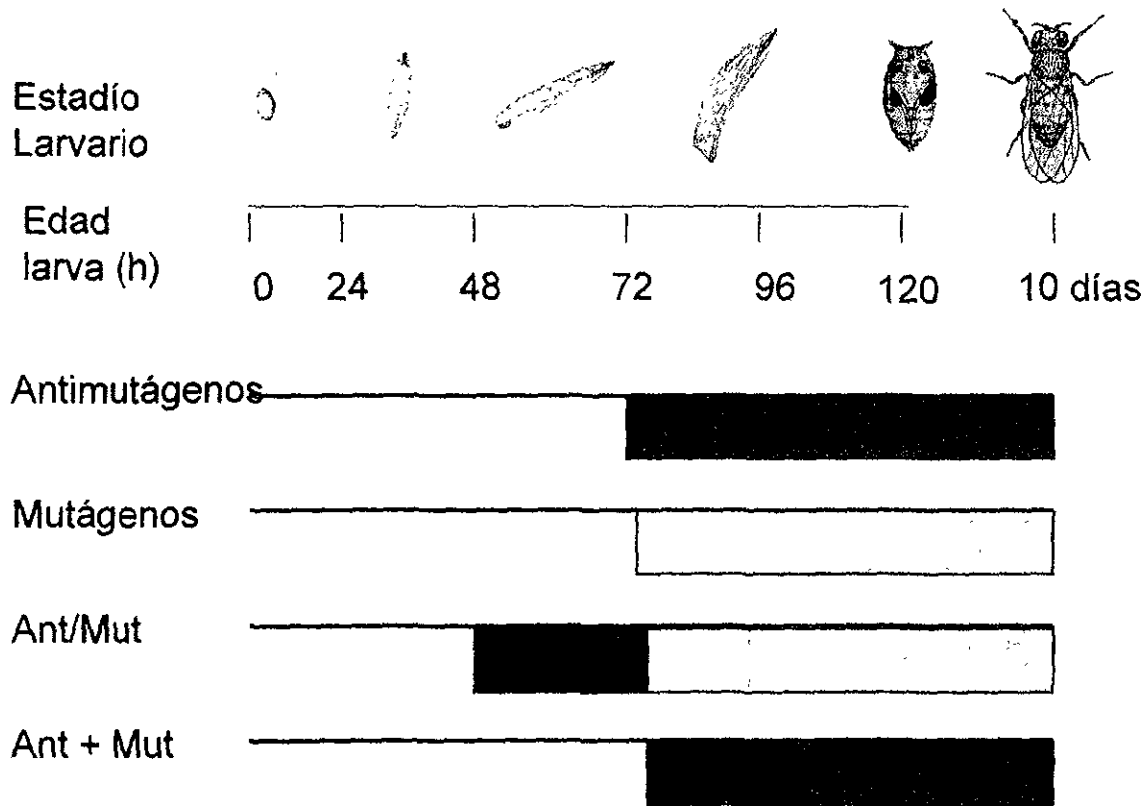


Fig.3.3. Protocolos seleccionados para la prueba SMART

3.4. PROCESAMIENTO DEL MATERIAL

Las moscas adultas que emergieron después de los tratamientos fueron colectadas y almacenadas en etanol al 70%.

Ambas cruzas, E y BE, producen dos tipos de progenie las cuales pueden distinguirse fenotípicamente por el marcador Bd^S : (1) moscas trans-heterocigotas ($mwh\ flr^+/mwh^+flr^3$, con un fenotipo de ala de tipo silvestre) y (2) moscas heterocigotas portadoras del cromosoma balanceador ($mwh\ flr^+/TM3, Bd^S$, con fenotipo de alas serratia)

Se disectaron las alas de los organismos transheterocigos y se realizaron preparaciones fijas con 40 alas (20 hembras y 20 machos) por laminilla, de acuerdo con Graf *et al.* (1984).

Se revisaron las alas a 40X y se cuantificó el número y tipo de mancha, que de acuerdo con los eventos indicados en la figura 3.4, son: simples chicas (1 a 2 células), simples grandes (> 2 células), o gemelas (si presentan los dos marcadores mutantes formando parte de la mancha mosaico). Las manchas se analizan por separado, sin embargo, se debe considerar que aunque la mayoría de los clones grandes son continuos, algunos pueden presentar interrupciones debido a la separación parcial de las células del clon durante el desarrollo, causadas por presiones tisulares o movimientos independientes. Por lo tanto, solo se contabilizan como clones independientes aquellos que se encuentren separados por tres hileras o más de tricomas normales (Würgler y Graf, 1990).

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

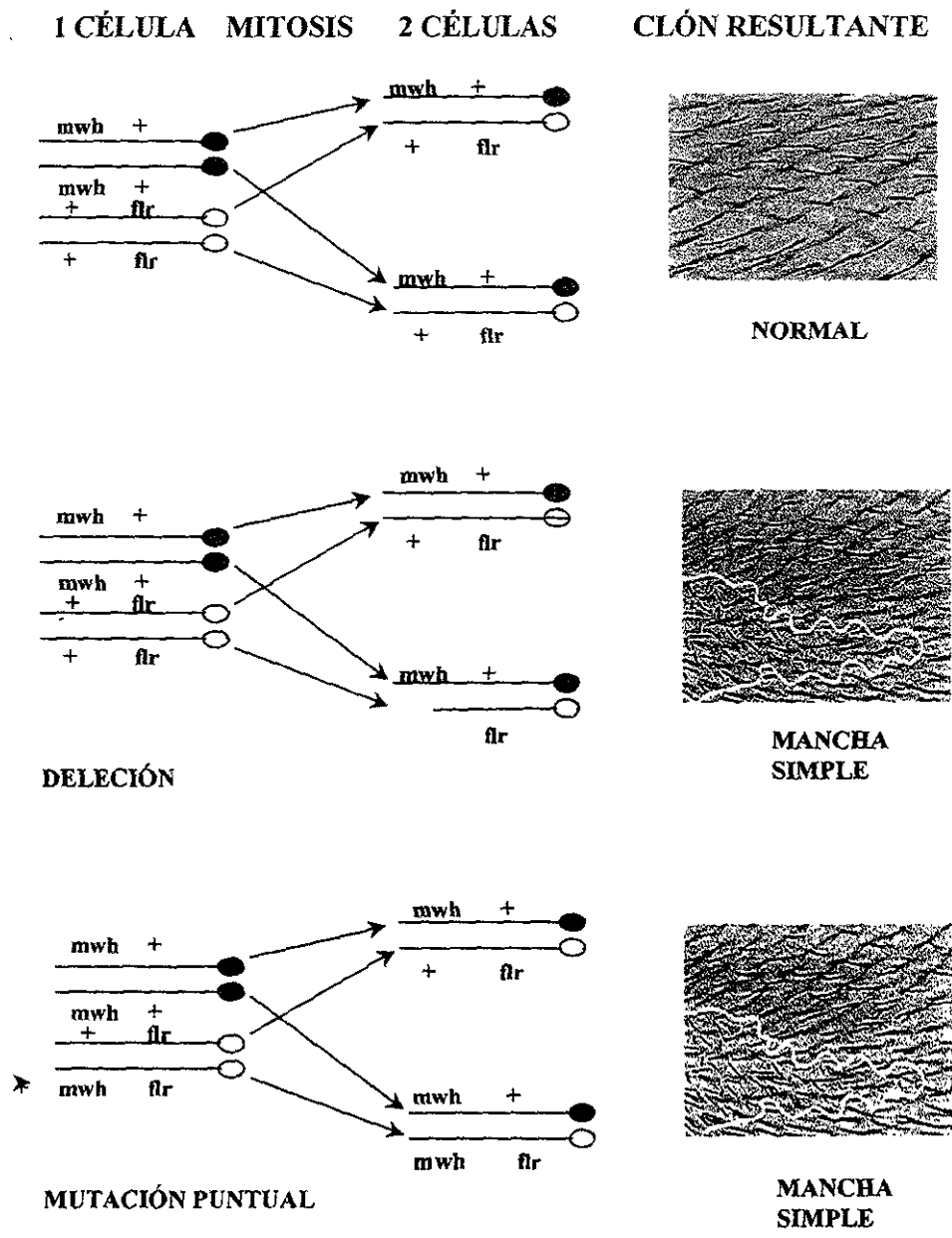
Para la evaluación de los efectos genotóxicos se compararon las frecuencias obtenidas de los grupos tratados con los testigos negativos. Para decidir si el

resultado es positivo, débil positivo, no concluyente o negativo, se utilizó un análisis de decisión múltiple (Frei y Würigler, 1988).

El procedimiento está basado en dos hipótesis: (1) la frecuencia de mutación (inducida mas espontánea) en grupos tratados no es más grande que la frecuencia de mutación en un grupo testigo y (2) La frecuencia de mutación inducida en las series tratadas no es menor que 'm' veces la observada en grupos testigos. Ambas hipótesis son probadas a un nivel de significancia del 5%. El valor de 'm' para las manchas chicas y manchas totales, que presentan una frecuencia de mutación espontánea relativamente alta, es de 2. Para las manchas grandes simples y para manchas gemelas, las cuales tienen una baja frecuencia espontánea , el valor es de 5 (Frei y Würigler, 1988).

Para evitar los resultados no concluyentes, en un diseño de prueba óptimo, deberán ser analizadas igual número de alas con un mínimo de 110 en todos los grupos experimentales (Frei y Würigler, 1994).

Para todos los tratamientos se realizaron al menos tres experimentos y se compararon los resultados obtenidos en las distintas series así como en los testigos concurrentes. En los casos en los que no existieron diferencias significativas ($p > 0.5$) se sumaron los resultados para incrementar los tamaños de muestra.



DELECIÓN

MANCHA SIMPLE

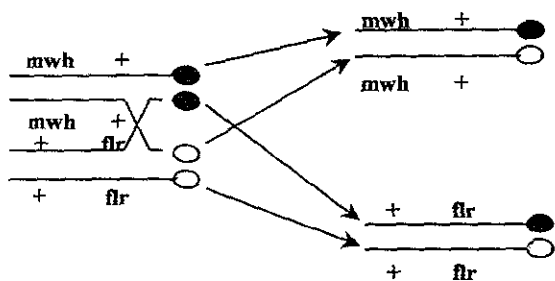
MUTACIÓN PUNTUAL

MANCHA SIMPLE

Fig. 3.4 Esquema genético ilustrando varias vías de la formación de manchas en la prueba SMART
(modificado de Graf *et al.*, 1984)

1 CÉLULA MITOSIS 2 CÉLULAS

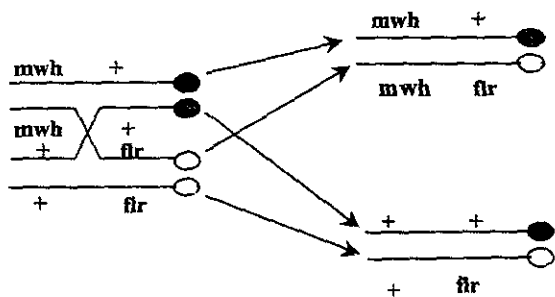
CLÓN RESULTANTE



RECOMBINACIÓN



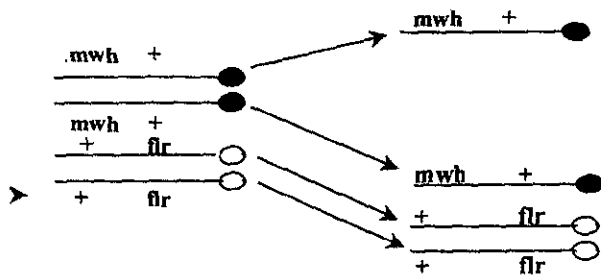
MANCHA GEMELA



RECOMBINACIÓN



MANCHA SIMPLE



NO DISYUNCIÓN



MANCHA SIMPLE

Fig. 3.4 Continuación

4. RESULTADOS

Para los pre-tratamientos se realizaron al menos 3 experimentos y se compararon los resultados obtenidos en las distintas series así como en los testigos concurrentes. Como no existían diferencias significativas ($p > 0.05$) se sumaron los resultados para incrementar los tamaños de muestras que fueron 280 y 318 alas para los testigos negativos de las cruza E y BE respectivamente. Para los grupos tratados el tamaño de muestra fue de 120 alas.

En los tratamientos simultáneos el tamaño de muestra fue de 120 para todos los grupos, tanto testigos como experimentales y solo se llevaron al cabo en la cruz BE. Esto debido a que el efecto modulador de los antimutágenos fue similar en ambas cruza por lo que se decidió utilizar solo la de bioactivación elevada en la cual, el efecto mutagénico de las NAETS fue más evidente.

4.1. EVALUACIÓN GENOTÓXICA DE LOS ANTIMUTÁGENOS

4.1.1. PRE-TRATAMIENTO

La evaluación del efecto genotóxico del AA, CL y AR en larvas de *D. melanogaster* se observa en la figura 4.1, en donde los valores de las frecuencias de manchas totales por ala fueron 0.39 para el testigo negativo; 0.38 para el AA; 0.37 para la CL y 0.37 para el AR en la cruz E y 0.46, 0.45, 0.44 y 0.45 para la de BE respectivamente.

Los antimutágenos administrados a las dosis mencionadas no ocasionaron daño tóxico o genotóxico a las larvas de ambas cruza por lo que se procedió a utilizarlas para la evaluación del efecto antimutagénico de estos compuestos frente al CHC, NNK y NNN.

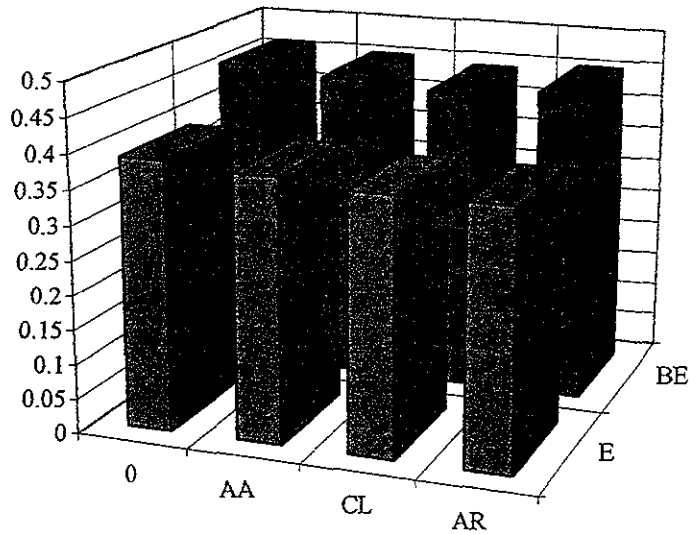


Fig. 4.1 Frecuencias totales obtenidas con los antimutágenos durante el pre-tratamiento.

4.1.2. CO-TRATAMIENTO

Cuando se realizaron los experimentos de co-tratamiento se observó que los grupos que únicamente habían sido tratados con los antimutágenos, mostraron frecuencias de manchas muy semejantes a las encontradas para los grupos equivalentes de los experimentos de pre-tratamiento, las frecuencias de manchas totales por ala fueron de 0.51, 0.45, 0.44 y 0.45 para el agua, AA, CL y AR respectivamente.

No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los resultados obtenidos para los grupos tratados con los antimutágenos y los grupos testigo.

4.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD GENOTÓXICA DEL CHC

Puesto que el CHC se administró disuelto en etanol, para la valoración del daño provocado por el mismo, se empleó como testigo negativo etanol al 6%, que fue la concentración final a la que se administró en la mezcla con el humo de cigarro.

Se compararon las frecuencias de manchas obtenidas con este testigo y las de los testigos que habían sido tratados únicamente con agua, los valores resultantes de los experimentos realizados en la cruz E fueron los siguientes: 0.39 para el agua, 0.40 para el etanol y 0.53 para el CHC. Para la cruz BE fueron de 0.46, 0.40 y 0.68 respectivamente (Fig. 4.2). De acuerdo al programa estadístico de Frei y Würgler (1988), los valores obtenidos para el CHC fueron débil positivos (w).

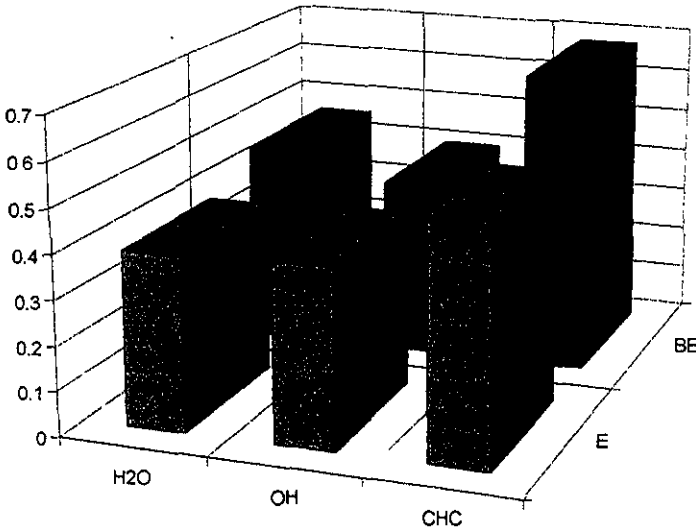


Fig. 4.2. Frecuencias de manchas totales obtenidas con el CHC en las cruces E y BE

4.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD GENOTÓXICA DEL NNK Y NNN

4.3.1. PRE-TRATAMIENTO

Al analizar los grupos tratados con NNK y NNN, se observó una clara relación dosis-respuesta de la actividad genotóxica del NNK y NNN en las larvas de ambas cruza de *D. melanogaster*, siendo más evidente en la cruza BE. En todas las dosis el resultado fue positivo (Tabla 4.1; Fig. 4.3 y 4.4).

Las frecuencias totales en la cruza E fueron de 0.39 para el testigo negativo; 0.96 para el NNK1 (0.6 mM); 1.27 para el NNK2 (1.2mM) y 2.36 para el NNK3 (2.4mM). Para la cruza BE los totales fueron: 0.46; 1.72, 2.90 y 4.51 respectivamente

Los valores para la NNN fueron de 0.39 para el agua; 0.86 para la NNN1 (7.2mM); 1.02 para la NNN2 (14.4mM) y 1.33 para la NNN3 (28.8mM). Por su parte, la cruza BE obtuvo los siguientes resultados, 0.46, 1.42, 2.43 y 3.20 respectivamente.

4.3.2. CO-TRATAMIENTO

Resultados muy semejantes se observaron cuando se analizaron las alas de los organismos que fueron tratados con estas nitrosaminas.

Los valores de las frecuencias totales fueron de 0.49 para el testigo negativo; 1.73 para el NNK1; 2.95 para el NNK2 y 4.31 para el NNK3 (Tabla 4.7).

Los valores para la NNN fueron de 0.49 para el agua; 1.54 para la dosis 1 de la NNN; 2.26 para la NNN2 y 3.07 para la dosis 3 (Tabla 4.10).

Tabla 4.1. Frecuencias de manchas obtenidas con los tratamientos (48h) con las tres dosis del NNK y NNN en las cruza estándar y de bioactivación elevada.

Compuesto	alas	chicas m=2	grandes m=5	gemelas m=5	totales m=2	manchas clon mwh	tamaño prom. del clon
Cruza Estándar							
H ₂ O	280	0.26 (73)	0.10 (29)	0.02 (6)	0.39 (108)	107	2.04
NNK (0.6mM)	120	0.45+ (54)	0.41+(49)	0.10+ (12)	0.96+ (115)	105	2.73
NNK (1.2mM)	120	0.64+ (77)	0.47+ (57)	0.15+ (18)	1.27+ (152)	138	2.55
NNK (2.4mM)	120	1.48+ (178)	0.74+ (89)	0.13+ (16)	2.36+ (283)	265	2.27
NNN (7.2mM)	120	0.43+ (51)	0.34+ (41)	0.09+ (11)	0.86+ (103)	98	2.42
NNN (14.4mM)	120	0.57+ (68)	0.37+ (44)	0.08+ (10)	1.02+ (122)	116	2.41
NNN (28.8mM)	120	0.76+ (91)	0.47+ (57)	0.10+ (12)	1.33+ (160)	150	2.38
Cruza de Bioactivación Elevada							
H ₂ O	318	0.31 (100)	0.13 (40)	0.02 (6)	0.46 (146)	144	2.01
NNK (0.6mM)	120	0.94+ (113)	0.66+ (79)	0.13+ (16)	1.72+ (208)	196	2.54
NNK (1.2mM)	120	1.61+ (193)	1.20+ (144)	0.14+ (17)	2.90+ (354)	338	2.71
NNK (2.4mM)	120	2.30+ (276)	1.87+ (225)	0.13+ (16)	4.51+ (517)	492	2.51
NNN (7.2mM)	120	0.82+ (104)	0.48+ (58)	0.07+ (8)	1.42+ (170)	156	2.32
NNN (14.4mM)	120	1.50+ (180)	0.84+ (101)	0.09+ (11)	2.43+ (292)	273	2.38
NNN (28.8mM)	120	1.98+ (238)	1.10+ (132)	0.12+ (14)	3.20+ (384)	362	2.32

Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würgler (1988).

+ = positivo; - = negativo; i = no concluyente; w = débil positivo; m = factor de multiplicación.

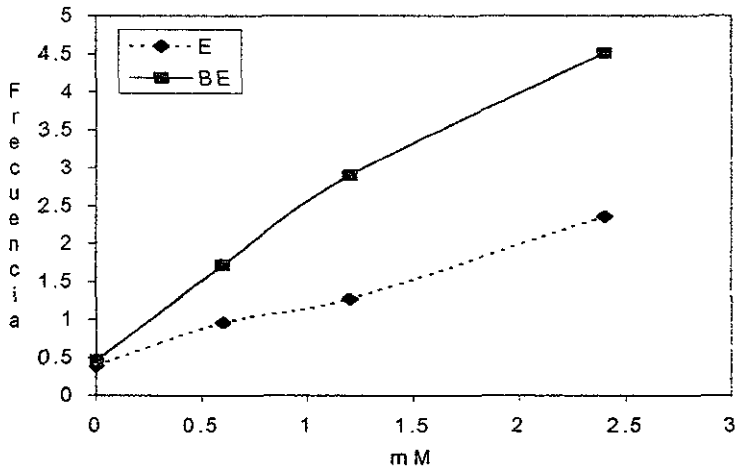


Fig. 4.3. Curva dosis-respuesta y comparación de la actividad genotóxica del NNK en ambas cruzas.

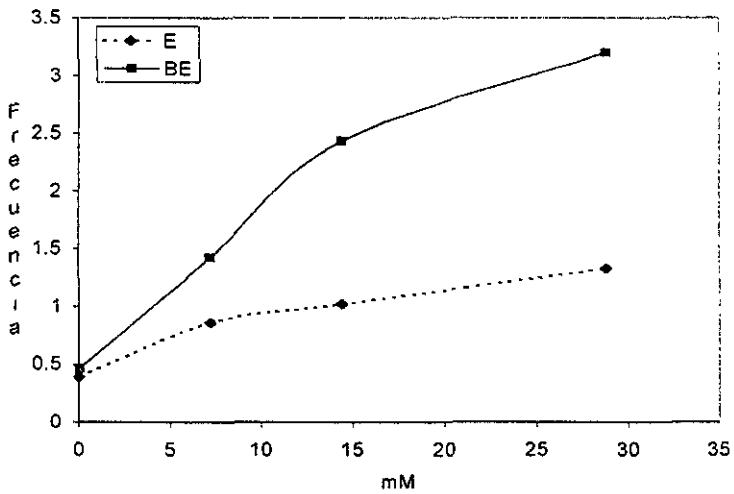


Fig. 4.4. Curva dosis-respuesta y comparación de la actividad genotóxica de la NNN en ambas cruzas.

4.4 ANÁLISIS DE LOS INDIVIDUOS PORTADORES DE INVERSIONES MÚLTIPLES EN EL CROMOSOMA III.

Ya que los diferentes tipos de manchas pueden ser originadas por distintos eventos genéticos como se mostró en la Fig. 3.4, las manchas resultantes del análisis genotóxico del CHC, NNK y NNN pudieron haberse originado por dos principales eventos: mutación y/o recombinación.

Para poder discriminar entre cada uno de estos eventos y determinar que porcentaje de mutación y recombinación generaba el daño de estos mutágenos, se procedió al análisis de las alas de los individuos portadores de inversiones múltiples en el cromosoma III, para hacer un análisis comparativo entre la frecuencia de daño en éstos y los individuos con alas de tipo silvestre (libres de inversión) (Tablas 4.2 y 4.3).

Hubo una disminución de la frecuencia de manchas inducidas que se observaron en las alas portadoras del cromosoma balanceador. En este genotipo, no se producen eventos recombinacionales debido a que el cromosoma balanceador presenta inversiones múltiples. Como el cromosoma balanceador no presenta el marcador *flr*, solo las frecuencias y tamaños de los clones *mwh* pueden ser utilizados para la comparación cuantitativa de los efectos observados en los dos genotipos. Estos datos se muestran también en las tablas 4.2 y 4.3.

En adición a la reducción en la frecuencia de clones *mwh* en las alas portadoras del balanceador comparados con las alas de los individuos que no lo presentan, se observa una disminución del tamaño promedio del clon.

Por otro lado, se realizó el análisis de la regresión lineal para cada uno de los compuestos en ambas cruzas y se compararon con las regresiones lineales obtenidas de las frecuencias totales de las alas de los individuos libres de inversión (Fig. 4.5a y b). La comparación de las pendientes (m) de las curvas nos da una

proporción estimada del porcentaje de recombinación de la genotoxicidad total inducida por los mutágenos.

Para el NNK en la cruce estándar, los valores fueron $m=0.751$ para las frecuencias de manchas totales en las alas de tipo silvestre y $m=0.1886$ para las de tipo serratia. Por otro lado, la cruce BE presento los siguientes valores, $m=1.5943$ y $m=0.2819$ para las alas de tipo silvestre y serratia respectivamente. Por lo tanto, los valores de la tasa de recombinación para el NNK en la cruce estándar fue de 63% y para la cruce BE de 88%.

Por lo que respecta a la NNN, en la cruce estándar los valores obtenidos fueron $m=0.0282$ para los individuos que no presentan el cromosoma balanceador y $m=0.0150$ para los que sí lo presentan. Por su parte la cruce de bioactivación elevada mostró los siguientes resultados, $m=0.0889$ y $m=0.0227$ para los mismos individuos respectivamente. Tomando en cuenta estos valores, el porcentaje de recombinación en la cruce E fue de 47% y para la BE de 75%.

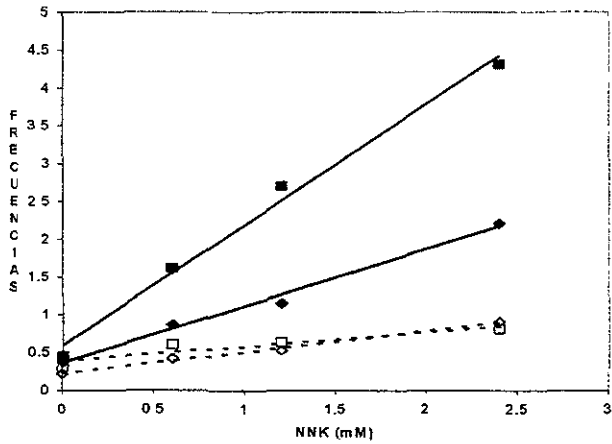


Fig. 4.5a

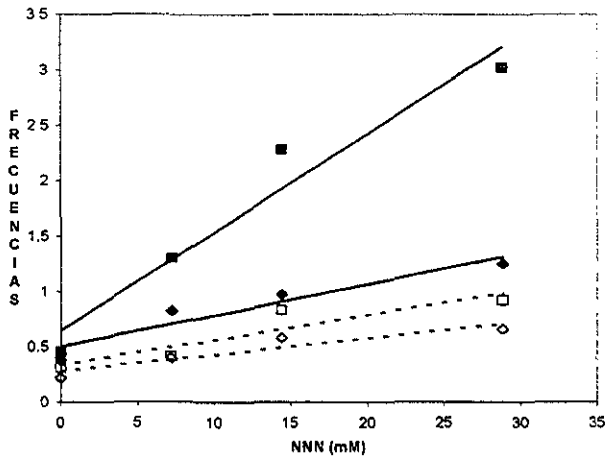


Fig. 4.5b

Fig. 4.5a y b. Análisis de la regresión lineal de la relación dosis respuesta del NNK y NNN en ambas cruzas de *Drosophila melanogaster*

■Cruza de BE: frecuencias de los individuos con marcador heterocigoto; □ frecuencia de los individuos con el cromosoma balaceador.

◆Cruza E, frecuencias de los individuos con marcador heterocigoto; ◇ frecuencias de los individuos con el cromosoma balaceador.

En todos los casos el valor de R fue mayor de 0.92.

Tabla 4.2. Tabla comparativa de los valores obtenidos entre los individuos con alas normales y los individuos con alas de tipo serratia durante los tratamientos con el NNK y NNN en la cruce estándar.

Com-Puesto	ALAS NORMALES				ALAS SERRATIA			
	alas	manchas con el clon <i>mwh</i>	clones <i>mwh</i> por ala	tamaño prom. clon	alas	manchas con el clon <i>mwh</i>	clones <i>mwh</i> por ala	tamaño prom. clon
(mM)	(N)	(n)	(n/N)	(1)	(N)	(n)	(n/N)	(1)
H ₂ O	280	107	0.38	2.04	120	27	0.22	1.96
NNK1 (0.6)	120	105	0.87	2.73	2.0	50	0.42	2.16
NNK2 (1.2)	120	138	1.15	2.55	120	64	0.53	2.11
NNK3 (2.4)	120	265	2.21	2.27	120	109	0.91	1.67
NNN1 (7.2)	120	98	0.82	2.42	120	48	0.40	2.06
NNN2 (14.4)	120	116	0.97	2.41	120	70	0.58	2.16
NNN3 (28.8)	120	150	1.25	2.38	120	80	0.66	2.06
CHC (6%)	120	62	0.52	2.23	120	31	0.26	2.10

Tabla 4.3. Tabla comparativa de los valores obtenidos entre los individuos con alas normales y los individuos con alas de tipo serratia durante los tratamientos con el NNK y NNN en la cruz de bioactivación elevada.

Com- puesto	ALAS NORMALES				ALAS SERRATIA			
	alas	Manchas con el clon <i>mwh</i>	clones <i>mwh</i> por ala	tamaño prom. clon	alas	manchas con el clon <i>mwh</i>	clones <i>mwh</i> por ala	tamaño prom. clon
(mM)	(N)	(n)	(n/N)	(1)	(N)	(n)	(n/N)	(1)
H ₂ O	318	144	0.45	2.01	120	37	0.31	2.05
NNK1 (0.6)	120	194	1.62	2.38	120	71	0.60	2.25
NNK2 (1.2)	120	324	2.70	2.61	120	77	0.64	2.45
NNK3 (2.4)	120	517	4.31	2.56	120	98	0.81	2.40
NNN1 (7.2)	120	156	1.3	2.32	120	49	0.41	2.10
NNN2 (14.4)	120	273	2.28	2.38	120	100	0.83	2.3
NNN3 (28.8)	120	362	3.02	2.32	120	111	0.92	2.15
CHC (6%)	120	81	0.66	2.46	120	43	0.36	2.51

4.5. EVALUACIÓN ANTIGENOTÓXICA DEL AA, CL Y AR FRENTE AL CHC.

4.5.1. PRE-TRATAMIENTO

En la Tabla 4.4 se pueden apreciar los valores obtenidos con los antimutágenos previos a la adición del CHC. Como se puede observar, en ninguno de los casos y en ninguna de las cruzas hubo efecto protector de los moduladores. Para la crusa estándar las frecuencias fueron de 0.40, 0.53, 0.49, 0.57 y 0.54 para el OH, CHC, AA, CL y AR respectivamente, siendo el AA el que reportó un resultado negativo con respecto al grupo testigo.

Tabla 4.4. Frecuencias de manchas obtenidas con los pre-tratamientos (24h) con los antimutágenos y tratamiento (48h) con el condensado de humo de cigarro (6%) en las cruzas estándar y de bioactivación elevada.

Compuesto	alas	chicas m=2	grandes m=5	gemelas m=5	totales m=2	manchas clon mwh	tamaño prom. del clon
Cruza Estándar							
CHC	120	0.32 (39)	0.15 (18)	0.06 (7)	0.53 (64)	62	2.23
AA/CHC	120	0.31- (37)	0.13- (16)	0.05- (6)	0.49- (59)	55	2.07
CL/CHC	120	0.35- (45)	0.17- (20)	0.06- (7)	0.57- (69)	68	2.21
AR/CHC	120	0.35- (42)	0.14- (17)	0.05- (6)	0.54- (65)	63	1.87
Cruza de Bioactivación Elevada							
CHC	120	0.37 (45)	0.20 (32)	0.04 (5)	0.68 (82)	81	2.46
AA/CHC	120	0.42- (50)	0.16- (19)	0.00- (5)	0.62- (74)	74	1.95
CL/CHC	120	0.38- (46)	0.2- (25)	0.05- (6)	0.64 (77)	77	2.14
AR/CHC	120	0.33- (40)	0.17- (20)	0.01- (1)	0.51- (61)	61	2.08

Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würigler (1988).

+ = positivo, - = negativo; i = no concluyente; w = débil positivo; m = factor de multiplicación. AA (282mM), CL (182mM), AR (175mM)

4.6. EVALUACIÓN ANTIGENOTÓXICA DEL AA, CL Y AR FRENTE AL NNK

4.6.1. PRE-TRATAMIENTO

Después de exponer a las larvas con las vitaminas y la clorofilina previo al tratamiento con los mutágenos, se observó que la frecuencia de manchas totales inducidas por las nitrosaminas no disminuyó en ninguno de los casos como se puede notar en la Tabla 4.5. Tampoco se observaron diferencias significativas entre los tamaños promedios de clones inducidos.

Tabla 4.5. Frecuencias de manchas obtenidas con los pre-tratamientos (24h) con los antimutágenos y tratamiento (48h) con las tres dosis del NNK en la cruce estándar.

Compuesto	alas	chicas m=2	grandes m=5	gemelas m=5	totales m=2	manchas Clon mwh	tamaño prom. del clon
NNK (0.6mM)	120	0.45 (54)	0.41 (49)	0.10 (12)	0.96 (115)	105	2.73
AA/NNK	120	0.49- (59)	0.39- (47)	0.12- (14)	1.00- (120)	114	2.57
CL/NNK	120	0.37- (45)	0.35- (42)	0.10- (12)	0.82- (99)	91	2.68
AR/NNK	120	0.41- (49)	0.36- (43)	0.08- (9)	0.84- (101)	94	2.80
NNK (1.2mM)	120	0.64 (77)	0.47 (57)	0.15 (18)	1.27 (152)	138	2.55
AA/NNK	120	0.66- (79)	0.37- (45)	0.14- (17)	1.17- (141)	130	2.49
CL/NNK	120	0.60- (72)	0.40- (48)	0.08- (10)	1.08- (130)	118	2.49
AR/NNK	120	0.66- (79)	0.41- (49)	0.13- (16)	1.20- (144)	134	2.58
NNK (2.4mM)	120	1.48 (178)	0.74 (89)	0.13 (16)	2.36 (283)	265	2.27
AA/NNK	120	1.54- (185)	0.66- (79)	0.12- (15)	2.32- (279)	262	2.20
CL/NNK	120	1.50- (180)	0.72- (86)	0.12- (14)	2.33- (280)	264	2.26
AR/NNK	120	1.48- (178)	0.64- (77)	0.11- (13)	2.23- (268)	253	2.25

Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würgler (1988)

+ = positivo; - = negativo; i = no concluyente; w = débil positivo; m = factor de multiplicación.
AA (282mM), CL (182mM), AR (175mM)

Por su parte, los resultados de la valoración antimutagénica del AA, CL y AR en la cruz BE se muestran en la Tabla 4.6 en donde se puede observar que no hubo efecto protector de los mismos en contra del daño causado por las nitrosaminas específicas del tabaco, obteniéndose en todos los casos una respuesta genotóxica similar a la de los mutágenos solos.

Tabla 4.6. Frecuencias de manchas obtenidas con los pre-tratamientos (24h) con los antimutágenos y tratamiento (48h) con las tres dosis del NNK en la cruz de bioactivación elevada.

Compuesto	alas	chicas m=2	grandes m=5	gemelas m=5	totales m=2	manchas clon mwh	tamaño prom. del clon
NNK (0.6mM)	120	0.98 (118)	0.62 (75)	0.11 (13)	1.72 (206)	194	2.38
AA/NNK	120	0.98- (118)	0.66- (79)	0.12- (15)	1.77- (212)	200	2.65
CL/NNK	120	0.97- (116)	0.65- (78)	0.10- (12)	1.72- (206)	193	2.59
AR/NNK	120	0.95- (114)	0.58- (70)	0.09- (11)	1.62- (195)	183	2.55
NNK (1.2mM)	120	1.65 (198)	1.12 (135)	0.12 (15)	2.90 (348)	324	2.61
AA/NNK	120	1.56- (187)	1.10- (132)	0.12- (14)	2.78- (333)	309	2.64
CL/NNK	120	1.62- (194)	1.07- (128)	0.10- (12)	2.78- (334)	311	2.57
AR/NNK	120	1.64- (197)	1.01- (121)	0.11- (13)	2.76- (331)	309	2.53
NNK (2.4mM)	120	2.32 (278)	2.05 (246)	0.14 (17)	4.51 (541)	517	2.56
AA/NNK	120	2.35- (282)	2.01- (241)	0.12- (15)	4.48- (538)	514	2.54
CL/NNK	120	2.30- (276)	1.90- (228)	0.12- (14)	4.32- (518)	496	2.53
AR/NNK	120	2.27- (272)	1.98- (237)	0.12- (15)	4.37- (524)	500	2.54

Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988).

+ = positivo; - = negativo; i = no concluyente; w = débil positivo; m = factor de multiplicación AA (282mM), CL (182mM), AR (175mM)

4.6.2. CO-TRATAMIENTO

Estos resultados mostraron una respuesta similar a los obtenidos en el pre-tratamiento, es decir, las frecuencias de manchas obtenidas en los grupos en los que se administraron los co-tratamientos con AR, CL y AR no fueron significativamente diferentes de aquellos en los que se habían aplicado únicamente los mutágenos, sin embargo, las frecuencias de manchas siempre fueron mayores en los grupos tratados exclusivamente con los mutágenos que en los grupos que habían recibido tratamiento con los antimutágenos (Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Frecuencias de manchas obtenidas en el tratamientos simultáneo con los antimutágenos y las tres dosis del NNK en la cruza de bioactivación elevada.

Compuesto	alas	chicas m=2	grandes m=5	gemelas m=5	totales m=2	manchas clon mwh	tamaño prom. del clon
NNK (0.6mM)	120	0.94 (113)	0.66 (79)	0.13 (16)	1.73 (208)	196	2.54
AA/NNK	120	0.82- (99)	0.50- (60)	0.08- (10)	1.41- (169)	163	2.50
CL/NNK	120	0.76- (91)	0.41- (49)	0.08- (9)	1.24- (149)	144	2.40
AR/NNK	120	0.76- (91)	0.45- (54)	0.07- (8)	1.27- (153)	148	2.44
NNK (1.2mM)	120	1.61 (193)	1.20 (144)	0.14 (17)	2.95 (354)	338	2.71
AA/NNK	120	1.44- (173)	0.98- (117)	0.11- (13)	2.53- (303)	293	2.55
CL/NNK	120	1.36- (163)	0.94- (113)	0.10- (12)	2.40- (288)	277	2.58
AR/NNK	120	1.33- (160)	0.86- (103)	0.07- (8)	2.26- (271)	259	2.53
NNK (2.4mM)	120	2.30 (276)	1.87 (225)	0.13 (16)	4.31 (517)	492	2.51
AA/NNK	120	2.17- (260)	1.58- (140)	0.09- (11)	3.84- (461)	441	2.45
CL/NNK	120	2.00- (240)	1.62- (195)	0.10- (12)	3.72- (447)	428	2.51
AR/NNK	120	1.99- (239)	1.68- (202)	0.12- (14)	3.79- (455)	438	2.53

Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988).

+ = positivo; - = negativo, i = no concluyente; w= débil positivo; m = factor de multiplicación. AA (282mM), CL (182mM), AR (175mM)

4.7 EVALUACIÓN ANTIGENOTÓXICA DEL AA, CL Y AR FRENTE AL NNN

4.7.1. PRE-TRATAMIENTO

Las frecuencias de manchas producidas por la NNN en la cruz E fueron estadísticamente positivas con respecto al grupo testigo. Las frecuencias encontradas en los grupos pretratados con AA, CL y AR y tratadas con la nitrosamina fueron muy similares a las anteriores. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos tratados solo con la NNN y los tratados previamente con los antimutágenos (Tabla 4.8).

Tabla 4.8. Frecuencias de manchas obtenidas con los pre-tratamientos (24h) con los antimutágenos y tratamiento (48h) con las tres dosis de NNN en la cruz estándar.

Compuesto	alas	chicas m=2	grandes m=5	gemelas m=5	totales m=2	manchas clon mwh	tamaño prom. del clon
NNN (7.2mM)	120	0.43 (51)	0.34 (41)	0.09 (11)	0.86 (103)	98	2.42
AA/NNN	120	0.39- (47)	0.27- (32)	0.08- (9)	0.73- (88)	84	2.27
CL/NNN	120	0.43- (51)	0.22- (26)	0.08- (9)	0.72- (86)	81	2.42
AR/NNN	120	0.39- (47)	0.34- (41)	0.08- (9)	0.82- (98)	93	2.42
NNN (14.4mM)	120	0.57 (68)	0.37 (44)	0.08 (10)	1.02 (122)	116	2.41
AA/NNN	120	0.45- (54)	0.37- (44)	0.10- (12)	0.92- (110)	106	2.42
CL/NNN	120	0.57- (69)	0.40- (48)	0.08- (9)	1.05- (126)	114	2.55
AR/NNN	120	0.49- (59)	0.34- (41)	0.08- (10)	0.92- (110)	101	2.62
NNN (28.8mM)	120	0.76 (91)	0.47 (57)	0.10 (12)	1.33 (160)	150	2.38
AA/NNN	120	0.61- (73)	0.42- (50)	0.11- (13)	1.13- (136)	129	2.66
CL/NNN	120	0.69- (83)	0.47- (57)	0.09- (11)	1.26- (151)	141	2.50
AR/NNN	120	0.65- (78)	0.44- (53)	0.08- (9)	1.17- (140)	130	2.49

Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würigler (1988).

+ = positivo; - = negativo; i = no concluyente; w= débil positivo; m = factor de multiplicación.
AA (282mM), CL (182mM), AR (175mM)

Los experimentos con la cruz BE mostraron un incremento significativo en la frecuencia de todos los tipos de manchas, sin embargo, los antimutágenos presentaron un comportamiento semejante al observado en la cruz estándar, es decir, no hubo diferencias significativas entre el grupo tratado con la NNN y los tratados previamente con los antimutágenos. Al igual que en todos los casos anteriores el tamaño promedio del clon así como las manchas con los clones *mwh*, no mostraron diferencias entre los diferentes grupos (Tabla 4.9)

Tabla 4.9. Frecuencias de manchas obtenidas con los pre-tratamientos (24h) con los antimutágenos y tratamiento (48h) con las tres dosis de NNN en la cruz de bioactivación elevada.

Compuesto	alas	chicas m=2	grandes m=5	gemelas m=5	totales m=2	manchas clon <i>mwh</i>	tamaño prom. del clon
NNN (7.2mM)	120	0.82 (104)	0.48 (58)	0.07 (8)	1.42 (170)	156	2.32
AA/NNN	120	0.83- (100)	0.50- (60)	0.08- (10)	1.42- (170)	162	2.56
CL/NNN	120	0.86- (103)	0.50- (60)	0.06- (7)	1.42- (170)	163	2.44
AR/NNN	120	0.83- (100)	0.44- (53)	0.06- (7)	1.33- (160)	153	2.39
NNN (14.4mM)	120	1.50 (180)	0.84 (101)	0.09 (11)	2.43 (292)	273	2.38
AA/NNN	120	1.51- (181)	0.82- (98)	0.08- (9)	2.40- (288)	271	2.34
CL/NNN	120	1.52- (182)	0.83- (100)	0.08- (9)	2.42- (291)	274	2.32
AR/NNN	120	1.44- (173)	0.77- (93)	0.07- (8)	2.28- (274)	259	2.36
NNN (28.8mM)	120	1.98 (238)	1.10 (132)	0.12 (14)	3.20 (384)	362	2.32
AA/NNN	120	1.93- (232)	1.07- (128)	0.11- (13)	3.11- (373)	351	2.32
CL/NNN	120	1.95- (234)	1.08- (129)	0.10- (12)	3.12- (375)	353	2.33
AR/NNN	120	1.92- (230)	1.03- (124)	0.08- (10)	3.03- (364)	343	2.30

Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würigler (1988).

+ = positivo; - = negativo; i = no concluyente; w = débil positivo; m = factor de multiplicación.
AA (282mM), CL (182mM), AR (175mM)

4.7.2. CO-TRATAMIENTO

Al comparar los datos de las frecuencias para todos los tipos de manchas, se observó, al igual que en los casos anteriores, que no existe una diferencia significativa entre los grupos experimentales. La frecuencia de manchas totales por ala obtenidas en los grupos tratados únicamente con la NNN son prácticamente las mismas que las encontradas en los grupos en los que se había aplicado el co-tratamiento con los antimutágenos (Tabla 4.10).

Tabla 4.10. Frecuencias de manchas obtenidas en el tratamiento simultáneo con los antimutágenos y tratamiento con las tres dosis de NNN en la cruz de bioactivación elevada.

Compuesto	alas	chicas m=2	grandes m=5	gemelas m=5	totales m=2	manchas clon mwf	tamaño prom. del clon
NNN (7.2mM)	120	0.92 (110)	0.55 (66)	0.08 (9)	1.54 (185)	171	2.45
AA/NNN	120	0.74- (89)	0.46- (55)	0.10- (12)	1.30- (156)	150	2.45
CL/NNN	120	0.81- (97)	0.54- (65)	0.09- (11)	1.44- (173)	167	2.43
AR/NNN	120	0.73- (88)	0.48- (58)	0.08- (10)	1.30- (156)	150	2.44
NNN (14.4mM)	120	1.39 (167)	0.73 (88)	0.13 (16)	2.26 (271)	253	2.42
AA/NNN	120	1.30- (156)	0.68- (72)	0.07- (8)	2.05- (246)	230	2.36
CL/NNN	120	1.30- (156)	0.67- (80)	0.08- (9)	2.04- (245)	229	2.35
AR/NNN	120	1.20- (144)	0.65- (78)	0.08- (9)	1.92- (231)	215	2.39
NNN (28.8mM)	120	1.86 (223)	1.11 (133)	0.10 (12)	3.07 (368)	348	2.37
AA/NNN	120	1.88- (226)	0.98- (117)	0.10- (12)	2.96- (355)	336	2.24
CL/NNN	120	1.84- (221)	0.95- (114)	0.12- (15)	2.92- (350)	332	2.24
AR/NNN	120	1.73- (207)	0.94- (113)	0.12- (15)	2.79- (335)	316	2.29

Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würigler (1988).

+ = positivo; - = negativo; i = no concluyente; w = débil positivo, m = factor de multiplicación
AA (282mM), CL (182mM), AR (175mM)

5. DISCUSIÓN

5.1. CONDENSADO DE HUMO DE CIGARRO

Los efectos producidos por agentes xenobióticos en los seres vivos son diversos y de complejidad variable, debido a que están involucrados múltiples aspectos como las propiedades fisicoquímicas de los compuestos, su solubilidad en agua y su estabilidad química en el ambiente, así como las interacciones con otras sustancias existentes.

La mayoría de los seres humanos estamos expuestos de manera directa o indirecta al humo de cigarro y de acuerdo a la susceptibilidad individual esta mezcla compleja puede inducir la transformación celular que finalmente conllevaría al origen de un cáncer. La carcinogenicidad del humo de cigarro quizá se deba a las diferencias en la composición de sus productos, como lo sugirió Jansson *et al.* (1991). Además de que la concentración de compuestos genotóxicos y carcinógenos conocidos en el humo de distintos tipos de cigarro puede variar hasta por un factor de cien como lo demostraron Hoffmann *et al.* (1991) y Hoffmann y Hecht (1990).

Estudios realizados en *Salmonella*, evidenciaron que existen algunos aspectos que afectan la mutagenicidad del CHC (Kier *et al.* 1974); éstos van, desde la especie de tabaco del que se obtienen los extractos, hasta el sistema de prueba en el que se analicen, incluyendo estudios en los que se demuestra que las porciones básicas de los componentes del CHC son más mutagénicas que las neutrales y en los que se menciona que el CHC extraído de las hojas jóvenes de la planta son más mutagénicas que las obtenidas de las hojas viejas y que los extractos de las plantas con una alta concentración de azúcares tiene una mayor actividad mutagénica que las de menor concentración (Mizusaki *et al.* 1977a). Estos estudios determinan que la capacidad del CHC para inducir mutaciones depende

de varios factores en los que se incluye también la temperatura a la que se almacena el condensado antes de realizar el experimento (Mizusaki *et al.*, 1977b).

En el presente trabajo no fue posible observar un claro efecto genotóxico del CHC, debido a que sólo se utilizó una dosis (6%), ya que en cantidades menores no se detectó efecto y a mayores (7% y 8%) provocó la muerte de más del 90% de las moscas. Es muy probable que la poca claridad en la respuesta mutagénica del compuesto, se deba a su toxicidad. Cabe mencionar que el humo de cigarro tiene como vía principal de acceso al organismo, la inhalación y la vía que se utilizó en este trabajo fue la ingestión, lo que pudo ser un factor importante que contribuyó a modular la naturaleza de los efectos provocados, ya que de acuerdo con la ruta de ingreso del xenobiótico, éste debe atravesar una serie de barreras que en combinación con las propiedades particulares del compuesto, restringen o facilitan su entrada y así provocar o no efectos adversos.

Pero, aunque no se obtuvo un claro efecto genotóxico, se pudieron observar algunos daños teratogénicos expresados fenotípicamente como menor talla en los organismos adultos, falta de coloración en el cuerpo y malformaciones en las venas de las alas.

Al respecto, numerosos estudios epidemiológicos apoyan el hecho de que el humo de cigarro produce efectos teratogénicos. Pirani (1978) mostró en un estudio realizado en 5200 embarazos, que hubo un incremento significativo de mortalidad perinatal de los hijos cuyos padres fumaban más de 10 cigarrillos por día. Por otro lado, Kelsey *et al.* (1978) demostraron que una mujer que fumaba más de 20 cigarrillos por día durante el embarazo, tenía un mayor riesgo de que el producto del embarazo presentara malformaciones congénitas si se comparaba con el de las mujeres no fumadoras, además este efecto se incrementaba cuando se trataba de anomalías en el tubo digestivo válvulas cardíacas y piel; incluyendo defectos en el tubo neural y anomalías cromosómicas.

5.2. NNK y NNN

El interés especial por el estudio de estas nitrosaminas fue el hecho de que éstas se forman a partir de la combustión del tabaco y se originan de aminas reactivas con el nitrito u óxido de nitrógeno, prevaleciendo en el ambiente, afectando tanto a los fumadores activos como a los pasivos.

En la presente tesis, se pudo evidenciar un claro efecto genotóxico dosis-respuesta de estos productos. Al parecer, el NNK ejerce sus efectos carcinogénicos por la formación de aductos en el ADN. La presencia de los cuales conduce a errores en la replicación del ADN y a la mutación génica.

Como sucede con otras nitrosaminas, la hidroxilación del carbón- α adyacente al grupo funcional de la nitrosamina guía la formación de un diazohidróxido alquilante y a un aldehído. Ya que el NNK es una nitrosamina asimétrica, la hidroxilación del carbón- α lleva a la formación de dos agentes altamente alquilantes. La oxidación del átomo de carbón metil genera una especie metilante mientras que la hidroxilación produce un agente piridiloxobutilante. El agente metilante reacciona con el ADN para formar dos aductos bien caracterizados como el 7-metil-deoxiguanosina y el O⁶-metildeoxiguanosina (Peterson *et al.*, 1991).

Aunque algunos de los efectos biológicos de estas bases metiladas han sido caracterizadas, la naturaleza química y los efectos biológicos de la piridiloxobutilación del ADN no están muy bien establecidos.

Se sabe que la metilación del ADN causada por el NNK induce cáncer de pulmón y se sugiere que la piridiloxobutilación puede provocar otros tipos de tumores. La preferencia entre estas dos vías metabólicas que sigue el NNK, depende de varios factores como la especie, órgano blanco y tipo celular, entre otros. El efecto genotóxico de la NNN depende de mecanismos similares, sin embargo los metabolitos formados no son tan potentes como los del NNK, produciendo un

menor daño. Tanto el NNK como la NNN tienen sitios específicos en donde sus metabolitos interactúan (Foiles et al., 1992b).

En este trabajo se observó que la administración de las nitrosaminas a las larvas incrementó principalmente la frecuencia de manchas chicas con las tres dosis, este hecho podría indicar que los mutágenos tuvieron un efecto tardío al afectar los discos imagales, ya que una vez ocurrido el daño, las células de los discos imagales solo se dividieron durante uno o dos ciclos celulares, dando como resultado este tipo de mancha. Aunque no se descarta la posibilidad de que las nitrosaminas provoquen muerte celular o retraso mitótico. Por otro lado, el incremento de manchas gemelas ocasionadas por el NNK y NNN indicaron un efecto recombinogénico.

La recombinación mitótica no es un simple mecanismo de ruptura y reunión de fragmentos de ADN, sino es un proceso celular esencial catalizado por enzimas específicas que las células codifican y regulan para este propósito. La recombinación no solamente provee variación genética, las enzimas que intervienen en este proceso permiten a las células restituir las secuencias perdidas o modificadas cuando el ADN es dañado por errores en la duplicación o por agentes físicos y químicos, reemplazando las secuencias alteradas por las correspondientes a la cadena que intervino en la recombinación (Lewin, 1994).

De esta manera, uno de los significados biológicos de la recombinación es el de funcionar como un mecanismo de tolerancia del ADN celular al daño inducido por diferentes agentes, sin embargo, actualmente la genética molecular a través de técnicas de amplificación de mini y micro satélites del ADN ha asociado algunas enfermedades de origen genético entre las que se encuentra el cáncer, con algunos eventos de recombinación.

Dada la posición de los marcadores en el cromosoma 3 utilizado para la prueba de mutación y recombinación somáticas en *Drosophila*, hubo dos posibilidades de que

se llevara al cabo la recombinación; 1) en la región del cromosoma entre *flr*³ y el centrómero y 2) entre los marcadores *mwh* y *flr*³. La primera dará origen a manchas con los dos tipos celulares (manchas gemelas) y la segunda generará dos células hijas, una de las cuales es homocigota para el marcador distal *mwh* y producirá una mancha simple *mwh*, mientras que la otra célula, tendrá un fenotipo normal. De esta manera una parte de las manchas *mwh* son el resultado de eventos como la mutación puntual y deleción, mientras que otro grupo será resultado de recombinación.

Con la finalidad de determinar el porcentaje de recombinación inducido por cada uno de los mutágenos, se analizaron las alas de los individuos *flr*³/*TM3*,*Bd*^S. Los resultados obtenidos mostraron que tanto el NNK como el NNN presentaron una mayor tasa de recombinación que de mutación. Al respecto se puede decir que el daño provocado por estas nitrosaminas específicas de tabaco se lleva a cabo a través de distintos tipos de mutación como son la mutación puntual, la deleción y la no disyunción.

El tamaño de mancha, por su parte, proporciona información acerca de la orientación del tiempo en el que se indujo la formación del clon mutante. Clones inducidos en el desarrollo temprano producen manchas de gran tamaño y aquellos que surgen hacia el final del mismo, son de tamaño pequeño y, en general, se han asociado con la biotransformación mediante el metabolismo de la larva. En el lote testigo, el tamaño promedio de clon se encuentra alrededor de 2 divisiones celulares, por lo que es probable que la mayoría de las manchas de origen espontáneo se produzcan al final del desarrollo cuando el número de células en los discos imagales es mayor, aunque no se descarta también, que éstas manchas sean reparadas a lo largo del desarrollo y únicamente se recobren aquellas que ocurren hacia el final de éste, o que el daño ocasionado a las células sea tan grande que ya no le permita dividirse. Esto se puede comprobar al cuantificar el tamaño promedio del clon en los lotes experimentales que fueron muy similares (Tablas 4.5-4.10).

Como ya se mencionó, estas nitrosaminas son mutágenos indirectos por lo que necesitan de activación metabólica para poder ejercer sus efectos genotóxicos. Al hacer uso de dos distintas cepas de *Drosophila melanogaster*, una estándar y una de bioactivación elevada se pretendió observar el efecto indirecto de estos compuestos, además de poder comparar la diferencia cuantitativa del daño que producen estos mutágenos en las distintas actividades metabólicas.

En las dos cruza se obtuvieron resultados positivos por lo que se puede decir que aún la baja actividad metabólica que presenta la cruza estándar es suficiente para que se pueda llevar a cabo la transformación metabólica del NNK y NNN y ejercer así sus efectos genotóxicos, Al respecto, Frei *et al.*(1992) demostraron que la cruza E es capaz de detectar la genotoxicidad de 15 clases de aminas policíclicas. Sin embargo, cabe mencionar que la actividad mutagénica de las nitrosaminas es mucho más evidente en la cruza de bioactivación elevada.

La eficiencia metabólica de la cruza BE ya se ha puesto de manifiesto evaluando compuestos recombinogénicos en *Drosophila* (Ribeiro *et al.*, 1997), estos autores llevaron al cabo la evaluación genotóxica de la integerrimina, una fitotoxina detectada en una gran variedad de plantas, en las mismas cruza de *Drosophila* y encontraron que ambas activan la transformación metabólica de esos compuestos, siendo más evidente, sin lugar a dudas, en la cruza de bioactivación elevada

Existen además numerosos trabajos realizados en *Drosophila* en donde se observan estas diferencias en las respuestas genotóxicas de ambas cruza. Pacella *et al.* (sin publicar), evaluando la genotoxicidad de 5 aflatoxinas, encontraron que los efectos de estos compuestos fueron mucho mayor en la cruza BE que en la E. Así mismo, Guzmán-Rincón *et al.* (1998) encontraron una mayor frecuencia de manchas totales por ala provocadas por el nitrito de sodio, metil urea y con la mezcla de ambos en la cruza de bioactivación elevada que en la cruza estándar.

5.3. ANTIMUTAGÉNESIS

Morse y Stoner (1993) sugirieron que un agente antimutagénico quimiopreventivo debe tener 5 cualidades que son: (i) poco o ningún efecto secundario; (ii) alta eficacia; (iii) capacidad de administrarse oralmente; (iv) un mecanismo de acción conocido y (v) ser accesible al consumo (bajo costo).

Los antimutágenos probados en este trabajo cumplen con cuatro de estos criterios, sin embargo esto no garantizó el efecto protector de los mismos. Como se reportó en los resultados, con ningún compuesto y en ninguna de las cruces se pudo observar un efecto protector o de disminución del daño provocado por el CHC, NNK y NNN, a pesar de que ya se ha comprobado a través de SMART los efectos protectores de la clorofilina (Negishi *et al.*, 1989; Rodríguez-Arnaiz y Zimmering, 1989 y Zimmering *et al.*, 1990) y del ácido ascórbico (Olvera *et al.*, 1995)

La falta de protección de los compuestos naturales puede deberse a muchos aspectos. 1) que las dosis de antimutágenos que se emplearon para evaluar el efecto protector no fueron suficientemente altas para evitar el daño ocasionado por los mutágenos, sin embargo, dosis mayores a las utilizadas fueron tóxicas al organismo, además estas concentraciones son, si no más altas, similares a las descritas por otros autores que han encontrado efectos protectores en otros ensayos de antimutagenicidad (Hayatsu *et al.*, 1988; Zimmering *et al.*, 1990; Olvera *et al.*, 1995 y Guzmán-Rincón *et al.*, 1998); 2) que los compuestos protectores hayan sido absorbidos más rápido que los mutágenos y, por ende, 3) que no hayan interactuado al mismo tiempo las moléculas protectoras y los metabolitos generados por los mutágenos

Uno de los objetivos de este trabajo de tesis fue evaluar el efecto protector del AA, CL y AR frente al CHC, NNK y NNN, el cual se había planteado para analizar esos

efectos siguiendo el protocolo de pre-tratamiento, sin embargo, al observar los resultados negativos de la protección de los antimutágenos, se planteó realizar experimentos llevando a cabo un tratamiento simultáneo, ya que se pensó que era muy probable que la falta de protección de estos compuestos se debía a que las larvas los metabolizaban rápidamente y 24 horas después, al adicionar los mutágenos, ya no habían suficiente moléculas para interactuar con las nitrosaminas y el CHC.

Al llevar al cabo los tratamientos simultáneos bajo las mismas condiciones que los anteriores, se esperaba que al interactuar al mismo tiempo antimutágenos-mutágenos se llevara al cabo el bloqueo de moléculas que producen el daño, sin embargo no fue así, los resultados fueron semejantes a los obtenidos de los pre-tratamientos, aunque se observó una ligera disminución de la genotoxicidad provocada por el NNK y NNN, esta diferencia no fue significativa. Estos resultados sugieren lo siguiente: que aunque ya se ha comprobado el efecto antimutagénico del ácido ascórbico, de la clorofilina y del ácido retinóico en diferentes sistemas de prueba y a distintas dosis, éste efecto protector depende de varios factores entre los que se encuentran además de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos, características intrínsecas de los organismos como: edad, sexo, estado de salud o enfermedad, sus antecedentes genéticos y la susceptibilidad individual entre otros, además de la duración e intensidad de la exposición de los compuestos.

Sin embargo, de acuerdo a los distintos protocolos de evaluación antimutagénica en el ensayo SMART, así como del efecto del metabolismo en relación con la ruta de administración, los protocolos seleccionados fueron los adecuados para la administración y exposición de antimutágenos y mutágenos químicos indirectos (Graf *et al.*, 1998).

Shankel y Clarke (1990), y Waters *et al.* (1990) han propuesto considerar los ensayos de "combinación quimiopreventiva", esto es, que los compuestos

necesitarían ser complementados por un agente antioxidante. Dicho en otras palabras, ellos sugieren un tratamiento con dos o tres antimutágenos en lugar de uno solo, y con esto, poder obtener mejores resultados antimutagénicos, sin embargo, se incrementarían las variables y parámetros a considerar además de un análisis más completo y complejo para entender el efecto de sinergismo causado por estos compuestos. Aún así, se está considerando para posteriores ensayos antimutagénicos de estos compuestos *versus* las nitrosaminas el poder establecer una relación que permita trabajar en este sentido.

5.4. EL BIOENSAYO SMART

Desde que Muller en 1972 desarrolló la prueba de transmutación artificial de un gen, se han desarrollado aproximadamente alrededor de 200 tipos de pruebas que detectan anormalidades cromosómicas así como mutaciones génicas y sus efectos relacionados (Waters *et al.*, 1988). El propósito original de estas pruebas era el desarrollar ensayos de corta duración que permitieran evaluar el daño genético provocado por cierto tipo de mutágenos. Estas pruebas día a día se han incrementado y han abarcado también un campo mayor al de sus propósitos iniciales, es decir, muchas de ellas se están utilizando para evaluar también algunos efectos antimutagénicos.

Con estas pruebas se ha evaluado tanto la capacidad mutagénica del humo de cigarro y de sus compuestos así como la habilidad protectora de ciertas sustancias (principalmente de origen natural) en contra de estos mutágenos, obteniendo diferentes respuestas.

El ensayo SMART ha demostrado ser sensible al evaluar la genotoxicidad de mas de 300 compuestos (Frei y Graf, sin publicar). Se compararon los resultados obtenidos de 122 compuestos en la prueba de letales recesivos ligados al sexo en células germinales de *Drosophila*, y se encontró una correlación del 76% (92/122) entre estas dos pruebas. Mas aún, de 143 productos químicos que han mostrados

sus efectos carcinogénicos en animales de laboratorio, se obtuvo una correlación del 82% (117/143). Estos datos indican que la prueba SMART es un ensayo apropiado para evaluar efectos genotóxicos *in vivo* (Guzmán-Rincón y Graf, 1995). Otro aspecto importante del bioensayo SMART es el hecho de que la prueba detecta compuestos xenobióticos que requieren activación metabólica a través de la cruzada desarrollada por Frölich y Würigler (1989)

Por otro lado, es una prueba validada para evaluar tanto compuestos mutagénicos como antimutagénicos. Desde que Negishi *et al.* (1989) publicaron el primer reporte de la antimutagenicidad de la clorofilina a través de la prueba SMART, numerosos estudios se han venido desarrollando con el mismo ensayo.

Los resultados genotóxicos obtenidos con el CHC, NNK y NNN en este trabajo de tesis, son similares a los reportados en la bibliografía para otros sistemas como *Salmonella* (Espinosa-Aguirre *et al.*, 1993), ratas (Zhu *et al.*, 1991), ratones (Hecht *et al.*, 1990), linfocitos humanos y células del criseto dorado (Zimonjic *et al.*, 1989).

El hecho de manejar como un grupo total, todos los experimentos independientes y de observar que los resultados obtenidos con los diferentes protocolos de pre-tratamientos y co-tratamientos fueron semejantes, son evidencia de la alta reproducibilidad del ensayo y del sistema.

Con base en todo lo anterior, los objetivos de esta tesis se cumplieron llevando al cabo toda la parte experimental propuesta inicialmente, demostrando el efecto genotóxico del CHC, NNK y NNN, así como de los efectos inocuos de los antimutágenos, aunque nuestra hipótesis con respecto al efecto antimutagénico de los compuestos naturales no fue positivo. Sin embargo, las perspectivas de este trabajo contemplan el uso de la combinación quimiopreventiva de los antimutágenos empleados, sugerida por Shankel y Clarke (1990), estableciendo los protocolos adecuados para el manejo de las variables y parámetros, así como del análisis de los efectos sinérgicos causados por los moduladores.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos permiten concluir los siguientes puntos:

- 1.- El CHC a la dosis empleada, resultó ser débil positivo de acuerdo al análisis estadístico de Frei y Würigler.
- 2.- Se demostraron los efectos mutagénicos del NNK y NNN, en ambas cruzas de *Drosophila*.
- 3.- Se observó una clara relación dosis respuesta del NNK y NNN en ambas cruzas, siendo más evidente en la de bioactivación elevada.
- 4.- El NNK fue significativamente más mutagénico que el NNN.
- 5.- El evento genético observado en las células de las larvas tratadas tanto con el NNK como con la NNN, fue principalmente la recombinación.
- 6.- Los antimutágenos no produjeron daño genético a las células de las larvas tratadas.
- 7 - No se pudo demostrar un claro efecto antimutagénico del ácido ascórbico, la clorofilina ni del ácido retinóico.
- 8.- A través de bioensayo SMART se observó una vez más la capacidad que tienen estas nitrosaminas específicas del tabaco de provocar daño celular, además de evidenciar que estos compuestos necesitan activación metabólica para producirlo.

**ESTA TESIS NO DEBE
SER DE LA BIBLIOTECA** 70

7. REFERENCIAS

- Abraham, S. K., S. Lakshmi y P.C. Desavan (1994) Role of chlorophyllin as an in vivo anticalcagen. Protective against gamma-radiation and chemical clastogens. *Mutation Res.*, 322:209-212.
- Alaoui-Jamali, M.A., A. Castonguay y H.M. Schuller (1988) In vitro genotoxicity of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone activated by hamster maternal and fetal tissues. *Carcinogenesis*, 9:2319-2324.
- Alaoui-Jamali, M.A., G. Rossignol, H.M. Schuller y A. Castonguay (1989) Transplacental genotoxicity of a tobacco-specific N-nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, in Syrian golden hamster. *Mutation Res.*, 223:65-72.
- Ames, B., W. Durston, E. Yamasaki y P. 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.
- Arimoto, S., Y. Ohara, T. Namba, T. Negishi y H. Hayatsu (1980a) Inhibition of the mutagenicity of amino acid pyrolysis products by hemin and other biological pyrrole pigments. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 92: 662-668.
- Arimoto, S., T. Negishi y H. Hayatsu (1980b) Inhibitory effect of hemin on the mutagenic activities of carcinogens. *Cancer Lett.*, 11:29-33.
- Arimoto, S. y H. Hayatsu (1989) Role of Lumin in the inhibition of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido 4,3 b: Indole (Trp-P-2) and other aminoazaarenes. *Mutation Res.*, 213:217-226.
- Balansky, R.M., P.M. Blagoeva y Z.I. Mircheva (1987) Investigation of the mutagenic activity of tobacco smoke. *Mutation Res.*, 188:13-19.
- Balansky, R.M. y P.M. Blagoeva (1989) Tobacco smoke induced clastogenicity in mouse fetuses and in newborn mice. *Mutation Res.*, 223:1-6.
- Baldiner, E., S.M. Stick y O.K. Sharma (1983) Complex effects of retinol on the metabolic activation of 2-aminofluorene. *Environ. Mutagen.* 5:665-678.
- Bartecchi, C.E., T.D. Mackenzie y R.W. Scherier (1995) The global tobacco epidemic. *Scientific American*, 272:28-32.
- Bartsch, H., H. Oshima y B. Pignatelli (1988) Inhibitors of endogenous nitrosation. Mechanisms and implications in human cancer prevention. *Mutation Res.*, 202:307-324.
- Beems, R.B. (1984) Modifying effect of Vitamin A on benzo[a]pyrene-induced respiratory tract tumours in hamsters. *Carcinogenesis*, 5:1057-1060.

- Belinsky, A.A., C.M. White, J.A. Boucheron, F.C. Richardson, J.A. Swenberg y M.W. Anderson (1986) Accumulation and persistence of DNA adducts in respiratory tissue of rats following multiple administrations of the tobacco specific carcinogen 4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res.*, 46:1280-1284.
- Belinsky, S.A., M.E. Dolan, C.M. White, R.R. Maronpot, A.E. Pegg y M.W. Anderson (1988) Cell specific differences in O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase activity and removal of O⁶-methylguanine in rat pulmonary cells. *Carcinogenesis*, 9:2053-2058.
- Benedict, W.F., A. Benerjee, K.K. Kangalingam, D.R. Dansie, R.E. Kouri y C.J. Henry (1984) Increased sister chromatid exchange in bone-marrow cells to exposed to whole cigarette smoke. *Mutation Res.*, 136:73-80.
- Bertram, J.S., L.N. Kolonel y F.L.J. Meyskens (1987) Retinol and strategies for chemoprevention of cancer in humans. *Cancer Res.*, 47: 3012-3031.
- Blomhoff, R., M.H. Green, T. Berg y K.R. Norum (1990) Transport and storage of vitamin A. *Science*, 250:399-404.
- Bollag, W. (1974) Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals: A Review. *J. Cancer*, 10:731-737.
- Boone, C.W., G.J. Kelloff y W.E. Malone (1990) Identification of candidate cancer chemopreventive agents and their evaluation in animal models and human clinical trials: A review. *Cancer Res.*, 50:2-9.
- Bronzetti, G., A. Galli, y C. Della Croce (1990) Antimutagenic effect of chlorophyllin. En: *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II*. U. Kuroda, D.M. Shankel, y M.D. Waters (Eds). Plenum Press Nueva York, pp 463-468.
- Brooks, P. (1977) Mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Res.*, 39:257-284.
- Brunnemann, K.D., B. Prokopczyk, D. Hoffmann, J. Nair, H. Ohshima y H. Bartsch (1986) Laboratory Studies on oral cancer and smokeless tobacco. En *Mechanisms in Tobacco Carcinogenesis*. Banbury Repor 23, Cold Spring Harbor Lab. pp 197-214.
- Buerger, E. (1943) Porphyrins in the healing of wounds. *J.A.M.A.* 121:1237-1943.
- Castonguay, A., H. Tjälve y S.S. Hecht (1983) Tissue distribution of the tobacco - specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and its metabolites in F344 rats. *Cancer Res.*, 43:630-636.
- Clements, J., D. Howe, A. Lowry y M. Phillips (1990) The effects of range of anti-cancer drugs in the white-ivory somatic mutation test in *Drosophila*. *Mutation Res.*, 174:275-277.

- Curvall, M., I. Florin y T. Jansson (1982) Mutagenicity of some indoles and related compounds in the Ames test. *Toxicology*, 23:1-10.
- Chang, S.K., G.W. Harrington, M. Rothstein, W.A. Shergalis, D. Swern y S.K. Vohra (1979) Accelerating effect of ascorbate acid on N-nitrosamine formation and nitrosation by oxyhyponitrite. *Cancer Res.*, 39:3671-3674.
- Chen, C.B., S.S. Hecht y D. Hoffmann (1978) Metabolic α -hydroxylation on the tobacco specific carcinogen, N-nitrosornicotine. *Cancer Res.*, 38:3639-3645.
- Chen, L.H., G.A. Boissonneault y H.P. Glauert (1988) Vitamin C, vitamin E and cancer (Review). *Anticancer Res.*, 8:739-748.
- Chung, F.L., M.A. Morse y K.I. Eklind (1992) New potential chemopreventive agents for lung carcinogenesis of tobacco-specific nitrosamine. *Cancer Res.* 52(Suppl):2719s-2722.
- Dapkus, J. y D.J. Merrell (1977) Chromosomal analysis of DDT resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 87:685-697.
- Dashwood, R. H., V. Breinholt y G. Bailey (1991) Chemopreventive properties of chlorophyllin inhibition of aflatoxin B1 (AFB1) DNA binding *in vivo* and antimutagenic activity against AFTB1 and two heterocyclic amines in the *Salmonella* mutagenicity assay. *Carcinogenesis*, 12:939-942.
- Dashwood, R.H. (1992) Protection by chlorophyllin against the covalent binding of 2-amino-3-methylimidazol-4, 5-f:Quinoline (IQ) to rat liver DNA. *Carcinogenesis*, 13:113-118.
- Dashwood, R.H. y D. Guo (1992) Inhibition of 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f]quinoline (IQ)-DNA binding by chlorophyllin: studies of enzyme inhibition and molecular complex formation. *Carcinogenesis*, 13: 1121-1126.
- Dashwood, R., D. Guo (1993) Antimutagenic potency of chlorophyllin in *Salmonella* assay and its correlation with binding constants of mutagen-inhibitor complexes. *Environ. Mol. Mutagen.*, 22:164-171.
- De Flora, S. y C. Ramel (1988) Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis classification and overview. *Mutation Res.*, 202:285-306.
- De Luca, L.M. (1993) Multiple mechanisms: The example of Vitamin A. En: *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms III*. G. Bronzetti, *et al.* (Eds). Plenum Press, Nueva York, pp. 17-25.
- DeMarini, D. (1983) Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate. *Mutation Res.*, 114:59-89.
- Díaz Oliveros, J. (1997) Tabaquismo, mitos y realidades. 150pp. México

- Dozi-Vassiliades, J., A. Myrtsiotis, A. Granitsas y D. Mourelatos (1985) Induction of sister-chromatid exchange and cell cycle delays in human lymphocytes by vitamin A alone or in combination with melphalan and caffeine. *Int. J. Cancer Clin. Oncol.* 21:1089-1092.
- Doolittle, D.J., C.A. Rahn y C.K. Lee (1991) The effect of exposure to nicotine, carbon monoxide, cigarette smoke or cigarette smoke condensate on the mutagenicity of rat urine. *Mutation Res.*, 260:9-18.
- Elias, R. y M.L. Williams (1981) Retinoids cancer and the skin. *Arch. Dermatol.*, 117:160-181.
- Elias, R., M. DeMio, E. Vidal-Olliver, M. Laget, G. Balansard y G. Dumenil (1990) Antimutagenic activity of some saponins isolated from *Calendula officinalis* L., *C. arvensis* L. y *Medera lelix* L. *Mutagenesis*, 5:327-331.
- Espinosa-Aguirre, J.J., C. Vilchis, P. Ostrosky-Wegman, L. Benítez, I. Lares y J. Rubio (1993) Antimutagenicity of cyclohexanol towards 4(N-nitrosomethylamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and N-nitrosodiethylamine in *Salmonella typhimurium* strain TA100. *Mutation Res.*, 300:151-154.
- Evans, H.J., J. Fletcher, M. Torrance y T.B. Hargreave (1981) Sperm abnormalities and cigarette smoking. *Lancet*, 1: 627-629.
- Florin, I., L. Rutberg, M. Curvall y C.R. Enzell (1980) Screening of tobacco smoke constituents for mutagenicity using the Ames test. *Toxicology*, 15:219-232.
- Foiles, P.G., S.E. Murphy, L.A. Peterson, S.G. Carmella y S.S. Hecht (1992a) DNA and hemoglobin adducts as markers of metabolic activation of tobacco specific carcinogens. *Cancer Res. Suppl.* 52:26888s2701s.
- Foiles, P.A., L.A. Peterson, L.M. Miglietta y Z. Ronai (1992b) Analysis of mutagenic activity and ability to induce replication of polynoma DNA sequences by different model metabolites of the carcinogenic tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamine)-1-(3pyridil)-1-butanone. *Mutation Res.*, 279:91-101.
- Freeman, A.E., G. J. Kelloff, R.V. Gilden, W.T. Lane, A.P. Swain y R.J. Huebner (1971) Activation and isolation of hamster-specific C-type RNA viruses from tumors induced by cell cultures transformed by chemical carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68:2386-2390.
- 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, H. y F.E. Würzler (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive results. *Mutation Res.*, 203:297-308.

- Frei, H. y F.E. Würgler (1994) Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Res.*, 308:57-63.
- Frei, H., J. Lütthy, J. Brauchli, U. Zweifel, F.E. Würgler y C. Schlatter (1992) Structure/activity relationships of the genotoxic potencies of sixteen pyrrolizidine alkaloids assayed for the induction of somatic mutation and recombination in wing cells of *Drosophila melanogaster*. *Chem. Biol. Interact.* 83:1-22.
- Frölich, A. y F.E. Würgler (1989) New tester strains with improve bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. *Mutation Res.*, 216:179-187.
- Frölich, A. y F.E. Würgler (1991) Increased p450 content and increased alarin-epoxidase activity in an improved set of tester strains for the *Drosophila* SMART assay with the wings. *Mutation Res.*, 252:194-201.
- Ghosh, A.K., S. Sen, A. Sharma y G. Talukder (1991a) Inhibitions of clastogenic effects of cesium chloride in mice in vivo by chlorophyllin. *Toxicol. Lett.*, 57:11-17.
- Ghosh, A.K., S. Sen, A. Sharma y G. Talukder (1991b) Effect of chlorophyllin on mercuric chloride-induced clastogenicity in mice. *Food. Chem. Toxic.*, 29(11):777-779.
- Godfrey, B. (1981) Sperm morphology in smoker, *Lancet*, 1: 948-952.
- Goodman, D.S. (1984) Plasma retinol binding protein. En: *The Retinoids*, M.B. Sporn, A.B. Roberts y D.S. Goodman (Eds) Academic Press, Orlando, Florida, U.S.A. pp. 41-88.
- Graf, U., F.E. Würgler, H. Katz, H. Frei, H. Juon, B.B. Hall y P.G. Kale (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environm. Mutagen.*, 6:153-188.
- Graf, U., O.S. Heo y O. Olvera (1992) The genotoxicity of chromium (VI) oxide in the wing sport test of *Drosophila melanogaster* is over 90% due to mitotic recombination. *Mutation Res.*, 226:197-203.
- 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. y N. van Shaik (1992) Improve, high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.*, 271:59-67.
- Graf, U., S.K. Abraham, J. Guzmán-Rincón y F.E. Würgler (1998) Antigenotoxic studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.*, 402:203-210.
- Gruskin, B. (1940) Chlorophyll, its therapeutic place in acute and supparative disease. *Am. J. Surg.*, 49:49.

- Gudas, L.J., M.B. Sporn y A.B. Roberts (1994) Cellular biology and biochemistry of the retinoids. En: *The retinoids, biology, chemistry, and medicine*, 2nd Ed. Sporn M.B., A.B. Roberts y D.S. Goodman (Eds.). New York: Raven Press, pp. 443-520.
- Guzmán-Ricón, J. y U. Graf (1995) *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. En: *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. F.M., Butterworth, L.D. Corkum y J. Guzmán-Ricón (Eds). Plenum Press, Nueva York. pp. 169-172
- Guzmán-Ricón, J., J. Espinosa y U. Graf (1998) Analysis of the *in vivo* nitrosation capacity of the larvae used in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.*, 412:69-81.
- Hadnagy, W. y N. Seemayer (1988) Antimutagenicity of chlorophyllin against airborne pollutants. *Mutation Res.*, 203: 205-206.
- Haley, N.J., D. Hoffmann y E.L. Wynder (1986) Uptake of tobacco smoke components. Mechanisms in Tobacco Carcinogenesis. Hoffmann, D. y C. Harris (Eds) Cold Spring Harbor, Nueva York. pp 3-20
- Hällström, I. y A. Blanck (1985) Genetic variation in cytochrome p450 system in *Drosophila melanogaster*. 1. Chromosomal determination of some cytochrome P450-dependent reactions. *Chem. Biol. Interactions*, 56:157-171.
- Hayatsu, H., S. Arimoto y T. Negishi (1988) Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Res.*, 202:429-446.
- Hayatsu, H., T. Negishi, S. Arimoto y T. Hayatsu (1993) Porphyrins as potential inhibitors against exposure to carcinogens and mutagens. *Mutation Res.*, 290:79-85.
- Hecht, S.S., C.B. Chen, N. Hirota, N.R. Ornaf, T.C. Tso y D. Hoffmann (1978) Tobacco specific nitrosamines: Formation from nicotine *in vitro* and during tobacco curing and carcinogenicity in strain A mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, 60:819-824.
- Hecht, S.S., C.B. Chen, T. Ohmori y D. Hoffmann (1980) Comparative carcinogenicity in F344 rats of the tobacco specific nitrosamines, N-nitrosornicotine and 4-(methyl-N-nitrosamino)-1-(butanone). *Cancer Res.*, 40:298-302.
- Hecht, S.S., A. Castonguay, A. Riverson, B. Mu y D. Hoffmann (1983). Tobacco specific nitrosamines: Carcinogenicity, metabolism, and possible role in human cancer. *J. Environ. Sci. Health*, C1:1-54
- Hecht, S.S., A. Castonguay, F.L. Chung y D. Hoffmann (1984) Carcinogenicity and metabolic activation of tobacco-specific nitrosamines. IARC No. 57 p. 793-795.

- Hecht, S.S., y D. Hoffmann (1988) Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. *Carcinogenesis*, 9:875-884.
- Hecht, S.S., K.G. Jordan, C.I. Choi y N. Trushin (1990) Effects of deuterium substitution on the tumorigenicity of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1butanol in A/J mice. *Carcinogenesis*, 11:1017-1020.
- Heddle, J.A., y W.R. Bruce (1977) Comparison of tests for mutagenicity or carcinogenicity using assays for sperm abnormalities, formation of micronuclei, and mutations in *Salmonella*, En: H.H. Hiatt, J.D. Watson y J.A. Winsten (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 1549-1557.
- Hicks, R.M. (1983) The scientific basis for regarding Vit A and its analogues as anti-carcinogenic agents. *Proc. Nutr. Soc.*, 42:83-93.
- Hoffmann, D., J.D. Adams, D.D. Brunnemann y S.S. Hecht (1979) Assessment of tobacco-specific N-nitrosamines in tobacco products. *Cancer Res.*, 39:2505-2509.
- Hoffmann, D., A. Castongnay, A. Ridenson y S.S. Hecht (1981) Comparative carcinogenicity and metabolism of 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridil)-1-butanone and N'-nitrosonomicotine in Syrian golden hamster. *Cancer Res.*, 41:2386-2393.
- Hoffmann, D., S. S. Hecht y E. L. Wynder (1983) Tumor promoters and cocarcinogens in tobacco carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.*, 50:27-257.
- Hoffmann, D. y C. Harris (1986) Mechanisms in Tobacco Carcinogenesis. Banbury Report. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Hoffmann, D., y E.L. Wynder (1986) Chemical constituents and bioactivity of tobacco smoke, in: D. Zaridze y R. Peto (Eds.), Tobacco. A Major International Health Hazard, IARC Sci. Publ., 74, IARC, Lyon, pp. 145.
- Hoffmann, D. y S.S. Hecht (1990) Advances in tobacco carcinogenesis. En: *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis Vol. I*. Cooper D.S. y P.L. Grover (Eds.) Springer, Nueva York, pp 62-102.
- Hoffmann, D., A. Rivenson, F.L. Chung y S.S. Hecht (1991) Nicotine-derived N-nitrosamines (TSNA) and their relevance in tobacco carcinogenesis. *Crit. Rev. Toxicol.*, 21:305-311.
- Hsu, T.C., L.M. Cherry, C. Bucana, L.R. Shirley y C.G. Gairola (1991) Mitosis-arresting effects of cigarette smoke condensate on human lymphoid cell line. *Mutation Res.*, 259:67-78.
- Hugenholtz, A.P., y W.R. Bruce (1976) Induction and transmission of elevated levels of abnormally shaped murine sperm. *Can. J. Genet. Cytol.*, 18:564.

- Imai, K., T. Arimoto, M. Sato, K. Watanabe, R. Kimura y T. Murata (1986) Effects of sodium metallochlorophyllins on the activity and components of the microsomal drug-metabolizing enzyme system in rat liver. *Chem. Pharm. Bull.*, 34: 4287-4293.
- Inui, N. y S. Takayama (1971a) Effect of cigarette tar upon tissue culture cells, Neoplastic transformation of hamster lung cells by tobacco tar in tissue culture. *Br. J. Cancer*, 25:574-583.
- Inui, N. y S. Takayama (1971b) Acceleration of proliferation and tumor production rate of L-strain cells by treatment with cigarette tar. *Cancer*, 62:315-320.
- Izard, C., D. Valadaud y P. Moree-Tests (1970) Activity of certain fractions of cigarette smoke. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 270:2457-2459.
- Jansson, T., M. Curvall, A. Hedin y C.R. Enzell (1986) In vitro studies of biological effects of cigarette smoke condensate. II. Induction of sister chromatid exchanges in human lymphocytes by weakly acidic, semivolatile constituents. *Mutation Res.*, 169:129-139.
- Jansson, T.L., J. Romert, J. Magnusson y D. Jenssen (1991) Genotoxicity testing of extracts of a Swedish moist oral snuff. *Mutation Res.*, 261:101-115.
- Jansson, T., M. Curvall, A. Hedin y C.R. Enzell (1988) In vitro studies of the biological effects of cigarette smoke condensate. II. Induction of SCE by some phenolic and related constituents derived from cigarette smoke. A study of structure-activity relationships. *Mutation Res.*, 206:17-24.
- Kada, T., T. Inoue, T. Ohta y Y. Shirasu (1986) Antimutagens and their mode of action. En: *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms*. D.M. Shankel, P.E. Hartman, T. Kada y A. Hollaender (Eds) Plenum Press, Nueva York, pp. 181-196.
- Kallistratos, G. y E. Fasske (1980) Inhibition of benzopyrene carcinogenesis in rats with vitamin C. *Biochem. Biol.*, 16:15-30.
- Kato, Y., N. Nemoto y M. Takana (1983) Inhibition of benzo[a]pyrene mutagenesis in Chinese hamster V79 cells by hemin and related compounds. *Mutation Res.*, 121:153-157.
- Katz, A.J. y T.A. Foley (1993) Effect of temperature on frequencies of spots in *Drosophila* wing-spots assay. *Environ. Mol. Mutagen.*, 22:54-58.
- Kelsey, J.L., T. Dwyer, T.R. Holford y M. B. Bracken (1978) Maternal smoking and congenital malformations: An epidemiological study. *J. Epidemiol. Commun. Health*, 32:327-331.
- Kenyon, A. y L. Andress (1980) Does vitamin C induce X-linked recessive lethal mutations in *Drosophila melanogaster*? *Genetics*, 94:552-553.

- Khudoley, V., C. Malaveille y H. Bartsch (1981) Mutagenicity studies in *Salmonella typhimurium* on some carcinogenic N-nitramines *in vitro* and in the host-mediated assays in rats. *Cancer Res.*, 41:3205-3210.
- Kier, L.D., E. Yamasaki y B.N. Ames (1974) Detection of mutagenic activity in cigarette smoke condensates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71:4159-4163.
- Kimm, S.W., B.S. Tchaj, S.C. Park y S.J. Kang (1982) Antimutagenic activity of chlorophyll to direct- and indirect-acting mutagens and its contents in the vegetables. *Korean J. Biochem.* 14: 1-7.
- Kojima, H., H. Konishi y Y. Kuroda (1992) Effects of L-ascorbic acid on the mutagenicity of ethyl methanesulfonate in cultured mammalian cells. *Mutation Res.*, 266:85-91.
- Kuroda, Y. (1986) Antimutagenic activity of vitamin C in cultured mammalian cells. *Mutation Res.*, 164:273-279.
- Kuroda, Y. (1987) Antimutagenic mechanism of vitamin C and its derivatives in mammalian cells in culture. *Mutation Res.*, 182:365-371.
- Kuroda, Y. (1990a) Antimutagenic activity of vitamins in cultured mammalian cells, En: Y.Kuroda, D.M. Shankel y M.D.Waters (Eds.) *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II*. Plenum Press, Nueva York. pp. 233-256.
- La Voie, E.J., L. Tulley-Freiler, V. Bedenko y D. Hoffmann (1981) Mutagenicity, tumor-initiating activity, and metabolism of methylphenanthrenes. *Cancer Res.*, 41:3441-3447.
- Lai, C.N., B.J. Dabney y C.R. Shaw (1978) Inhibition of *in vitro* metabolic activation of carcinogens by wheat sprout extracts. *Nutrition and Cancer*, 1:27-30.
- Lai, C.N. (1979) Chlorophyll: The active factor in wheat sprout extract inhibiting the metabolic activation of carcinogens *in vitro*. *Nutrition and Cancer*, 1:19-21.
- Lasnitzki, Y. (1958) Observations on the effects of condensates from cigarette smoke condensate on human fetal lung grown *in vitro*. *Cancer Res.*, 28, 510-516.
- Leuchtenberger, C. y R. Leuchtenberger (1970) Differential cytological and cytochemical responses of various cultures from mouse tissues to repeated exposures to puffs from the gas phase of charcoal filtered fresh cigarette smoke. *Exptl. Cell Res.*, 62:161-172.
- Lewin, B. (1994) *Genes V* Oxford University Press, Nueva York, 1272 p.
- Lindsley, D.L. y G.G. Zimm (1990) The Genome of *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Information Service* (68) Part 1.
- Lindsley, D.L. y G.G. Zimm (1992) The Genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego. 1133 p.

- Love, J.M. y L.J. Gudas (1994) Vitamin A, differentiation and cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, 6:825-831.
- Macrae, W.D. y H.F. Stich (1979) Induction of sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells by the reducing agents bisulfite and ascorbic acid. *Toxicology*, 13:167-174.
- Marnett, L.J. (1987) Peroxyl free radicals: Potential mediators of tumor initiation and promotion. *Carcinogenesis*, 8:1365-1373.
- Miller, E.C. y J.A. Miller (1985) Some historical perspectives on the metabolism of xenobiotic chemicals to reactive electrophiles En: *Bioactivation of Foreign Compounds*, M.W. Anders (Ed.) Academic Press, Nueva York, pp 1-28.
- Mirvish, S.S., L. Wallace, M. Eagen y P. Shubik (1972) Ascorbate-nitrite reaction: Possible means of blocking the formation of carcinogenic compounds. *Science*, 177:65-68.
- Mizusaki, S., H. Okamoto, A. Akiyama y Y. Fukihara (1997a) Relation between chemical constituents of tobacco and mutagenic activity of cigarette smoke condensate. *Mutation Res.*, 48:139-326.
- Mizusaki, S., T. Takashima y K. Tomaru (1977b) Factors affecting mutagenic activity of cigarette smoke condensate in *Salmonella typhimurium* TA1538. *Mutation Res.*, 48:29-36.
- Mohr, Jr. U. y M. Emura (1991) Occurrence of sister-chromatid exchange and chromosomal aberration during vitamin A-induced cell differentiation in vitro. *Mutation Res.*, 246:67-73.
- Moon, R.C., D.L. McCormick, R.A. Mehta (1983) Inhibition of carcinogenesis by retinoids. *Cancer Res.*, 43:2469s-2475s.
- Moon, R.C. y L.M. Itri (1984) Retinoids and cancer. En: *"The retinoids, Vol. 2"*. Sporn, M.B., A.B. Roberts y D.S. Goodman (Eds.): New York: Academic Press, pp 327-371.
- Morales-Ramirez, P. y M.C. García-Rodríguez (1994) In vivo effect of chlorophyllin on gamma ray-induced sister chromatid exchange in murine bone marrow cells. *Mutation Res.*, 320: 329-334.
- Morse, M.A. y G.D. Stoner (1993) Cancer chemoprevention: Principles and prospects. *Carcinogenesis*, 14:1737-1746.
- Munzer, R. (1981) Modifying action of vegetable price on the mutagenicity of beef extract and nitrosated beef extract. *Food. Chem. Toxicol.*, 24:847-849.
- Nagabhushan, M. y S.V. Bhide (1988) Anti-mutagenicity of catechin against environmental mutagens. *Mutagenesis*, 3:293-296.

- Nair, J., H. Oshima, B. Pignatelli, M. Friesen, C. Malaveille, S. Calmels y H. Bartsch (1986) Modifiers of endogenous carcinogen formation: Studies on *in vivo* nitrosation in tobacco users. *Mechanisms in Tobacco Carcinogenesis*. Hoffmann, D. y C.Harris (Eds). Nueva York. pp. 45-61.
- Negishi, T., S. Arimoto, C. Nishizaki y H. Hayatsu (1989) Inhibitory effect of chlorophyllin on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl 5H-pyrido: 4,3-b:indole (Trp-P-2). *Carcinogenesis*, 10:145-149.
- Niki, E. (1987) Interaction of ascorbate and α -tocopherol. *Ann. NY Acad. Sci.*, 498:186-198.
- Norkus, E.P., W.A. Kuenzing (1985) Studies on the antimutagenic activity of ascorbic acid *in vitro* and *in vivo*. *Carcinogenesis*, 6:1593-1598.
- Novick, A., y L. Szilard (1952) Anti-mutagens. *Nature*, 170:926-927.
- Obe, G. y J. Hertha (1978) Chromosomal aberrations in heavy smokers. *Hum. Genet.*, 41:259-263.
- Obe, G., y B. Beek (1979) Mutagenic activity of aldehydes. *Drug Alcohol Depend.*, 4:91-94.
- Odin, A. P. (1997) Vitamins as antimutagens: Advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. *Mutation Res.*, 386:39-67,
- Olvera, O., S. Zimmering, C. Arceo y M. Cruces (1993) The protective effects of chlorophyllin in treatment with chromiun (VI) oxide in somatic cells of *Drosophila*. *Mutation Res.*, 301:201-204.
- Olvera, O., S. Zimmering, C. Arceo, J. Guzmán y M.E. de la Rosa (1995) Evidence for the protective effect of ascorbic acid (vitamin C) in treatment with γ -rays and chromium (VI) oxide (CrO₃) in somatic cells of *Drosophila*. *Mutation Res.*, 346:19-21.
- Omura, H., U. Tomita, H. Fujiki, K. Shinohara y H. Murakami (1978a) Breaking action of reductons related to ascorbic acid on nucleic acid. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 24:185-194.
- Omura, H., K. Shinohara, H. Maeda, M. Nomaka y H. Murakami (1978b) Mutagenic action of triose reductone and ascorbic acid on *Salmonella typhimurium* TA100 strain. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 24:184-194.
- Ong, T.M., W. Whong, J. Stewart y H.E. Brockman (1986) Chlorophyllin: A potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures. *Mutation Res.*, 173:111-115.
- Ong, T.M., W.Z. Whong, J. Stewart y H.E. Brockman (1989) Comparative antimutagenicity of 5 compounds against 5 mutagenic complex mixtures in *S. typhimurium* strain TA98. *Mutation Res.*, 222:19-25.

- Padma, P.R., A.J. Amonkar y S.V. Bhide (1989) Mutagenic and cytogenetic studies of *N*-nitrosornicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in fetal tissues of the Syrian golden hamster. *Cancer Res.*, 49:5671-5676.
- Pescitelli, A.R. (1979) Mutagenicity of cigarette smoke condensate and cigarette smoke in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.*, 1:118.
- Peterson, L.A., R. Mathew y S.S. Hecht (1991) Quantitation of microsomal α -hidroxilación of the tobacco-specific nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res.*, 51:5495-5500.
- Peto, R., R. Doll, J.D. Buckley y M.B. Sporn (1981) Can dietary β -carotene materially reduce human cancer rates? *Nature*, 290:201-208.
- Pirani, B.B.K. (1978) Smoking during pregnancy. *Obstet. Gynecol. Survey*, 33:1-13
- Qin, S. y C.C. Huang (1985) Effect of retinoids on carcinogen induced mutagenesis in *Salmonella tester* strains. *Mutation Res.*, 142:115-120.
- Qin, S., T. Batt y C.C. Huang (1985) Influence of retinol on carcinogen-induced sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in V79 cells. *Environ. Mutagen.*, 8:839-847.
- Ramos, P., Abundis, H., Gaytán, J.C., Ordáz, G., Orozco, P., Maldonado, J., Hernández, J., González, E., Reyes, P., Galicia, E. y Muñoz, A. (1993) Manual de laboratorio de genética para *Drosophila melanogaster* Mc. Graw-Hill, México. 131 pp.
- Ribeiro, C.V., U. Graf, M.L. Reguly y H.H. Rodrigues (1997) Recombinagenic activity of integerrimine, a pyrrolizidine alkaloid from *Senecio brasiliensis*, in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutat.* 29:91-97.
- Riverson, A., D. Hoffmann, B. Prokopczyk, S. Amin y S.S. Hecht (1988) Induction of lung and exocrine pancreas tumors in F344 rats by tobacco-specific and areca-derived N-nitrosamines. *Cancer Res.*, 48:6912-6917.
- Robins E. y R. Nelson (1989) Inhibition of 1,2-Dimethylhydrazine-induced nuclear damage in rat colonic epithelium by chlorophyllin. *Anticancer*, 9:981-986.
- Rodríguez-Arnaiz, R. y S. Zimmering (1989) Chlorophyllin is an antimutagen in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.* 14(supl. 15) 165.
- Romert, L., M. Curvall y D. Jenssen (1992) Chlorophyllin is both a positive and negative modifier of mutagenicity. *Mutagenesis*, 7:349-355.
- Romert, L., T. Jansson, M. Curvall y D. Jenssen (1994) Screening for agents inhibiting the mutagenicity of extracts and constituents of tobacco products. *Mutation Res.*, 322:97-110.
- Rosin, M. P., R. C. H. San y H. F. Stich (1980) Mutagenic activity of ascorbate in mammalian cell cultures. *Cancer Lett.*, 8:299-305.

- Rosin, M.P. (1990) Antigenotoxic activity of carotenoids in carcinogen-exposed populations, in: Kuroda, Y. D.M> Shankel y M.D. Water (Eds). Basic Life Sciences, Vol. 52, Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II, Plenum, Nueva York, pp 45-60.
- Rosignol, G., M.A. Alaoui-Jamali, A. Castonguay y H.M. Schuller (1989) Metabolism and DNA damage induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in fetal tissues of the Syrian golden hamster. *Cancer Res.*, 49:5671-5676.
- Rüdiger, H.W., F. Kohl, W. Mangels, P. von Wichert, C.R. Bartram, W. Wöhler y E. Passarge (1976) Benzopyrene induces sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *Nature*, 262:290-292.
- Sabharwal, P.S., D.K. Gulati y P.R. Bhalla (1985) Cytological studies on onion root-tip cells treated with water soluble extract of tobacco smoke condensate from commercial cigarettes. *Mutation Res.*, 31:217-224.
- Sankara-Narayanan, N. y B.S. Rao (1988) Interaction between cigarette smoke condensate and radiation for the induction of genotoxic effects in yeast. *Mutation Res.*, 208:45-49.
- Sato, M., K. Imai, R. Kimura y T. Murata (1984) Effects of sodium copper chlorophyllin lipid peroxidation. VI. Effect of its administration on mitochondrial and microsomal lipid peroxidation in rat liver. *Chem. Pharm. Bull.*, 32: 716-722.
- Shamberger, R.J. (1984) Genetic toxicology of ascorbic acid. *Mutation Res.*, 133: 135-159.
- Shankel, D.M. y C.H. Clarke (1990) Specificity of antimutagens against chemical mutagens in microbial systems, En: Y. Kuroda, D.M. Shankel y M.D. Waters (Eds), Basic Life Sciences, Vol. 52, antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II, Plenum Press New York, pp. 457-460.
- Shankel, D.M., S. Kuo, C. Haines y L.A. Mitscher (1993) Extracellular interception of mutagens. En: *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanism III*. G. Bronzetti et al. (Eds) Plenum Press, New York. pp.65-74.
- Shklar, G. (1982) Oral mucosa car carcinogenesis in hamsters. Inhibition by Vitamin E. *J. Natl. Cancer Inst.*, 68:791-797.
- Smith, D.M., A.E. Rogers y P.M. Newberne (1975) Vitamin A and the susceptibility of respiratory tract tissues to carcinogenic insult. *Environ. Health Perspect.*, 29:89-93.
- Smith, L y M. Sano (1944) Chlorophyll: an experimental study of its water-soluble derivatives. IV. The effect of water-soluble chlorophyll derivatives and other agents upon the growth of fibroblast in tissue culture. *J. Lab. Clin. Med.* 29:241-246.

- Smith, D.M., A.E. Rogers y P.M. Newberne (1975) Vitamin A and the susceptibility of respiratory tract tissues to carcinogenic insult. *Environ. Health Perspect.* 29:89-93.
- Sporn, M.B. (1977) *Origins of human cancer*. En: H.H. Hiatt, J.D. Watson y J. A. Winstein (Eds). Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, pp. 807-809.
- Sram, R.J., L. Dobias, A. Pastorkova, P. Rossner y L. Janka (1983) Effect of ascorbic acid prophylaxis on the frequency of chromosome aberrations in the peripheral lymphocytes of coal-tar workers. *Mutation Res.*, 120:181-186.
- Stich, H.F., L. Wei y R.F. Whiting (1979) The enhancing effect of transition metals on the chromosome-damaging action of ascorbate. *Cancer Res.*, 39:4145-4151.
- Stinson, S.F., G. Resznik y R. Donahoe (1981) Effect of three retinoids on tracheal carcinogenesis with *N*-methyl-*N*-nitrosourea in hamsters. *J. Natl. Cancer Inst.*, 66:947-951.
- Terwel, L. y J.C.M. van der Hoeven (1985) Antimutagenic activity of some naturally occurring compounds towards cigarette-smoke condensate and benzo(a)pyrene in the *Salmonella* microsomal assay. *Mutation Res.*, 152:1-4.
- Tetzner, C., H.J. Juhl y H.W. Rudiger (1980) Sister-chromatid exchange induction by metabolically activated retinoids in human diploid fibroblast cultures. *Mutation Res.*, 79:163-167
- Tomatis, L. (1979) Prenatal exposure to chemical carcinogens and its effects on subsequent generations. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 51:159-184.
- Triparthy, N.K., R.K. Patnaik y M.J. Nabi (1989) Genotoxicity of tartrazine studied in two somatic assays of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.*, 224:479-483.
- U.S.D.H.H.S. (United States Department of Health and Human Services) (1980). The health consequences of smoking for women. A report of the Surgeon General, p.1. W.S. Government Printing Office, Washington, D. C.
- van Schaik, N. y U. Graf (1993) Structure-activity relationship tricyclic antidepressant and related compound in the wings somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.*, 286:155-163.
- Venema, G. (1959) The influence of substances extracted from cigarette-smoke on mitotic processes in *Allium cepa*. *Chromosoma*, 10:679-685.
- Victorin, K., L. Busk, H. Cederbert y J. Mangusson (1990) Genotoxic activity of 1,3-butadiene and nitrogen dioxide and their photochemical reaction products in *Drosophila* and the mouse bone-marrow micronucleus assay. *Mutation Res.*, 228:203-209.
- Vogel, E.W. y J.A. Zijlstra (1987) Mechanistic and methodological aspects of chemically-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6:153-188.

- Warner, J.R., J. Nath y T.M. Ong (1991) Antimutagenic studies of chlorophyllin using the *Salmonella* arabinose-resistant assay system. *Mutation Res.*, 262:25-30.
- Waters, M.D., H.F. Stack, A.L. Brady, P.H.M. Lohman, L. Haroun y H. Vainio (1988) Use of computerized data listing and activity profiles of genetic and related effects in the review of 195 compounds. *Mutation Res.*, 205:295-312.
- Waters, M.D., A.L. Brady, H.F. Stack y H.E. Brockman (1990) The concept of activity profiles of antimutagens, En: Y. Kuroda, D.M. Shankel y M.D. Waters (Eds), Basic Life Sciences, Vol. 52, Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II, Plenum Press Nueva York, pp. 87-104.
- Wattenberg, L.W. (1991) Introduction. In: Workshop on cancer chemoprevention, 2-5 February, La Jolla, CA.
- Weitberg, A.B y D. Corvese (1997) Effect of vitamin E and beta-caroteno on DNA human phagocytes strand breakage induced by tobacco-specific nitrosamines and stimulated. *J.Exp.Clin.Cancer Res.*, 16:11-14.
- Welsh, C. W., M.H. Zile y M.F. McCullum (1986) Micronutrients, nonnutritive dietary factors, and cancer . En: *Diet, Nutrition and Cancer: A Critical evaluation, Vol. II.* B.S. Reddy and L.A. Colen (Eds), CRC, Boca Raton, Flor. pp. 1-21.
- Williams, G.M. y M.F. Laspia (1979) The detection of varios nitrosamines in the hepatocyte primary culture/DNA repair test. *Cancer Lett.*, 6:199-206.
- Wilmer, J.W.G.M. y B.J. Spit (1986) Influence of retinoids on the mutagenicity of cigarette-smoke condensate in *Salmonella typhimurium* TA98. *Mutation Res.*, 173:9-11.
- Würgler, F.E. y U. Graf (1990) Genotoxicity assays with somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Rev. Latinoamer. Genet.*, Vol. extraord., 181-196.
- Würgler, F.E. y E.W. Vogel (1986) *In vivo* mutagenicity testing using cells of *Drosophila melanogaster*, En: *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, F.J. De Serres (Ed.), Plenum, Nueva York, pp 1-72.
- Wynder, E.L., y D. Hoffmann (1979) Tobacco and health: A societal challenge. *N. Engl. J. Med.*, 300, 894-903.
- Wyrobek, A.J., y W.R. Bruce (1975) Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72:4425-4429.
- Xu, Y., C.T. Ho, S.G. Amin, C. Han y F.L. Chung (1992) Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis in A/J mice by green tea and its major polyphenol as antioxidants. *Mutation Res.*, 297:123-129.

- Yoshida, D., y T. Matsumoto (1978) Changes in mutagenicity of protein pyrolysates by reaction with nitrite. *Mutation Res.*, 58:35-40.
- Yoshida, D., y T. Matsumoto (1980) Amino- α -carbolines as mutagenic agents in cigarette smoke condensate. *Cancer Lett.*, 10:141-149.
- Yu, M.W., Y.J. Zhang, W.S. Blaner y R.M. Santella (1994) Influence of vitamins A, C and E and β -carotene on aflatoxin B₁ binding to DNA in woodchuck hepatocytes. *Cancer*, 73:596-604.
- Zhu, S., M.L. Cunningham, T.E. Gray y P. Netteshein (1991) Cytotoxicity, genotoxicity and transforming activity of 4-(methylnitrosamine)-1-(3-pyridil)-1-butanol (NN) in rat tracheal epithelial cells. *Mutation Res.*, 261:249-259.
- Ziegler, R.G. (1989) A review of epidemiologic evidence that carotenoids reduce the risk of cancer. *J. Nutr.*, 119:116-122.
- Zimmering, S., O. Olvera, M.E.Hernández, M.P.,Cruces, C.,Arceo y E. Pimentel (1990) Evidence for a radio protective effect of chlorophyllin in *Drosophila*. *Mutation Res.*, 245:47-49.
- Zimonjic, D., N.C. Popescu y J.A. DiPaolo (1989) Induction of sister chromatid exchanges by tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in human and hamster cell. *Carcinogenesis*, 10:753-755.
- Zordan, M., A. Russo, R. Costa, N. Blanco, C. Beltrame y A.G. Levis (1991) The genotoxicity of nitrilotriacetic acid (NTA) in a somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.*, 262:253-261.