

117



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

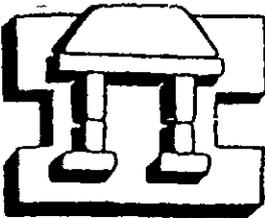
**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS
PROFESIONALES DE IZTACALA**

**“ EFECTO GENOTOXICO DEL
P-FENILENDIAMINA EN D.MELANOGASTER
MEDIANTE LA PRUEBA DE MUTACION Y
RECOMBINACION SOMATICA EN EL ALA ”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
BIOLOGO
P R E S E N T A
ARACELI ROSALES ALARCON

DIRECTOR DE TESIS:
BIOL. IRMA ELENA DUEÑAS GARCIA

294081



IZTACALA LOS REYES IZTACALA EDO. DE MEXICO 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNAM IZTACALA

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA
JEFATURA DE LA CARRERA DE BIOLOGIA



Los Reyes Iztacala, 28 de junio de 2000

SOLICITUD DE REVISION DE ESTUDIOS

LIC. AMERICA LANDA ROMERO
JEFA DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACION
ESCOLAR.
P R E S E N T E

Por este medio comunico a Ud. Que el pasante de Biología:

ARACELI ROSALES ALARCON

Ha concluido su trabajo de tesis titulado:

“Efecto genotóxico del p-fenilendiamina en D. Melanogaster mediante la prueba de mutación y recombinación somática en el ala”

Habiendo entregado a esta Jefatura los votos aprobatorios. Se extiende la presente a fin de que procedan los trámites pertinentes para la realización de su examen profesional.

Atentamente

“Por mi raza hablará el espíritu”


Dr. Sergio Vaca Pacheco
Jefe de la Carrera



A mis padres y hermana

A mis profesores

A mis amigos

Y a mi esposo

Por toda una vida de apoyo

Gracias.

INDICE

RESUMEN.....	3
1.-INTRODUCCIÓN.....	4
TINTES PERMANENTES Y P-FENILENDIAMINA.....	4
DETECCIÓN DE AGENTES GENOTÓXICOS.....	7
BIOENSAYOS A CORTO PLAZO.....	8
PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICA (SMART).....	8
2.-ANTECEDENTES.....	13
ESTUDIOS SOBRE TOXICIDAD Y TERATOGENESIS.....	13
ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	13
ESTUDIOS SOBRE LA PENETRACIÓN POR PIEL.....	14
3.-JUSTIFICACIÓN.....	21
4.-OBJETIVOS.....	21
5.-MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
MATERIAL BIOLÓGICO.....	21
SOLUCIONES.....	22
TESTIGOS.....	22
PROCEDIMIENTO.....	23
FIJACIÓN Y ELABORACIÓN DE PREPARACIONES.....	23
REGISTRO DE DATOS Y CRITERIOS DE LECTURA.....	23
6.- HIPÓTESIS Y ESTADÍSTICA.....	24
7.- RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	25
PFD-OXIDADO.....	25
PFD-SIN OXIDAR.....	26
8.- CONCLUSIONES.....	27
9.- BIBLIOGRAFIA.....	28

RESUMEN.

Estudios epidemiológicos realizados en las últimas décadas han indicado que aquellas personas que tiñen su cabello frecuentemente con tintes permanentes, o que tienen exposición laboral a éstos, podrían tener un incremento en el riesgo de contraer ciertos tipos de cáncer. Existen trabajos experimentales que demuestran la penetración por piel de algunos componentes de los tintes, después de la aplicación tópica. El p-fenilendiamina (PFD) es un componente importante en los tintes para cabello permanentes, y ha resultado positivo en ensayos a largo plazo, en cultivo de células de mamíferos y en los ensayos de *Salmonella typhimurium* y *Tradescantia*. En estas últimas, el PFD fue más mutagénico al ser oxidado y/o activado por lo que lo clasifican como promutágeno. Sin embargo existen trabajos similares donde se reporta que el PFD no tiene efecto cancerígeno o mutagénico. Por la controversia sobre su genotoxicidad, en este trabajo se probó el posible efecto genotóxico del PFD oxidado y sin oxidar, mediante la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en *Drosophila melanogaster*, cruza estándar (CE) y bioactivación elevada (CBE). Las diferentes concentraciones del PFD, oxidado y sin oxidar, fueron probadas en ambas cruza de manera simultánea en tres ensayos independientes. Se revisaron un total de 778 individuos y se encontró lo siguiente: Las concentraciones utilizadas del PFD sin oxidar resultaron no genotóxicas, en ambas cruza y para todas las categorías de manchas, excepto para las manchas gemelas, las cuales resultaron inconclusas también en ambas cruza. En la CE, las concentraciones utilizadas del PFD oxidado resultaron negativas en todas las categorías de manchas, excepto para las manchas gemelas, las cuales resultaron inconclusas, no así en la CBE en donde resultó débilmente positiva para las manchas pequeñas, negativa para grandes y totales e inconclusas para las gemelas, en las tres concentraciones.

Efecto genotóxico del p-fenilendiamina en *D. melanogaster* mediante la prueba de mutación y recombinación somática en el ala.

1.-INTRODUCCIÓN.

Tintes permanentes y p-fenilendiamina.

En los últimos años se ha incrementado el uso de ciertas sustancias químicas sintéticas y naturales dentro de las cuales se encuentran los fertilizantes, los plaguicidas, los fármacos y los cosméticos, entre otros; éstos al estar en contacto con el hombre pueden provocar efectos tóxicos, genotóxicos o cancerígenos.

Dentro de los compuestos utilizados en cosmetología se encuentran los tintes sintéticos para cabello, cuyo uso data de 1883 cuando Monnet patentó un proceso para colorear el cabello con la aplicación de mezclas frescas preparadas con una solución de p-fenilendiamina (PFD)¹ y peróxido de hidrógeno. Este proceso fue la base de los llamados tintes permanentes, los cuales son los más utilizados hoy en día (Burnett, 1987)

Los tintes permanentes o de oxidación se forman durante el proceso de teñido y no están presentes como tales en la solución antes de la aplicación. Estos productos constan de dos partes: Una solución intermedia y un agente oxidante, este último generalmente es el peróxido de hidrógeno. La solución intermedia está formada por el intermediario primario² (IP), o pigmento "para", y un agente acoplador o modificador³. (Tabla 1.1)

Los IP son oxidados con el peróxido de hidrógeno originando benzoquinona iminas. Las iminas reaccionan rápidamente con el acoplador y/o un compuesto "para" no oxidado para producir pigmentos indol. Para que se den

¹ PFD (1,4-benzenediamina o p-diaminobenceno), C₆H₈N₂ P.M 108.1 { CAS No. 106-50-3}, se puede reducir en 1,4-nitroanilina con Fe y HCl. Y oxidar en 1, 4-benzoquinonaimina con H₂O₂. Se presenta como cristales blancos, ligeramente rojos, se oscurecen al exponerse al aire. Soluble en 100 partes de agua fría; soluble en alcohol, cloroformo y éter. Se revela en un color negro con peróxido de hidrógeno al 3%, y en color café con una solución de FeCl₃ al 5%. Dosis letal media en conejos 250mg/Kg (Tomado de SIGMA 1994, y del Index. Merck)

² Intermediarios primarios: Pequeñas moléculas que pueden degradarse y penetrar al cabello, particularmente bajo las condiciones alcalinas que se dan durante la aplicación. La subsecuente oxidación y acoplamiento produce moléculas más largas, muchas de las cuales son atrapadas por el cabello. Generalmente son compuestos aromáticos con dos grupos donadores de electrones en posición 1,2 o 1,4. Éstos son relativamente pocos, los más comúnmente usados son: p-fenilendiamina, p-toluendiamina y p-aminofenol. Las combinaciones más efectivas son dos grupos amino o un grupo amino con uno hidroxilo unidos a un anillo benceno o tolueno .

³ Agentes modificadores o acopladores: Pueden estar basados en un anillo de benceno, sistemas de anillos múltiples o anillos heterocíclicos. requieren la sustitución de grupos en posición 1,3. Éstos no son fáciles de oxidar pero pueden hacerlo, al acoplarse con la quinona imina formada al oxidar al intermediario primario. El acoplador más frecuentemente usado es el resorcinol (para los colores verde y café) y el 1-naftol (para los colores violeta y azul)

estas reacciones se requiere un pH alto esto es usualmente activado con amoniaco. (Burnett, 1987 y Shipp, 1992)

Colores producidos por intermediarios primarios:

Intermediario primario	Color en el cabello
p-fenilendiamina	Café oscuro
p-toluendiamina	Café ligeramente rojizo
p-aminodefetilamina	Gris oscuro
p-aminofenol	Castaño rojizo claro
2-Amino-5-hidroxitolueno	Rubio dorado
5-Amino-2-hidroxitolueno	Rubio rojizo
o-Aminofenol	Dorado intenso

Colores producidos por *p-fenilendiamina* en presencia de varios acopladores:

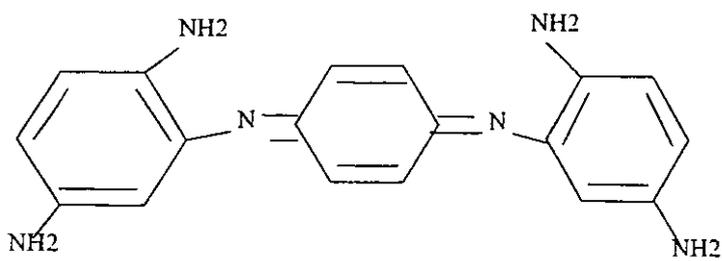
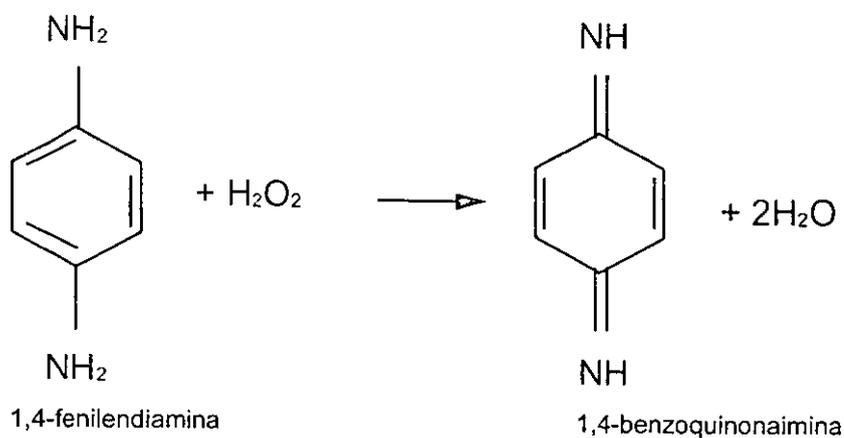
Acoplador	Color en el cabello
m-fenilendiamina	Púrpura azulado
m-aminofenol	Café claro
4-Metil-aminofenol	Café claro
m-metoxifenol	Magenta
6-Metil-3-aminofenol	Magenta
2,5-Xilenol	Púrpura azulado
Resorcinol	Café verdoso
Hidroquinona	Café grisáceo claro
Catecol	Café grisáceo
Ninguno	Café oscuro

Tabla 1.1. Colores producidos por varios componentes en tintes permanentes. Burnett, 1987

Sin embargo, puede ocurrir más de un estado de acoplamiento oxidativo, las reacciones posibles, que se establecen al inicio de la mezcla, son numerosas, por lo que se pueden producir algunos colores de intermediarios extraños. El cabello por sí mismo puede modificar o tomar parte en algunas de las reacciones y dar como resultado colores no esperados. (Fig. 1.1)

Anteriormente se creía que el colorante era producido en la fibra del cabello por oxidación de los colorantes intermediarios (teoría de Bandrowski, citada en

Burnett, *op. cit.*). Ahora se maneja que la oxidación y acoplamiento tienen lugar simultáneamente en la solución fuera del cabello (Shipp, *op. cit.*)



Base Brandowski

Fig. 1.1 Dos posibilidades de reacción al oxidar el p-fenilendiamina con peróxido de hidrógeno. En el primer caso se forma la 1,4-benzoquinonaimina y en el segundo caso se forma la base Brandowski, que es una diaminofenacina. (Kiese, 1968 y Shipp,1992)

Detección de agentes genotóxicos.

Los factores ambientales pueden causar cáncer. Los posibles cancerígenos entran al cuerpo, principalmente a través de la respiración pero también pueden ser ingeridos o absorbidos por la piel. Una vez dentro del cuerpo, la sustancia puede permanecer en los pulmones (como los asbestos) o ser absorbida como en el tracto digestivo. Si esto último es lo que ocurre, los xenobióticos atraviesan el cuerpo por la pared del tracto digestivo hacia la sangre, y pueden experimentar cambios químicos que los hacen más o menos tóxicos. Eventualmente, estos compuestos como tales, o en una forma activa, pueden atravesar la membrana de las células, y puede causar daño o cualquier otro evento que conducen al cáncer.

El conocimiento de los factores ambientales que pueden afectar a la salud, ha tenido un fuerte impulso, sobre todo con respecto a los contaminantes del ambiente laboral y los medicamentos de uso prolongado. El riesgo de contraer cáncer por factores ambientales es más grande cuando se incrementa la exposición al agente químico o físico, ya sea en una dosis muy alta o en pequeñas dosis por largos periodos de tiempo. Para identificar y analizar la acción directa o indirecta de agentes que pudieran modificar los componentes hereditarios de los sistemas vivos y detectar las propiedades de un grupo de agentes que pudieran inducir cambios a los ácidos nucleicos y/o producir efectos deletéreos en las dos estirpes celulares: Somáticas y germinales, es necesario recurrir a la utilización de algunas pruebas, no siendo posible o ético exponer a la gente a los posibles cancerígenos ambientales. La información acerca de sus efectos se puede obtener de distintas maneras, tales como:

1.- Estudios epidemiológicos: La incidencia de cierto tipo de cáncer se mide al comparar subgrupos, con diferentes niveles de exposición al cancerígeno, en una gran población. Por ejemplo en cualquier población al comparar al grupo de fumadores con el grupo de no fumadores, los fumadores tienen mayor probabilidad de contraer cáncer de pulmón. Los estudios epidemiológicos son la fuente más efectiva para establecer el riesgo de padecer algún tipo de cáncer en poblaciones expuestas a contaminantes ambientales, sin embargo, tienen limitaciones para descubrir nuevos cancerígenos entre los muchos agentes a los cuales estamos expuestos, y estas son (Vogel, 1987):

- a) Tiempo prolongado de latencia entre exposición y manifestación clínica.
- b) Participación de muchos factores en el desarrollo de la enfermedad.
- c) No poder determinar la magnitud de una exposición de tiempo atrás.

2.- Experimentos naturales: Si una población natural o grupo de individuos es accidentalmente expuesta a altos niveles de un probable cancerígeno ambiental, es posible estudiarla mas tarde y comparar con la población en general, para determinar si la exposición a este agente causó un incremento en el riesgo de

contraer cierto tipo de cáncer. Por ejemplo, algunos estudios han demostrado que los niños que vivían cerca de Chernobyl, después del accidente nuclear han incrementado el riesgo de contraer cáncer de tiroides, debido a la exposición de yodo radioactivo.

3.- Estudios con animales o bioensayos a largo plazo: Se realizan al exponer a mamíferos (generalmente ratas o ratones) a altas dosis de un compuesto supuestamente cancerígeno durante un período de tiempo corto y medir los efectos. De esta forma los investigadores pueden asumir lo que podría ocurrir en humanos. Estas extrapolaciones, que podrían ser discutibles, pueden ser muy útiles cuando no hay otra forma de medir el efecto de cierto compuesto.

4.- Pruebas de laboratorio o bioensayos a corto plazo: Existe un gran número de ensayos que involucran bacterias, insectos, vegetales o cultivo de células, que se exponen de forma controlada, a las sustancias sospechosas y son usados cuando se piensa que un compuesto puede alterar al ADN. Estos ensayos son usados para tamizar los posibles cancerígenos.

Bioensayos a corto plazo.

Bauer en 1928 expuso la Teoría de la Mutación Somática, la cual propone que la mayoría de los cancerígenos químicos son también mutagénicos, porque se asume que éstos afectan la estructura del ADN. Al principio de la década de los sesenta esta idea se puso en duda al carecer de efecto, en los sistemas genéticos de prueba establecidos hasta esa época, muchos de los cancerígenos conocidos. La situación cambió cuando se reconoció que la mayoría de los agentes cancerígenos son sólo biológicamente activos después de pasar por el metabolismo celular. Esto estimuló el desarrollo de técnicas para la activación de los xenobióticos *in vitro* e *in vivo*, tanto en sistemas bacterianos como en sistemas eucariontes. Gracias a estas técnicas se retomó dicha teoría. (Vogel, 1987)

De ahí que el mismo Vogel *op. cit.* establezca los principios básicos de un buen bioensayo a corto plazo (BCP):

1. Sistema de activación *in vivo*, o *in vitro*, para la detección de procancerígenos o promutágenos.
2. Sistema indicador sensible (microorganismos, cultivos de células de mamíferos, plantas, insectos, o mamíferos) con el que se pueda medir el daño genético inducido por el agente genotóxico.
3. Efecto genético bien definido.

Prueba de mutación y recombinación somática (SMART).

La prueba del ala SMART es un BCP que utiliza un organismo eucarionte (*Drosophila melanogaster*), se basa en la expresión de mutaciones recesivas en células somáticas de organismos transheterocigóticos; debida a la pérdida de heterocigocidad de marcadores genéticos. Si durante el desarrollo larvario se

induce alguna alteración en el material genético de las células de los discos imagales⁴ de las larvas (Fig. 1.2), ésta será transmitida a las células hijas formando un clon o mancha de células alteradas en las alas de moscas adultas; estas manchas se pueden observar y contabilizar con ayuda del microscopio óptico y analizar por medio del programa estadístico SMART (Graf y col, 1984)

El ensayo tiene la posibilidad de exponer a un gran número de células mitóticas, en los discos imagales de la larva, que darán origen a un número mayor de células en estado adulto, por lo que este ensayo permite analizar un gran número de células (aproximadamente 25,000 células por ala), al revisar una sola mosca (Graf y col, 1984) Requiere una sola generación para obtener resultados; ha demostrado ser eficaz, ya que está bien establecida y confirmada, se han evaluado más de 400 agentes físicos y químicos, puros y mezclas; además de presentar un sistema de activación (*in vivo*) para la detección de procancerígenos o promutágenos (Guzmán y Graf, 1995; Graf y col, 1996)

Para realizar la prueba se cruzan moscas que acarrean mutaciones recesivas distintas: hembras vírgenes de la línea flare (flama): *flr³/ln(3LR)TM3, ri^p sep bx^{34e} e^s Bd(S)*, (de forma abreviada *flr³/TM3, Bd(S)*.) X machos de la línea "multiple wing hairs" (pelos del ala múltiples): *mwh/mwh*. (Graf y Würgler, 1996)

Las larvas transheterocigotas producto de esta cruce tienen genotipo *mwh flr³* / mwh* flr³* o *mwh flr³* / TM3, Bd(S)*, en teoría, en proporción 1:1; ambas larvas son indistinguibles pero al recuperar los adultos, el primer genotipo genera moscas con alas de fenotipo silvestres y el segundo alas serrata (*Bd(S)*) (Ramos, 1993). Las larvas pueden ser tratadas de manera crónica o aguda (Tabla 1.2), por vía oral, inhalación o inyección de los compuestos a probar. Cuando emergen las moscas adultas, se fijan en alcohol al 70%, se realizan preparaciones permanentes de las alas en portaobjetos, se revisan en el microscopio a 400X y se busca la presencia de manchas o clones de células mutantes en las alas, se contabiliza la frecuencia por ala y por individuo, así como el tamaño de éstas (Graf y col, 1984)

Frei y Würgler en 1988 diseñaron un programa estadístico basado en **chi cuadrada** para evaluar los datos y discutir los parámetros que pueden afectar un experimento, así como decidir si el ensayo representa resultados positivos, débiles positivos, negativos o inconclusos en trabajos posteriores. (Frei y Würgler, 1995)

⁴ Las larvas tienen dos linajes celulares: larvario e imagal, el primero está implicado exclusivamente en el desarrollo larvario y su funcionamiento, mientras que el imagal está formado por paquetes de células que se conocen como discos imagales, los cuales permanecen en estado embrionario durante el desarrollo de la larva, eventualmente se diferencian en estructuras particulares del cuerpo del adulto. Desde el punto de vista genético, los discos imagales constituyen un excelente material de estudio. Cada disco, aparece como primordio desde el primer estadio larvario y consiste de 25 a 50 células. A partir de ese momento, el número de células por cada disco se incrementa por mitosis hasta el final de la fase larvaria en la que llega a tener miles de células por disco. Al final del tercer estadio larval se inicia el periodo de pupa en el que parte del material larvario degenera, las células indiferenciadas forman tejidos y las estructuras del adulto que se derivan de cada disco imagal.

DISTRIBUCIÓN DE LOS DISCOS IMAGALES EN LA LARVA

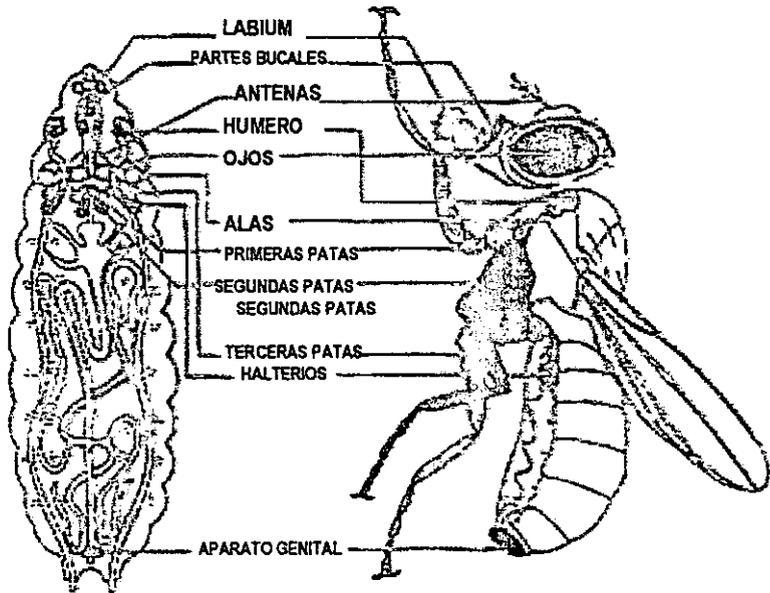


Figura 1.2 Discos imagales (Lawrence, 1992).

	Huevo. Desarrollo embrionario	Larva 1 ^{er} estadio	Larva 2 ^o estadio	Larva 3 ^{er} estadio.	Pupa y metamorfosis	Imago o adulto.
Duración aproximada del ciclo de vida de la mosca en condiciones óptimas de temperatura, 25°C	0 – 21 horas (● 1 día)	21 – 46 horas (● 1 día)	46 – 69 horas (● 1 día)	69 – 117 horas (● 2 días)	117 – 213 horas (● 4 a 5 días)	213 – (llegan a vivir hasta 50 días)
Tratamientos agudos			Larvas de 48 ±4 h son expuestas al xenobiótico durante 2 h	Larvas de 72 ±4 h son expuestas al xenobiótico durante 2 h		
			Larvas de 48 ±4 h son expuestas al xenobiótico durante 4 h	Larvas de 72 ±4 h son expuestas al xenobiótico durante 4 h		
			Larvas de 48 ±4 h son expuestas al xenobiótico durante 6 h	Larvas de 72 ±4 h son expuestas al xenobiótico durante 6 h		
Tratamientos crónicos		Larvas de 24 ±4 h son expuestas al compuesto xenobiótico	Las larvas siguen comiendo	Las larvas comen el compuesto durante 96 h		
			Larvas de 48 ±4 h son expuestas al compuesto xenobiótico	Las larvas comen el compuesto durante 72 h		
				Larvas de 72 ±4 h son expuestas al compuesto xenobiótico durante 48 h		

Tabla 1.2. En la tabla se muestran todos los tratamientos que se pueden realizar. Los tratamientos agudos constan de 2 a 6 h de exposición en los estadios larvarios 1° o 2°. Los tratamientos crónicos pueden iniciarse a las 24, 48 y 96 h de vida, coincidiendo con las diferentes etapas larvales, lo que significaría que las larvas pueden consumir el xenobiótico durante 96, 72 y 48 h respectivamente, estos tiempos son teóricos ya que un efecto tóxico del compuesto puede manifestarse como un retardo en el desarrollo, o generar una pupación prematura, lo que modifica los tiempos de alimentación. (Graf y col, 1984)

Las diferentes clases de manchas registradas pueden deberse a diferentes eventos de mutación: Mutación puntual (Fig. 1.3 e), delección (Fig. 1.3 c), translocación tipo específica o a la pérdida del cromosoma (aneuploidia) (Fig. 1.3 f) así como a recombinación mitótica (Fig. 1.3 b y d)

El analizar los dos fenotipos de moscas nos genera diferente tipo de información. La lectura de las alas con genotipo *mwh flr^{3*} / mwh^{*} flr³*, nos permite observar los tres fenotipos de manchas: Sencillas *mwh*, (Fig. 1.4 a), b y c) sencillas flama (Fig. 1.4 b) y gemelas (Fig. 1.4 c), las manchas sencillas son producto de recombinación o mutación y las gemelas sólo se recuperan cuando hay recombinación próxima al centrómero (Fig. 1.3 b). En las alas de las moscas que heredaron el cromosoma balanceado, genotipo *mwh flr^{3*} / TM3, Bd(S)* (fenotipo serratia), no se puede presentar la recombinación por lo que todas las manchas que se recuperen serán producto de mutaciones. Lo anteriormente expuesto nos permite determinar cuantitativamente la actividad recombinogénica de las genotoxinas, al comparar la frecuencia de manchas sencillas *mwh* en alas de moscas serratia, con la obtenida en las alas de moscas de fenotipo silvestre. (Graf, 1992; Delgado Rodríguez y col, 1994 y Graf y Würgler, op. cit.)

Con el objeto de conocer los efectos indirectos de los agentes químicos se han implementado líneas y cruza especiales para mostrar la capacidad de detección de xenobióticos que requieren citocromo P450⁵ para ser activados.

En la crua denominada de bioactivación elevada (BE), se utilizan hembras vírgenes de la línea Óregon (*OR(R); flr3 / TM3, Bd(S)*) X machos *mwh/mwh*, dando origen a larvas transheterocigotas *OR(R); mwh flr^{3*} / mwh^{*} flr³* u *OR(R); mwh flr^{3*} / TM3, Bd(S)*.

En la prueba SMART se trata a las células de los discos imagales de las larvas, que darán origen a las alas del adulto. Las alas del adulto están formadas por dos monocapas celulares, una dorsal y otra ventral. El plano de división de las células está orientado de manera perpendicular al eje del ala, de manera que los eventos registrados en una capa son independientes de la otra. Al diferenciarse cada célula da origen a un tricoma o pelo que se forma por la acumulación de fibras de actina en un polo de la célula, el tricoma crece durante la metamorfosis y posterior a ésta la célula muere y sólo es observable la presencia del pelo en la superficie de las alas. De esta manera puede establecerse la relación directa entre el número de tricomas o pelos en los distintos sectores de las alas y el número de células que la forman (Demerec, 1965; Garcia Bellido y Merriam, 1971; Garcia Bellido y Dapena, 1974)

⁵ Citocromo P450 monooxigenasa.- Enzima involucrada en la síntesis de varias feromonas y hormonas, requeridas por los insectos para su desarrollo normal y reproducción, estas enzimas también son requeridas para la sobrevivencia en condiciones adversas, ya que contribuyen a la inactivación de compuestos tóxicos (metabolismo xenobiótico) (). Un efecto opuesto en el metabolismo xenobiótico, se manifiesta por la activación de compuestos promutágenos o genotóxicos. (Brattsten, 1979 y Feyereisen, 1993 citados en Sener y col., 1996).

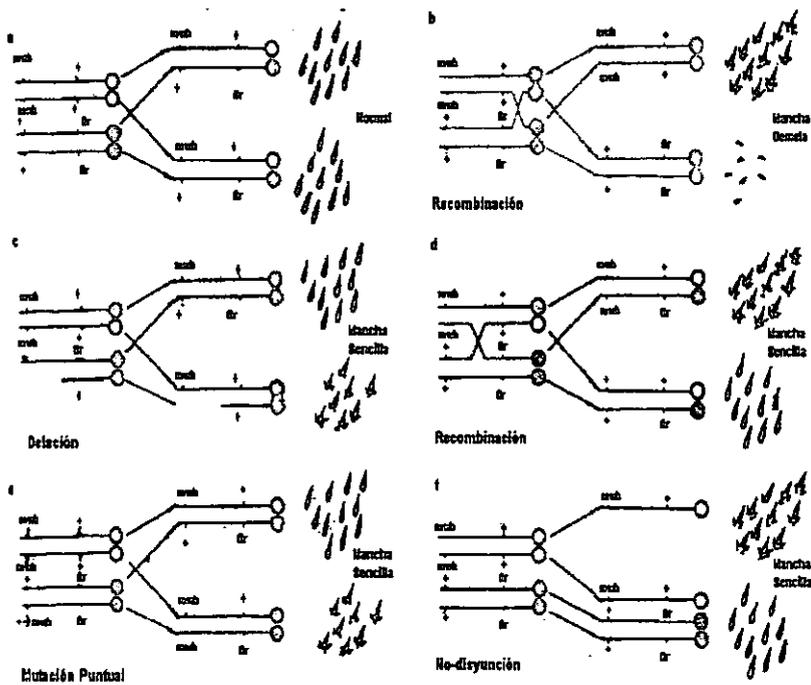


Fig. 1.3 Diferentes eventos que conducen a la pérdida de heterocigosidad. (Graf, 1984)

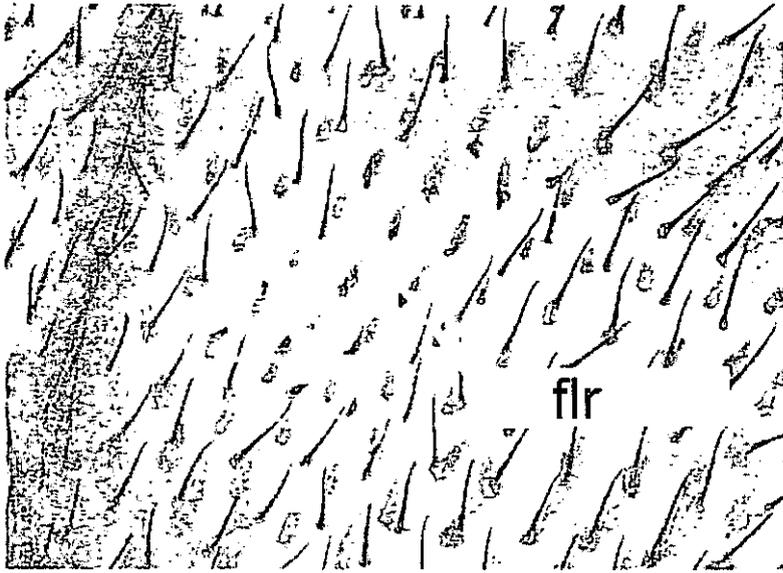


Fig. 1.4 a.- Fenotipo de mancha sencilla flama (donado por Institute of Toxicology, ETH & University of Zurich, H. Frei, 1997)

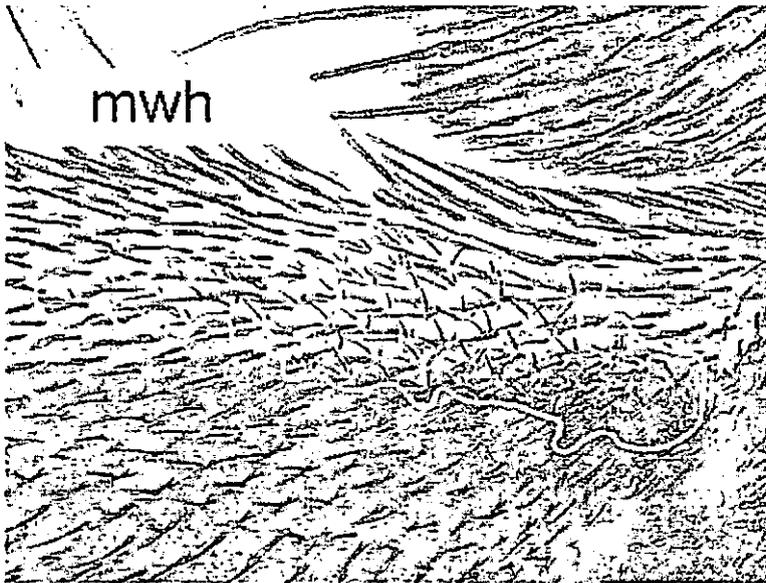


Fig. 1.4 b.- Fenotipo de mancha sencilla mwh (donado por Institute of Toxicology, ETH & University of Zurich, H. Frei, 1997)

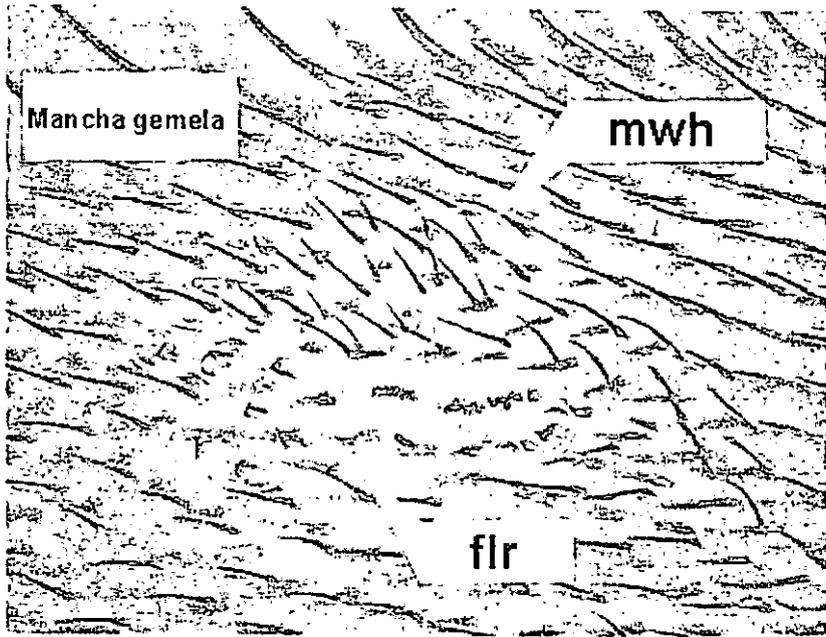


Fig. 1.4 c.- Fenotipo de mancha gemela. (donado por Institute of Toxicology, ETH & University of Zurich, H. Frei, 1997)

Líneas y marcadores.

Para realizar la prueba se utilizan tres líneas; multiple wing hair (*mwh/mwh*), flare (*flr²/TM3, Bd(S)*) y óregon (*OR(R), flr² / TM3, Bd(S)*)

- **multiple wing hairs (*mwh*):** Mutación recesiva localizada en el brazo derecho del cromosoma 3 (3-0.3) Su expresión fenotípica es que de cada célula salen varios tricomas (3 a 5) (Ramos y col, 1993) En el fenotipo silvestre a cada célula corresponde un solo tricoma.
- **flare (*flr²*):** Son tricomas malformados y cortos en forma de flama o roseta de maíz, es una mutación recesiva y está localizada en el brazo derecho del cromosoma 3 pero en una posición más proximal que la anterior (3-38.8) Esta mutación en homocigosis es letal (Ramos y col, 1993) Sin embargo las células individuales homocigotas en los discos imagales de las alas son viables y pueden producir células o clones mutantes en las células del ala del adulto (Graf. et. al., 1996)
- **Serratia (*Bd(S)*):** Para reconocer fenotípicamente a la línea, se utiliza este marcador dominante, que se manifiesta como muescas en las alas, este marcador en condiciones homocigóticas también es letal. Se localiza en el cromosoma 3 (3-92.5) (Ramos y col, *op.cit.*)
- **Inversión *TM3*:** Como los marcadores *flr²* y *Bd(S)* son letales en homocigosis, la línea presenta un cromosoma balaceador con inversiones múltiples (*TM3*) que evita la recombinación en meiosis y permite mantener la línea, la cual estará formada por individuos heterocigotos para los marcadores letales (Graf. y col, 1996)
- **oregón (*OR(R)*):** La línea óregon fue construida por Frölich y Würzler en 1989. Esta línea acarrea el cromosoma 2 de la línea oregón *OR(R)* resistente al DDT (Dapkus y Morell, 1977 citado en Graf y van Schaik 1992 y Delgado Rodríguez y col, 1995), este cromosoma a su vez acarrea la mutación dominante *Rst(2)DDT* ubicada en 2-65 la cual confiere no sólo la resistencia al DDT e insecticidas organofosfóricos en larvas y adultos, sino también el incremento general en el metabolismo xenobiótico. (Lindsley y Zimm, 1992 citado en Delgado Rodríguez y col, 1995) esta mutación es responsable de incrementar de manera constitutiva los niveles del citocromo P450⁶ (Hälström y Blanck,

⁶ *Drosophila* cuenta con enzimas de desintoxicación similares a las contenidas en la fracción S9 del hígado de mamíferos (Clark, 1982; Hälström, 1982). Estas enzimas son dependientes del citocromo P450 y participan activamente en la oxidación y reducción de promutágenos y en el metabolismo de xenobióticos, en particular en compuestos que tienen átomos de nitrógeno en posiciones estratégicas de la molécula como aminas metiladas, aminas, nitrosoaminas, hidrazinas y aminas aromáticas. El gen *CYP6A2*, codifica para el citocromo P450 6A2, y es el primero de los citocromo P450 clonado de *Drosophila*. Este gen corresponde con los de la familia B450-B1 de mamíferos (Graf com. per., 1997). Esta enzima está presente invariablemente en la línea resistente al insecticida (óregon) y en la línea sensible (*flr*). Se ha demostrado que la expresión del gen es muy baja en el estado embrionario incrementándose progresivamente con el desarrollo de la larva encontrándose un "pico" de expresión en el tercer estadio larval y en el estado de pupa, baja su actividad en estado adulto. Una distribución idéntica se encontró en la línea *flr*, solo que a un nivel

1985 citado en Graf y van Schaik 1992 y Delgado Rodríguez y col, 1995)

El uso de marcadores en el mismo cromosoma permite discernir la ocurrencia de recombinación en la región delimitada por el marcador *flr³* y el centrómero o en la región entre los dos marcadores. Como resultado de eventos de recombinación pueden recobrase manchas sencillas y gemelas, este último evento es resultado de la recombinación en el intervalo próximo al centrómero que es acotado por el marcador *flr³*; (Fig. 1.3 d) mientras que las manchas sencillas *mwh* indican recombinación entre *mwh* y *flr³*. Por otra parte pueden obtenerse manchas sencillas *flr³* o *mwh* por eventos como mutación puntual, pérdida parcial o total del cromosoma 3 y no-disyunción (Graf y col, 1984)

2.-ANTECEDENTES.

Estudios sobre toxicidad y teratogénesis.

Existen reportes de la toxicidad sistémica del PFD administrada por vía oral en suicidios, intentos de suicidio, ingestas accidentales y homicidios, en donde se presentaron anorexia, necrosis del músculo estriado y grave deficiencia renal; atrofia óptica, edema bucofaringeo severo, conducción neural, parálisis y paratesia; entre otros síntomas (Bourquia y col, 1988; Sir Hashim y col, 1992; Lifshits y col, 1993; Yagi y col, 1996; Sood, 1996; Lahbabi y col, 1998) En México se tiene registrado un solo caso de suicidio, una mujer entre 28 y 29 años de edad que ingirió tinte para el cabello y que murió por congestión generalizada. (Abaunsa, com. per. 1998)

Existen tres trabajos epidemiológicos donde se sugiere cierto efecto teratológico (abortos espontáneos, hijos con retraso mental o con malformaciones cardíacas), entre aquellas mujeres que durante su embarazo estuvieron en contacto laboral o como usuarias de los tintes para cabello (Roeleveld y col, 1993; John y col, 1994 y Wilson y col, 1998) Con respecto a los estudios experimentales, Inoue M. y U. Murakami (1977), reportan efecto teratogénico, malformaciones en el esqueleto de fetos, al aplicarles 2,5-diaminotolueno dihidrocloride (p-toluendiamina), a ratas preñadas. Sin embargo Wernick y col, en 1975 y Bumett y col, en 1976 en trabajos realizados en ratas y conejos, no encontraron efecto teratogénico usando tintes semipermanentes, y permanentes, respectivamente. (citados en Inoue y Murakami op. cit.)

Estudios epidemiológicos.

Algunos estudios epidemiológicos realizados en las últimas dos décadas han indicado que aquellas personas que tiñen su cabello frecuentemente con

más bajo. Por lo que la resistencia al insecticida puede estar relacionada con la expresión constitutiva del gen CYP6A2 en óregon (Sener y col, 1996)

1985 citado en Graf y van Schaik 1992 y Delgado Rodríguez y col, 1995)

El uso de marcadores en el mismo cromosoma permite discernir la ocurrencia de recombinación en la región delimitada por el marcador *flr³* y el centrómero o en la región entre los dos marcadores. Como resultado de eventos de recombinación pueden recobrase manchas sencillas y gemelas, este último evento es resultado de la recombinación en el intervalo próximo al centrómero que es acotado por el marcador *flr³*; (Fig. 1.3 d) mientras que las manchas sencillas *mwh* indican recombinación entre *mwh* y *flr³*. Por otra parte pueden obtenerse manchas sencillas *flr³* o *mwh* por eventos como mutación puntual, pérdida parcial o total del cromosoma 3 y no-disyunción (Graf y col, 1984)

2.-ANTECEDENTES.

Estudios sobre toxicidad y teratogénesis.

Existen reportes de la toxicidad sistémica del PFD administrada por vía oral en suicidios, intentos de suicidio, ingestas accidentales y homicidios, en donde se presentaron anorexia, necrosis del músculo estriado y grave deficiencia renal; atrofia óptica, edema bucofaringeo severo, conducción neural, parálisis y paratesia; entre otros síntomas (Bourquia y col, 1988; Sir Hashim y col, 1992; Lifshits y col, 1993; Yagi y col, 1996; Sood, 1996; Lahbabi y col, 1998) En México se tiene registrado un solo caso de suicidio, una mujer entre 28 y 29 años de edad que ingirió tinte para el cabello y que murió por congestión generalizada. (Abaunsa, com. per. 1998)

Existen tres trabajos epidemiológicos donde se sugiere cierto efecto teratológico (abortos espontáneos, hijos con retraso mental o con malformaciones cardiacas), entre aquellas mujeres que durante su embarazo estuvieron en contacto laboral o como usuarias de los tintes para cabello (Roeleveld y col, 1993; John y col, 1994 y Wilson y col, 1998) Con respecto a los estudios experimentales, Inoue M. y U. Murakami (1977), reportan efecto teratogénico, malformaciones en el esqueleto de fetos, al aplicarles 2,5-diaminotolueno dihidrocloride (p-toluendiamina), a ratas preñadas. Sin embargo Wernick y col, en 1975 y Burnett y col, en 1976 en trabajos realizados en ratas y conejos, no encontraron efecto teratogénico usando tintes semipermanentes, y permanentes, respectivamente. (citados en Inoue y Murakami op. cit.)

Estudios epidemiológicos.

Algunos estudios epidemiológicos realizados en las últimas dos décadas han indicado que aquellas personas que tiñen su cabello frecuentemente con

más bajo. Por lo que la resistencia al insecticida puede estar relacionada con la expresión constitutiva del gen *CYP6A2* en óregon (Sener y col, 1996)

tintes permanentes, semipermanentes o temporales, o aquellas que tienen exposición laboral a éstos, podrían tener un incremento en el riesgo de contraer ciertos tipos de cáncer. En varios de los reportes se encontró una asociación dosis respuesta estadísticamente significativa entre la frecuencia de aplicación de los tintes al año, el tiempo que llevaba usándolo o el tipo de tinte; de tal manera que se encontraba mayor riesgo asociado con los tintes permanentes que el asociado a tintes semipermanentes o temporales. En algunos se encontró que las mujeres que usaban colores negro, castaño y rojo tenían 2 o 4 veces incrementado el riesgo de tener un diagnóstico con algunos tipos de cáncer que aquellas que usaron colores claros. En algunos casos la asociación estaba restringida a alguno de los sexos, a un color, al tiempo de uso o incluso sólo cuando estaba asociado a otro factor como el hábito de fumar.

En otros reportes no se encontró ningún tipo de asociación, entre el uso de los tintes para cabello y el riesgo de contraer cualquier tipo de cáncer o problema de salud. A continuación se presenta la Tabla 2.1 con un resumen de estos hallazgos.

Estudios sobre la penetración por piel.

Durante la aplicación normal de los tintes para cabello, el producto permanece en la cabeza de 20 a 60 minutos y se enjuaga después, por lo que la penetración del tinte por el cuero cabelludo tendría que ser durante ese lapso de tiempo, después sería muy difícil, ya que las raíces del cabello que están en contacto con la piel no tienen colorante (Burnett en 1987)

Los reportes de personas que después de aplicarse algún tinte, eliminan por orina componentes de éstos, son muy limitados y difíciles de confirmar, sin embargo, existen trabajos experimentales que demuestran la penetración de algunos componentes de los tintes, después de la aplicación tópica de mezclas comerciales o compuestos puros, oxidados o sin oxidar, realizados in vivo en perros, ratas, monos e incluso en el hombre; en los que se cuantifica la proporción de alguno de los componentes de los tintes, excretados por orina o heces.

Tipo de cáncer	Incremento en el riesgo, estadísticamente significativo.	Sin asociación estadísticamente significativa.
De vejiga y bajo tracto urinario.	Najem y col. (1982) Asociado al hábito de fumar. Skov y col. (1990): Sólo en estilistas varones. Skov T y Lynge en (1994)	Howe y col. (1980) Sullivan (1982) Nomura y col. (1989) Thun y col. (1994).
De las células de la médula ósea o mieloma múltiple	Zahm y col. (1992). Brown y col. (1992). Thun y col. (1994). National Institute of Health U.S. (1994) Herrinton y col. (1994)	Grodstein. y col. (1994) Colditz. (1994)
Del sistema linfático o linfoma de no-Hodgkin	Cantor y col. (1988). Blair y col. (1992). Zahm y col. (1992). Pearce y Bethwaite(1992). Boffetta y col. (1994). National Institutes of Health U.S. (1994) Thun y col. (1994). Skov y Lynge (1994). Greiner y col. (1995). Holly y col. (1998).	Shibata y col. (1990) Grodstein y col. (1994) Colditz (1994)
Varios tipos de leucemia y preleucemia.	Cantor y col. (1988). Zahm y col. (1992). Sandier y col. en 1993. En: NIHUS (1994). National Institutes of Health, U.S. (1994) Mele y col. (1994): Sólo para los tonos oscuros.	Shibata y col. (1990) Grodstein y col. (1994) Colditz (1994)
De ovarios	Tzonou . y col. (1993). Boffetta Y col. (1994). National Institutes of Health, U.S. (1994)	
De glándula salival	Spitz y col. (1990): Sólo en mujeres.	
Sarcoma de Kaposi	Hardell y col. (1987): En hombres con SIDA.	
Síndrome mielodisplástico	Nagata. y col. (1999).	Ido; Nagata, Y col. (1996)
De mama	Kinlen y col. (1977): Sólo en mujeres fumadoras o ex fumadoras mayores de 50 años. Shore y col. (1979): Sólo en mujeres mayores de 50 años con más de 10 años de uso. Koenig y col. (1991): Sólo estilistas mujeres con más de 5 años trabajando.	Stavraky y col. (1979) Nasca y col. (1992). Thun y col. (1994).
De boca		Thun y col. (1994).
De pulmón		Thun y col. (1994).
Del cuello de la matriz y de endometrio		Stavraky y col. (1979) Thun y col. (1994).
Melanoma cutáneo maligno.		Osterlind y col. (1988)
Tumor de Wilm		Olshan y col. (1993)

Tabla 2.1 Resumen de hallazgos asociados o no al uso de tintes para cabello en relación a varios tipos de cáncer.

Estudios experimentales.

Las aminas aromáticas y algunos de sus derivados con radicales nitro e hidroxilo, han sido utilizadas durante muchos años en los tintes para cabello. Sin embargo los estudios experimentales para determinar la toxicidad de los tintes para el cabello se iniciaron en 1966 (Burnett, 1987) involucrando diversas pruebas, entre las cuales figuran la administración del tinte en animales de laboratorio, por vía oral, cutánea o inyectado (Tabla 2.2, 2.3 y 2.3 bis) Tiempo después, en la década de los setenta el Instituto Nacional del Cáncer en Estados Unidos, instituyó un programa para detectar, a través de diversos bioensayos, la seguridad en el uso de los químicos utilizados en la elaboración de tintes para cabello, entre otros.

En algunos trabajos (Burnett en 1977 y Burnett y Goldenthal, en 1988) discuten la validez de los resultados obtenidos en otros trabajos, porque la forma de aplicación de los compuestos puros o las mezclas y/o las dosis usadas no corresponden con la realidad. En otro trabajo Burnett y Corbett (1987) discuten la correlación entre los bioensayos a corto plazo y las pruebas para detectar cancerígenos, presentando una tabla que muestra que el PFD y otros constituyentes de los tintes, resultan positivos en la prueba de Ames; en la prueba de linfoma de ratón y en la prueba de transformación, usando células de embrión de hámster; y resultan negativos en los bioensayos, a largo plazo, diseñados para detectar la potencialidad que tienen las aminas aromáticas de producir cáncer. En contraste están los trabajos de Cheung y col, (1996) y el de Kerckaert y col, (1998) en donde demuestran que los estudios *in vitro* son muy útiles para predecir la potencia cancerígena de estos compuestos, e incluso en otros artículos se da por hecho que algunas de las aminas aromáticas utilizadas en la elaboración de tintes son mutagénos directos o promutágenos y son utilizados como controles positivos en pruebas de antimutagénesis. (Grover y Bala en 1993; Gichner y col, en 1994; Tanaka y col, 1996; Batiste-Alentor, 1995)

Referencia	Modelo	Método	Compuesto*	Resultados
Kiese et. al. en 1968	Perros. In vivo	Se aplicaron de manera tópica, durante tres horas	PFD, MFD y PTD con y sin H2O2	Se excretó por orina del 1 al 5% de estos compuestos, cuando se aplicó la base con agua y menos del 0.13% cuando se aplicó con peróxido
Kiese y Rauscheren (1968) En: Burnett en 1987.	Humano s In vivo	Se aplicó tinte permanente durante 40 minutos. Se colectó la orina de los voluntarios durante 48h.	Mezcla comercial que contenía PTD.	Se encontró que la concentración más alta fue entre las 5 y las 8 h después de la aplicación, recuperándose en orina cerca del 0.2 al 0.3% del PTD aplicado.
Hurby (1977) En: Burnett en 1987.	Ratas y perros. In vivo.	Se aplicó de manera tópica, durante 30 minutos a ratas rasuradas y durante 3 horas a perros.	PTD marcado con carbono 14, en un sistema de oxidación con H2O2	Tanto en las ratas como en los perros, se eliminó por orina cerca del 0.1 al 0.2% de la dosis aplicadas. En las ratas, se encontró que del 5 al 10% permaneció en el sitio de aplicación. En los perros se encontró que los niveles del compuesto en sangre, después de 6 h de la aplicación fue del orden de 0.02 ppm.
Stenbäck y col, en 1977. En: Burnett en 1987.	Ratones y conejos In vivo.	Se aplicaron concentraciones de 5 y 10% de manera tópica.	PFD disuelto en acetona	Llegaron a la conclusión de que el PFD es fácilmente absorbido, se calcula que ● 4-6 mg del tinte es absorbido por el cuero cabelludo durante el proceso de aplicación <i>in vivo</i> .
Burnett (1978). En: Burnett en 1987.	Ratas. In vivo	Se aplicó de manera tópica a un grupo de ratas rasuradas y por vía oral a otro grupo. Se mantuvieron durante 7 días, durante los cuales se colectaron heces y orines, al final se les sacrificó y se les realizó la autopsia.	2,4-DAA marcado con carbono 14	Se encontró que los niveles del compuesto en sangre y en glándulas tiroides fue entre 280 y 900 veces más altos cuando se administró por vía oral que cuando se aplicó tópicamente. Se reporta que cuando es aplicado de manera tópica, cerca del 90% del compuesto es eliminado durante el champú que se aplicó una hora después del tinte y que el 7% permanece en cuero cabelludo un mes después. Añaden que si se suma la cantidad de compuesto colectada en orina, heces y la que permanece en el cadáver del animal, después de 7 días, indican una absorción del 1.6 al 2%
Maiback Y Wolfram (1981). En: Burnett 1987.	Monos Rhesus y humano s. In vivo	Se aplicó de manera tópica y se comparó la penetración por cuero cabelludo en ambas especies.	2,4-DAA, PFD y HC Blue No. 1, marcados con carbono 14.	El promedio de excreción urinaria para el 2,4-DA en el mono fue 0.02% y en el hombre 0.01%; para el PFD la excreción en mono y hombre fue del 0.14% y para el HC Blue No. 1 fue 0.12% en mono y 0.09% en hombre. La cantidad de tinte retenido por el cabello es cerca de 3 a 4 ordenes de magnitud más grande que la penetración por cuero cabelludo.
Jouhar en 1982.	Monos Rhesus y Humanos s Revisión	Son revisados algunos estudios de absorción por piel de los tintes para cabello en animales de laboratorio y humanos, bajo condiciones de teñido normal.	Mezclas comerciales.	Indica que los experimentos realizados con monos Rhesus, son un excelente modelo para estudiar la adsorción en humanos.

Tabla 2.2. En esta tabla se muestran algunos de los trabajos realizados sobre la penetración por piel de los tintes o componentes de éstos, con diferentes modelos.

*Abreviaturas: p-fenilendiamina (PFD), m-fenilendiamina (MFD) y p-toluendiamina (PTD), 2,4-diminoasol (4-metoxi-m-fenilendiamina)(2,4-DAA), y N4,N4-bis-(2-hidroxiethyl)-N'-metil-2-nitro-p-fenilendiamina (HC Blue No. 1).

Tabla 2.3. Mezclas comerciales.

I. RESULTADOS POSITIVOS: Con efecto mutagénico y/o cancerígeno.

Prueba experimental	Modelo y ensayo:	Compuestos probados:	Respuesta	Referencia
Sistemas bacterianos:	Prueba de <i>Salmonella typhimurium his</i>	Varias marcas de tintes permanentes.	Se reporta que el 89% de los tintes comerciales oxidados provocaron mutaciones.	Ames y col., (1975), citados en Stenbäck y colaboradores, 1977.
	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98, en presencia y ausencia del activador metabólico de mamífero S9.	Cuatro formulas comerciales de tintes para cabello permanentes, tratadas con H ₂ O ₂	Se encontró que el 2,7-diaminofenacina (producto oxidado del MPD) resultó altamente mutagénico.	Watanabe T. y colaboradores en 1990
	Dos líneas de <i>Salmonella typhimurium</i> .	12 marcas de tintes para cabello, en tonos que van de los castaños medios a oscuros	23 de los 40 productos examinados produjeron mutaciones en una o en ambas de las líneas de <i>Salmonella typhimurium</i> usadas.	Ferguson y colaboradores en 1990

II. RESULTADOS NEGATIVOS: No tienen efecto cancerígeno o mutagénico.

Prueba experimental	Modelo y ensayo:	Compuestos probados:	Respuesta	Respuesta
Ensayos a largo plazo con mamíferos. Aplicación Tópica.	Ratones "Swiss Webster". Línea que detecta hemangioma de hígado, adenoma de pulmón, y linfoma maligno.	9 formulas de tintes permanentes oxidados con H ₂ O ₂ al 6% en proporción 1:1 y 3 formulas de tintes del tipo semipermanentes, aplicados sin diluir.	Ninguna de las mezclas afectó la supervivencia, ni hubo indicio de efecto cancerígeno estadísticamente significativo.	Burnett y col, (1980)
Cultivo de células en mamíferos:	Con la prueba de micronúcleos en médula de ratón <i>in vivo</i>	13 tintes para cabello comerciales hechos en China.	Los resultados mostraron que ninguno de los 13 indujo mutaciones en la prueba de micronúcleos.	Wang y col, en 1991
	Intercambio de cromátidas hermanas (SCE) en linfocitos circulantes humanos. Ensayo cometa en tejidos humanos.	Tintes permanentes (Peinadoras profesionales expuestas a...)	La prueba SCE no detectó efecto mutagénico en los linfocitos de los sujetos expuestos. En el ensayo cometa tampoco se encontró diferencia entre controles y sujetos expuestos.	Sardas y col, en 1997
Sistemas bacterianos:	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98 y TA100 con y sin activación (S-9)	13 tintes para cabello comerciales hechos en China.	Los resultados mostraron que ninguno de los 13 indujeron mutaciones en la prueba de Ames con y sin activación.	Wang y col, en 1991
	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98 en muestras de orina humana.	Tintes permanentes (Peinadoras profesionales expuestas a...)	No se encontró una clara diferencia en la actividad mutagénica de los sujetos expuestos con respecto a los controles.	Sardas y col, en 1997

Tabla 2.3 bis. Compuestos puros y formulas prototipo.

I. RESULTADOS POSITIVOS: Con efecto mutagénico y/o cancerígeno

Prueba experimental	Modelo y ensayo:	Compuestos probados: *	Respuesta	Referencia:
Ensayos a largo plazo con mamíferos. Aplicación tópica	Ratas hembras. Prueba para detectar potencial cancerígeno	PFD oxidado	Incrementa el desarrollo de tumores cancerígenos de glándula mamaria.	Dos trabajos publicados en 1986 por Rojanapo y col, (Citados en Burnett y Goldenthal, en 1988)
Cultivo de células en mamíferos:	Hamster chino (células de	2,4-DAA; 2-N-p-PDA; 4-N-o-PDA;	Causaron aberraciones en los cromosomas y cromátidas	Venitt y col, (1975); Kirkland y

	embrión)	MFD y PFD.		Venitt (1976) y Benedict (1976), citados en Burnett 1977
	Ensayo del linfoma de ratón, utilizando como marcador el locus L5178Y (timidin cinasa)	2,4-DAA; 4-A-2-NF; 2-N-p-PDA; 4-N-o-PDA; MFD y PFD.	Resultados positivos	Palmer y col. (1976) citado en Burnett 1977
	Una prueba de citotoxicidad con células de ovario de hámster chino (CHO-K1)	Benzoaminas (anilina, OFD y PFD) y sus derivados nitro (PNA; 2-N-p-PDA; 3-N-o-PDA y 4-N-o-PDA)	Todos los compuestos indujeron aberraciones cromosómicas mostrando un incremento dosis respuesta. El grupo nitro no afectó la potencia citotóxica.	Chung y col, en 1996
	Ensayo de transformación de células de embrión de hámster sirio.	2-a-4-NT; MTD; 2,4-DNT; OAH; OTD; 2,6-DAT; 2,4-DMOA; 4-N-o-PDA; PFD-d y HC Blue 2.	2-a-4-NT, MTD, 2,4-DNT, OAH, OTD, son cancerígenos en roedores y produjeron transformación morfológica significativa. 2,6-DAT, 2,4-DMOA, 4-N-o-PDA, PFD-d y HC Blue No. 2. se reportan como no cancerígenos en roedores y ninguno tuvo efecto, en ninguna de las dosis probadas.	Kerckaert y col, en 1998
Sistemas bacterianos: Ensayos sobre mutagénesis	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1538 con y sin activación metabólica	PFD; OFD; 2-N-p-PDA; 4-N-o-PDA; MFD, 2,4-DAA; 2,5-DAA; 2-A-4-NF; 2-A-5-NF; 4-A-2-NF y PTD	Son mutagénicos.	Ames y col. (1975); Searle y col. (1975); Venitt y Searle, (1976), citados en Wild y col. (1980)
	<i>Salmonella typhimurium</i> . en presencia y en ausencia de Aroclor 1254, inductor de la fracción S9 de hígado de rata	20 derivados del PFD	Los derivados nitro- con sustituciones en el C6 fueron los más mutagénicos. En todos los casos los compuestos fueron más mutagénicos al ser activados. Los derivados metoxi, fluor y cloro fueron mutagénicos aun sin activación. Algunos derivados no resultaron mutagénicos.	Shahin (1994)
	<i>Salmonella typhimurium</i> líneas TA98 y TA100 y sus mutantes deficientes en nitroreductasa, TA98NR y TA100NR en presencia y ausencia de S9.	Benzoaminas (anilina, OFD y PFD) y sus derivados nitro (PNA; 2-N-p-PDA; 3-N-o-PDA y 4-N-o-PDA).	Las benzaminas son promutágenos. La adición del grupo nitro las convierte en mutágenos directos. La posición del grupo nitro afecta la actividad mutagénica.	Chung y col, en 1996.
Sistemas vegetales. Ensayos sobre anímutagénesis	Inducción de mutación somática en el don 4430 de <i>Tradescantia</i>	OFD; MFD y PFD.	Dan por hecho que el OFD, MFD y PFD son promutágenos con potencia mutagénica de 5,6, 1,43 y 0,46 respectivamente	Gichner y col, (1994)
<i>Drosophila melanogaster</i> bioensayos a corto plazo.	Tres pruebas de recombinación y mutación somáticas (SMART). La del ala, y las de los ojos <i>zeste-white</i> y <i>white-ivory</i> .	5 químicos, entre ellos el 4-N-o-PDA y el PFD-d.	El PFD-d resultó positivo en las tres pruebas, el 4-N-o-PDA resultó positivo sólo en la prueba de los ojos <i>zeste-white</i> .	Batiste-Alentorn y col. (1995)

II. RESULTADOS NEGATIVOS: No tienen efecto cancerígeno o mutagénico.

Prueba experimental	Aplicación	Modelo y ensayo:	Compuestos probados:*	Respuesta	Referencia:
Ensayos a largo plazo con mamíferos.	Tópica	Ratones	Varias formulas prototipo que contienen PFD; PTD; resorcinol; MFD; MTD y 2,4-DAA.	No se encontró evidencia de inducción de tumores cancerosos.	Burnett y col, (1975). Citada en Burnett y Goldenthal, 1988
		Ratones y conejos.	PFD y 4-A-2-NF.	No se encontró evidencia de inducción de tumores cancerosos	Stenback y col. (1977) En: Burnett y Goldenthal, 1988
		Ratas, Spargue-Dawley. Estudio de reproducción y prueba para detectar potencial cancerígeno.	6 formula prototipos de colorantes permanentes, con PFD; PTD; PAF; Resorcinol; MAF; 1-naftol; 2-A-4-NF; 4-CR; PADFAH y NMPAS. Las formulas se mezclaron con H ₂ O, al 6% en proporción 1:1.	En el estudio de reproducción no se encontraron efectos adversos en la fertilidad, gestación o lactancia. En la fase de potencial cancerígeno se encontró variación significativa, entre los tumores que ocurren con más frecuencia en esta línea de ratas.	Burnett y Goldenthal, en 1988
	En la dieta	Ratas y ratones.	PFD y otras aminas aromáticas en dosis máximas toleradas.	No se encontró evidencia de que el material usado en la elaboración de tintes permanentes cause cáncer de glándula mamaria.	El Instituto Nacional del Cáncer en 1979. (Citado en Burnett y Goldenthal, 1988).
	Intraperitoneal.	Prueba de letales dominantes en ratas de la línea Charles River CD. Se utiliza para detectar daños cromosómicos.	PFD; OFD; 2-N-p-PDA; 4-N-o-PDA; MFD; 2,4-DAA; 2,5-DAA; 2-A-4-NF; 2-A-5-NF; 4-A-2-NF y PTD.	No se encontró evidencia de la expresión del letal dominante. Por lo que se concluye que los compuestos no producen daño cromosómico.	Burnett y col, 1977

Tabla 2.3 y 2.3 bis.

En estas tablas se presenta un resumen de la revisión de diferentes trabajos en los que han sido probados, por varios investigadores, en bioensayos con mamíferos, bacterias, cultivos de células, etc.; la posible toxicidad crónica, la capacidad de inducir mutaciones y el potencial cancerígeno de las mezclas comerciales, o formulas prototipo, de tintes permanentes y semipermanentes; así como de sus componentes purificados.

*Abreviaturas: o-fenilendiamina (OFD); m-fenilendiamina (MFD); p-fenilendiamina (PFD); p-fenilendiamina dihidrocloride (PFD-d); 4-metoxi-m-fenilendiamina (2,4-diaminoanisole, 2,4-DAA); 2,5-diaminoanisole (2,5-DAA); 2-nitro-p-fenilendiamina (2-N-p-PDA); 3-nitro-o-fenilendiamina (3-N-o-PDA); 4-nitro-o-fenilendiamina (4-N-o-PDA); m-aminofenol (MAF); p-aminofenol (PAF); 4-amino-2-nitrofenol (4-A-2-NF); 2-amino-4-nitrophenol (2-A-4-NF); 2-amino-5-nitrofenol (2-A-5-NF); 2-amino-4-nitrotolueno (2-a-4-NT); m-toluidiamida (MTD); p-toluidiamida (PTD); 2,4-dinitrotolueno (2,4-DNT); o-anisidine hidrocloreto (OAH); o-toluidine (OTD); 2,6-diaminotolueno (2,6-DAT); 2,4-dimetoxianilina hidrocloreto (2,4-DMOA); N', N⁴, N⁴-tris(2-hidroxiethyl)-2-nitro-p-fenilendiamina (HC Blue No. 2); p-nitroanilina (PNA); 4-clororesorcinol (4-CR); p-aminodifenilamina hidrocloreto (PADFAH) y N-metil-p-aminofenol sulfato (NMPAS).

3.-JUSTIFICACIÓN.

En Estados Unidos se reporta que entre un 30 o 40 por ciento de la población utiliza los tintes para el cabello los cuales contienen entre otras cosas p-fenilendiamina, este compuesto está reportado como posible mutagénico o carcinogénico. En México se desconocen las cifras relativas al porcentaje de la población que los utilizan.

Por la controversia detectada sobre su genotoxicidad resultó importante valorar la genotoxicidad de la PFD (99% de pureza) oxidada con peróxido de hidrógeno y sin oxidar, utilizando la prueba del ala de SMART.

Se ha reportado en bioensayos a corto plazo que este compuesto sin oxidar y/o oxidado es promutagénico.

La determinación del efecto genotóxico con el p-fenilendiamina es necesaria ya que es un compuesto probado sólo por la cruce estándar (Batiste-Alentorn) con *Drosophila melanogaster*. Pero si resultara positivo para ambas cruces se podría proponer un estudio más profundo con otras dosis y con otros componentes de los tintes para el cabello.

Por lo anterior se proponen los siguientes objetivos:

4.-OBJETIVOS.

1.- Determinar el efecto genotóxico del p-fenilendiamina puro, sin oxidar y oxidado en *Drosophila melanogaster* mediante la prueba de mutación y recombinación somática en el ala.

2.- Comparar en las cruces estándar y bioactivación elevada, los niveles de genotoxicidad del compuesto sin oxidar y oxidado.

5.-MATERIALES Y MÉTODOS.

Material biológico.

Se utilizaron las líneas: *mwh/mwh* a la que se llamó *mwh*, *fl^r/TM3,Bd(S)* o *flare* y *OR(R)*; *fl^r/TM3,Bd(S)* denominada *Óregon*, las cuales fueron amablemente donadas por la Dra. Patricia Ramos de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Se utilizaron larvas transheterocigotas de 72 h (tercer estadio) (Fig. 5.1 y 5.2)

3.-JUSTIFICACIÓN.

En Estados Unidos se reporta que entre un 30 o 40 por ciento de la población utiliza los tintes para el cabello los cuales contienen entre otras cosas p-fenilendiamina, este compuesto está reportado como posible mutagénico o carcinogénico. En México se desconocen las cifras relativas al porcentaje de la población que los utilizan.

Por la controversia detectada sobre su genotoxicidad resultó importante valorar la genotoxicidad de la PFD (99% de pureza) oxidada con peróxido de hidrógeno y sin oxidar, utilizando la prueba del ala de SMART.

Se ha reportado en bioensayos a corto plazo que este compuesto sin oxidar y/o oxidado es promutágeno.

La determinación del efecto genotóxico con el p-fenilendiamina es necesaria ya que es un compuesto probado sólo por la cruce estándar (Batiste-Alentorn) con *Drosophila melanogaster*. Pero si resultara positivo para ambas cruces se podría proponer un estudio más profundo con otras dosis y con otros componentes de los tintes para el cabello.

Por lo anterior se proponen los siguientes objetivos:

4.-OBJETIVOS.

- 1.- Determinar el efecto genotóxico del p-fenilendiamina puro, sin oxidar y oxidado en *Drosophila melanogaster* mediante la prueba de mutación y recombinación somática en el ala.
- 2.- Comparar en las cruces estándar y bioactivación elevada, los niveles de genotoxicidad del compuesto sin oxidar y oxidado.

5.-MATERIALES Y MÉTODOS.

Material biológico.

Se utilizaron las líneas: *mwh/mwh* a la que se llamó *mwh*, *fl^r/TM3,Bd(S)* o *flare* y *OR(R)*; *fl^r/TM3,Bd(S)* denominada *Óregon*, las cuales fueron amablemente donadas por la Dra. Patricia Ramos de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Se utilizaron larvas transheterocigotas de 72 h (tercer estadio) (Fig. 5.1 y 5.2)

3.-JUSTIFICACIÓN.

En Estados Unidos se reporta que entre un 30 o 40 por ciento de la población utiliza los tintes para el cabello los cuales contienen entre otras cosas p-fenilendiamina, este compuesto está reportado como posible mutagénico o carcinogénico. En México se desconocen las cifras relativas al porcentaje de la población que los utilizan.

Por la controversia detectada sobre su genotoxicidad resultó importante valorar la genotoxicidad de la PFD (99% de pureza) oxidada con peróxido de hidrógeno y sin oxidar, utilizando la prueba del ala de SMART.

Se ha reportado en bioensayos a corto plazo que este compuesto sin oxidar y/o oxidado es promutagénico.

La determinación del efecto genotóxico con el p-fenilendiamina es necesaria ya que es un compuesto probado sólo por la cruce estándar (Batiste-Alentorn) con *Drosophila melanogaster*. Pero si resultara positivo para ambas cruces se podría proponer un estudio más profundo con otras dosis y con otros componentes de los tintes para el cabello.

Por lo anterior se proponen los siguientes objetivos:

4.-OBJETIVOS.

- 1.- Determinar el efecto genotóxico del p-fenilendiamina puro, sin oxidar y oxidado en *Drosophila melanogaster* mediante la prueba de mutación y recombinación somática en el ala.
- 2.- Comparar en las cruces estándar y bioactivación elevada, los niveles de genotoxicidad del compuesto sin oxidar y oxidado.

5.-MATERIALES Y MÉTODOS.

Material biológico.

Se utilizaron las líneas: *mwh/mwh* a la que se llamó *mwh*, *11P/TM3,Bd(S)* o *flare* y *OR(R)*; *11P/TM3,Bd(S)* denominada *Óregon*, las cuales fueron amablemente donadas por la Dra. Patricia Ramos de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Se utilizaron larvas transheterocigotas de 72 h (tercer estadio) (Fig. 5.1 y 5.2)

de las siguientes cruzas:

Estándar: Hembras vírgenes *fr²/TM3,Bd(S)* X machos *mwh/mwh* y

Bioactivación Elevada: Hembras vírgenes *ORR/ORR; fr²/TM3,Bd(S)* X machos *mwh/mwh*

Se utilizaron larvas de esta edad, debido a que en esta etapa las larvas presentan un desarrollo celular óptimo (proliferación celular) y es el momento en que los niveles de citocromo P450 están en sus niveles más altos. (Graf, com. per. 1995)

Soluciones.

Las soluciones se prepararon de acuerdo con lo reportado por Burnett y colaboradores (1977) quienes calcularon que los humanos se exponen mensualmente 40 mg/Kg. o menos del PFD, por cada 2g del tinte.

El p-fenilendiamina (PFD), (CAS No. 106-50-3) fue generosamente donado por L'Oréal de México, y fue diluido en una solución de alcohol al 1.2%⁷.

Se preparó una **solución madre** de PFD 10mM (27 mg de PPD aforado a 25 ml de alcohol al 1.2%), ésta se dividió en dos partes a las que llamamos A y B.

La solución A contenía 13 ml de la solución madre y se utilizó para preparar las concentraciones no oxidadas del PFD. La solución A se diluyó en agua desionizada (filtro Barntead/Thermoline) y las concentraciones usadas fueron: **0.001, 0.1 y 10.0 µM**.

La solución B contenía 12 ml de la solución madre más 12 ml de peróxido de hidrógeno al 6%⁸ con lo que se obtuvieron las concentraciones oxidadas del PFD. La solución B se diluyó igualmente en agua desionizada y las concentraciones de la solución oxidada utilizadas fueron las mismas que para la solución no oxidada: **0.001, 0.1 y 10.0 µM**.

Testigos.

Se utilizó el solvente alcohol al 1.2% como testigo negativo.

Ambas cruzas fueron validadas con dos testigos, el promutágeno Dimetilnitrosamina (0.625 mM) y agua desionizada para verificar que las cruzas respondieran a los tratamientos.

La solución de peróxido de hidrógeno al 6% o menos no se utilizó como testigo, porque todos los organismos morían por quemadura generalizada y desecación.

⁷ Alcohol al 1.2%: 0.6 ml de alcohol absoluto (Reproquifin reactivo analítico CAS 64-17-5 Cat 20130 Lote 4572-C) aforado a 50 ml con agua desionizada (filtro Barntead/Thermoline)

⁸ Peróxido de hidrógeno al 6%: 10 ml de peróxido de hidrógeno al 30% (Sigma de México No.59 lote 1090z PM. 34 02 densidad 1.11) aforado a 50 ml con agua desionizada

Procedimiento.

- 1.- Se obtuvieron machos de la línea mwh y hembras vírgenes de las líneas flare y Óregon, utilizando el criterio de edad; éstas últimas se colocaron en tubos con medio de cultivo durante 48 h a 25°C, para verificar su virginidad. Se utilizaron 6 frascos con medio de cultivo para cada tipo de cruce, en los que se colocaron hembras y machos en una proporción de aproximadamente 2:1 (Fig. 5.2)
- 2.- Se colectaron los huevos de cada una de las cruces durante 8 h a 25°C, en frascos que contenían una capa soporte de grenetina al 10 % y una capa superior de levadura fresca (La Florida) activada con agua y azúcar, en baño María a 40°C
- 3.- Para colectar las larvas transheterocigotas de 72 ± 4 h de edad se agregó a los frascos agua a 25°C para disolver la levadura y se vació a una coladera de pequeña abertura. Se les agregó el agua suficiente hasta que quedaron completamente libres de levadura.
- 4.- Los diferentes soluciones se adicionaron en alícuotas de 2 ml por tubo en 5 g de medio instantáneo Carolina (Instant *Drosophila* medium; carolina biological supply company; Burlington, North Carolina 27215; Gladstone, Oregón 97027) para *Drosophila melanogaster*.
- 5.- Las larvas se colocaron en los tubos de cada tratamiento y controles, después de eso se colocaron en estufas a 25°C para continuar con su desarrollo.
- 6.- Las larvas se sometieron a un tratamiento crónico, esto quiere decir que las larvas ingirieron los compuestos durante 48 h (Ver tabla 1.2)
- 7.- Todo lo anterior se realizó por triplicado y en tres experimentos independientes.

Fijación y elaboración de preparaciones.

- 1.- Al decimotercer día de la colecta de huevos, se obtuvieron los adultos y se conservaron en alcohol al 70%.
- 2.- Para realizar las preparaciones de las alas, las moscas (que estaban en alcohol al 70%) se enjuagaron en agua corriente, se separaron las alas del resto del cuerpo con pinzas entomológicas y se colocaron en un portaobjetos con solución de Faure's (30 g goma arábica, 20 ml de glicerol, 50 g de hidrato de cloral y 50 ml de agua) Se colocaron, protegiéndolas del polvo, en una plancha a 40°C durante 24 h; después de esto se les añadió 2 gotas de la solución de Faure's; y se cubrieron con un cubreobjetos del No.1 colocándoseles encima 3 pesas de 83 g cada una, las preparaciones permanecieron en la plancha por 24 h más.

Registro de datos y criterios de lectura.

- 1.- Se analizaron las alas (tanto la superficie dorsal como ventral) con un microscopio óptico a 400X.
- 2.- Se registraron, en formatos diseñados para ese fin, el sector del ala donde se encontró la mancha (los sectores o áreas se definen aprovechando el patrón

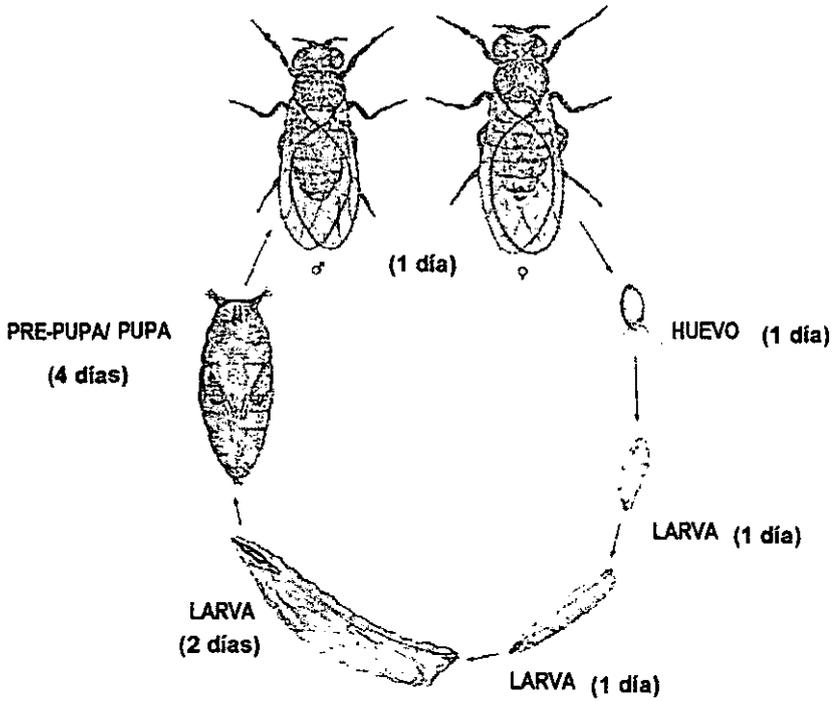


Fig. 5.1 CICLO DE VIDA DE *Drosophila melanogaster*

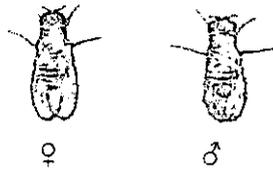


Fig.5.2 Dimorfismo sexual de *Drosophila melanogaster* (Carolina Biological supply company)

natural de venas del ala, (Figura 5.3) y el tamaño y tipo de ésta. (Graf y col, 1984)

Es importante registrar el tamaño de las manchas recobradas ya que teóricamente este refleja el número de divisiones celulares⁹ que ocurrieron después de la inducción del cambio genético en la célula afectada original, por lo que puede ser indicador indirecto de la actividad del compuesto y de la velocidad con que alcanza la célula blanco. También puede indicarnos si existe algún problema con la mitosis o si ocurrió muerte celular, en estos casos el tamaño de las manchas registradas serían menores a lo esperado (Graf, U y col, 1984)

La mutación *mwh* tiene expresividad variable, por lo que es posible encontrar células que forman 2, 3 ó más tricomas. Sin embargo sólo se consideraron en el registro aquellas que presentaron tres o más ya que se ha demostrado que las células con dos tricomas ocurren con frecuencia en larvas transheterocigotas no tratadas. Por convención se considera que dos manchas son independientes cuando se separan entre sí por 3 o más hileras de células normales (Graf, U y col, 1984)

6.- Hipótesis y estadística.

El método estadístico utilizado en este trabajo fue el presentado por Frei y Würigler (1988) el cual hace posible decidir si los datos de las pruebas de células somática en *Drosophila* indican un resultado positivo, débil positivo, negativo o inconcluso.

Para este fin se combinan dos pruebas estadísticas: Una prueba contra la hipótesis nula (H_0); ésta asume que el tratamiento experimental no incrementa la frecuencia de la expresión de los marcadores ocurridos de manera espontánea en el control; y una prueba contra la hipótesis alternativa (H_A); que asume *a priori* que un tratamiento determinado incrementa la frecuencia espontánea por un cierto múltiplo (ρ) de la frecuencia obtenida en el control. Rechazar la H_A establece que la frecuencia de daño en los lotes experimentales permanece relativamente bajo, a un nivel que se puede definir como el nivel mínimo de riesgo de genotoxicidad. Un nivel de riesgo igual a cero es, de manera intrínseca, imposible debido a la mutación espontánea, por lo que el riesgo se establece en términos de un cierto número, múltiplo de la frecuencia de mutación espontánea (ρ)¹⁰. (Frei y Würigler, 1995)

Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico SMART PC- versión 2.1 realizado por Frei y Würigler en 1988, el cual se basa en la prueba no paramétrica de χ^2 . El nivel de ensayo se fija en $\alpha=0.05$.

⁹ Se asume que todas las células se dividen al mismo ritmo, por lo que el tamaño de la mancha debe caer en un número de divisiones (n) que va de 2^0 a 2^n células. Por esta razón las clases de tamaño se agrupan como sigue, 1, 2 3-4, 5-8 9-16, 17-32 células, etc. (Graf U, 1984)

¹⁰ Esto indica cuantas veces debe incrementarse el número de eventos de los tratamientos, con respecto al testigo para considerar una respuesta positiva. Por ejemplo, en radiación es frecuentemente aplicado el riesgo denominado doble dosis $\rho=2$ Frei y Würigler (1988)

natural de venas del ala, (Figura 5.3) y el tamaño y tipo de ésta. (Graf y col, 1984)

Es importante registrar el tamaño de las manchas recobradas ya que teóricamente este refleja el número de divisiones celulares⁹ que ocurrieron después de la inducción del cambio genético en la célula afectada original, por lo que puede ser indicador indirecto de la actividad del compuesto y de la velocidad con que alcanza la célula blanco. También puede indicarnos si existe algún problema con la mitosis o si ocurrió muerte celular, en estos casos el tamaño de las manchas registradas serían menores a lo esperado (Graf, U y col, 1984)

La mutación *mwh* tiene expresividad variable, por lo que es posible encontrar células que forman 2, 3 ó más tricomas. Sin embargo sólo se consideraron en el registro aquellas que presentaron tres o más ya que se ha demostrado que las células con dos tricomas ocurren con frecuencia en larvas transheterocigotas no tratadas. Por convención se considera que dos manchas son independientes cuando se separan entre sí por 3 o más hileras de células normales (Graf, U y col, 1984)

6.- Hipótesis y estadística.

El método estadístico utilizado en este trabajo fue el presentado por Frei y Würgler (1988) el cual hace posible decidir si los datos de las pruebas de células somática en *Drosophila* indican un resultado positivo, débil positivo, negativo o inconcluso.

Para este fin se combinan dos pruebas estadísticas: Una prueba contra la hipótesis nula (H_0); ésta asume que el tratamiento experimental no incrementa la frecuencia de la expresión de los marcadores ocurridos de manera espontánea en el control; y una prueba contra la hipótesis alternativa (H_A); que asume *a priori* que un tratamiento determinado incrementa la frecuencia espontánea por un cierto múltiplo (ρ) de la frecuencia obtenida en el control. Rechazar la H_A establece que la frecuencia de daño en los lotes experimentales permanece relativamente bajo, a un nivel que se puede definir como el nivel mínimo de riesgo de genotoxicidad. Un nivel de riesgo igual a cero es, de manera intrínseca, imposible debido a la mutación espontánea, por lo que el riesgo se establece en términos de un cierto número, múltiplo de la frecuencia de mutación espontánea (ρ)¹⁰. (Frei y Würgler, 1995)

Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico SMART PC- versión 2.1 realizado por Frei y Würgler en 1988, el cual se basa en la prueba no paramétrica de χ^2 . El nivel de ensayo se fija en $\alpha=0.05$.

⁹ Se asume que todas las células se dividen al mismo ritmo, por lo que el tamaño de la mancha debe caer en un número de divisiones (n) que va de 2^0 a 2^5 células. Por esta razón las clases de tamaño se agrupan como sigue: 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 17-32 células, etc. (Graf U, 1984)

¹⁰ Esto indica cuantas veces debe incrementarse el número de eventos de los tratamientos, con respecto al testigo, para considerar una respuesta positiva. Por ejemplo, en radiación es frecuentemente aplicado el riesgo denominado hipótesis nula $\rho=2$ (Frei y Würgler, 1988)

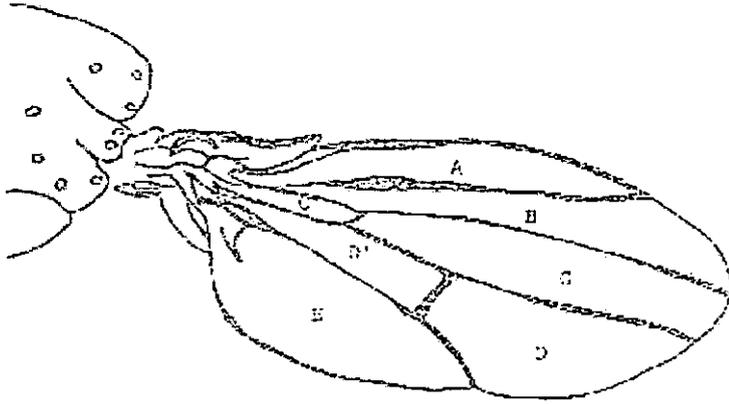


Fig. 5.3 Medio mesotorax de *Drosophila* mostrando la forma en la que se divide el ala para el registro de las manchas (tomado de García - Bellido y Merriam 1971).

En el análisis estadístico las manchas pequeñas (1 o 2 células) se consideran de manera independiente de las manchas grandes (3 células o más), así como de las gemelas. Para asignar resultados significativos, se escoge de manera empírica un factor de multiplicación (se designa m en lugar de p). Se usa $m = 2$ para las manchas totales y para las sencillas; y $m = 5$ para las manchas grandes y las gemelas. (Frei y Würgler, 1995)

El diagnóstico estadístico generado por este programa puede ser cualquiera de los siguientes:

1. Que se acepte la hipótesis nula (H_0) y se rechace la hipótesis alternativa (H_A): negativo.
2. Que se acepte la H_A y se rechace la H_0 : positivo.
3. Que se acepte H_A cuando H_0 es verdadera (Es decir, que el resultado quede muy cerca del área de rechazo): Débil positivo.
4. Que no se rechace H_0 o H_A cuando sea falsa, o que se acepte H_0 o H_A cuando sea verdadera (Este resultado se presenta cuando el tamaño de la muestra es muy pequeño): Inconclusivo.

De acuerdo con Frei y Würgler (1995) para obtener diagnóstico confiable deben registrarse un mínimo de 110 alas. (55 individuos / tratamiento)

7.- RESULTADOS Y ANÁLISIS.

Con los testigos agua desionizada y DMN, la frecuencia de manchas esperada, para ambas cruzas, coincidió con lo previamente reportado por Graf (1984).

Las diferentes concentraciones del PFD, oxidado y sin oxidar, fueron probadas en ambas cruzas de manera simultánea en tres ensayos independientes. No se observaron diferencias significativas entre las repeticiones por lo que los datos se agregaron y se muestran en la Tabla 7.1. Se revisaron un total de 783 individuos y se encontró lo siguiente:

PFD-Oxidado.

En la CBE (Fig. 7.1 y Tabla 7.1 d) las concentraciones 0.001 y 10.0 μM resultaron débilmente positivas para las manchas pequeñas; en las tres concentraciones se encontraron resultados negativos para las grandes y totales e inconclusas para las gemelas. El hecho de que solo las pequeñas resultaran positivas, nos podría indicar que el daño se dio tardíamente por lo que el metabolito, sería el que tendría el efecto genotóxico; o pueden ser causadas por clones con aneuploidias parciales o con baja capacidad de proliferación. Lo que concuerda con lo propuesto por Venitt y col, 1975; Kirkland y Venitt, 1976 y Benedit, 1976; todos estos citados por Burnett, 1978 y Chung y col, 1996; quienes reportan que el PFD es genotóxico (Tabla 2.2 y 2.3 bis).

En la Fig. 7.2 se observa en la concentración 10.0 μM un incremento en la proporción de clones de una sola célula en relación a los otros clones; lo cual se

En el análisis estadístico las manchas pequeñas (1 o 2 células) se consideran de manera independiente de las manchas grandes (3 células o más), así como de las gemelas. Para asignar resultados significativos, se escoge de manera empírica un factor de multiplicación (se designa m en lugar de p). Se usa $m = 2$ para las manchas totales y para las sencillas; y $m = 5$ para las manchas grandes y las gemelas. (Frei y Würigler, 1995)

El diagnóstico estadístico generado por este programa puede ser cualquiera de los siguientes:

1. Que se acepte la hipótesis nula (H_0) y se rechace la hipótesis alternativa (H_A): negativo.
2. Que se acepte la H_A y se rechace la H_0 : positivo.
3. Que se acepte H_A cuando H_0 es verdadera (Es decir, que el resultado quede muy cerca del área de rechazo): Débil positivo.
4. Que no se rechace H_0 o H_A cuando sea falsa, o que se acepte H_0 o H_A cuando sea verdadera (Este resultado se presenta cuando el tamaño de la muestra es muy pequeño): Inconclusivo.

De acuerdo con Frei y Würigler (1995) para obtener diagnóstico confiable deben registrarse un mínimo de 110 alas. (55 individuos / tratamiento)

7.- RESULTADOS Y ANÁLISIS.

Con los testigos agua desionizada y DMN, la frecuencia de manchas esperada, para ambas cruzas, coincidió con lo previamente reportado por Graf (1984).

Las diferentes concentraciones del PFD, oxidado y sin oxidar, fueron probadas en ambas cruzas de manera simultánea en tres ensayos independientes. No se observaron diferencias significativas entre las repeticiones por lo que los datos se agregaron y se muestran en la Tabla 7.1. Se revisaron un total de 783 individuos y se encontró lo siguiente:

PFD-Oxidado.

En la CBE (Fig. 7.1 y Tabla 7.1 d) las concentraciones 0.001 y 10.0 μM resultaron débilmente positivas para las manchas pequeñas; en las tres concentraciones se encontraron resultados negativos para las grandes y totales e inconclusas para las gemelas. El hecho de que solo las pequeñas resultaran positivas, nos podría indicar que el daño se dio tardíamente por lo que el metabolito, sería el que tendría el efecto genotóxico; o pueden ser causadas por clones con aneuploidias parciales o con baja capacidad de proliferación. Lo que concuerda con lo propuesto por Venitt y col, 1975; Kirkland y Venitt, 1976 y Benedit, 1976; todos estos citados por Burnett, 1978 y Chung y col, 1996; quienes reportan que el PFD es genotóxico (Tabla 2.2 y 2.3 bis).

En la Fig. 7.2 se observa en la concentración 10.0 μM un incremento en la proporción de clones de una sola célula en relación a los otros clones; lo cual se

Tabla. 7.1 RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DEL ALA DE DROSOPHILA (SMART)

		Frecuencia de manchas o clones por mosca (Número de manchas por mosca) Diagnóstico estadístico*						Frecuencia de clones en división $\times 10^{-5}$	
Concentración del compuesto en μM	Número de moscas	Manchas sencillas (1-2 células)	Manchas grandes (>2 células)	Manchas gemelas	Manchas totales	Manchas con clones mwh	Media del número de ciclos celulares.	Ciclos de división observados.	Corrección con el control
		m = 2.00	m = 5.00	m = 5.00	m = 2.00				

Cruza: Hembras *flr3/TM3,Bd(S)* y machos *mwh/mwh*. (Estándar)

a) p-fenilendiamina

Testigo alcohol 1.2 %	88	0.62 (55)	0.12 (11)	0.05 (4)	0.80 (70)	61	2.13	2.8	
0.001	37	0.59 (22) -	0.16 (6) -	0.03 (1) -	0.78 (29) -	25	1.92	2.8	-0.1
0.1	45	0.80 (36) -	0.16 (7) -	0.09 (4) i	1.04 (47) -	44	1.98	4.0	1.2
10.0	32	0.69 (22) -	0.16 (5) -	0.03 (1) i	0.87 (28) -	24	1.87	3.1	0.2

b) p-fenilendiamina + H₂O₂ al 6% 1:1

0.001	35	0.77 (27) -	0.09 (3) -	0.06 (2) i	0.91 (32) -	31	1.68	3.6	0.8
0.1	34	0.47 (16) -	0.06 (2) -	0.03 (1) -	0.56 (19) -	13	1.46	1.6	-1.3
10.0	48	0.60 (29) -	0.04 (2) -	0.02 (1) -	0.67 (32) -	32	1.66	2.7	-0.1

Cruza: Hembras *ORR/ORR;flr3/TM3,Bd(S)* y machos *mwh/mwh*. (Bioactivación elevada)

c) p-fenilendiamina

Testigo alcohol 1.2 %	77	0.77 (59)	0.16 (12)	0.01 (1)	0.94 (72)	62	1.79	3.3	
0.001	74	0.59 (44) -	0.18 (13) -	0.04 (3) i	0.81 (60) -	59	1.78	3.3	0.0
0.1	66	0.80 (53) -	0.18 (12) -	0.06 (4) i	1.05 (69) -	66	1.92	4.1	0.8
10.0	44	0.61 (27) -	0.16 (7) -	0.00 (0) i	0.77 (34) -	33	1.94	3.1	-0.2

d) p-fenilendiamina + H₂O₂ al 6% 1:1

0.001	74	0.86 (64) w	0.14 (10) -	0.01 (1) i	1.01 (75) -	72	1.78	4.0	0.7
0.1	60	0.82 (49) -	0.17 (10) -	0.03 (2) i	1.02 (61) -	54	2.00	3.7	0.4
10.0	64	0.95 (61) w	0.14 (9) -	0.05 (3) i	1.14 (73) -	59	1.49	3.8	0.5

Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Wüergler (Mut. Res., 203 (1988) 297-308) : donde:

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

Nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$. (Prueba estadística de una sola cola)

podría explicar con lo anteriormente expuesto.

Estos resultados concuerdan con Rojanapo y col (1986) citado por Burnett; Goldenthal (1988) y Chung y col (1996) quienes reportaron que el compuesto oxidado es genotóxico. Y con Ames y col (1975); Searle y col (1975); Venitt y Searle (1976) citados en Wild y col (1980) quienes coinciden que el PFD es promutágeno. Así como con Gichner y col (1994) lo define como promutágeno débil.

En la CE (Fig. 7.3 y Tabla 7.1 b) se encontraron resultados negativos para todas las clases de manchas y en todas las concentraciones excepto en las manchas gemelas, las cuales resultaron inconclusas a la concentración 0.001 μM . En las dos últimas concentraciones se observan frecuencias incluso menores que las del testigo para todos los grupos de manchas.

En cuanto a la distribución de número de células por clon *mwh*, para la concentración 10.0 μM se observa un número de manchas pequeñas más bajo con respecto al testigo, extendiéndose hacia la derecha la distribución de clones *mwh* (Fig. 7.4 y Tabla 7.1 b).

Estos resultados con la CE que tiene los núcleos de P450 regulador refuerzan la idea de que el compuesto oxidado es un promutágeno, que requiere ser metabolizado por el citocromo P450.

PFD-Sin oxidar.

Las concentraciones utilizadas del PFD-sin oxidar resultaron no genotóxicas, en ambas cruzas y para todas las categorías de manchas (Fig.7.5 y Tabla 7.1 a y c) Las manchas gemelas resultaron inconclusas en ambas cruzas. En ambas cruzas se tuvo el mismo comportamiento, excepto para la concentración más alta (10.0 μM .)

En la CBE disminuyen las frecuencias en manchas pequeñas y totales, en las concentraciones 0.001 y 10.0 μM , incluso por debajo de los testigos. El caso de la concentración 10.0 μM merece atención especial debido a que disminuyeron las frecuencias, así como también la sobrevivencia (44 moscas, Tabla 7.1 c) En esta concentración (10.0 μM) en la CBE con el PFD-sin oxidar (Fig.7.6) disminuyeron las frecuencias de los clones *mwh* con respecto a los otros tratamientos y el testigo. Además la distribución de los clones *mwh* tiende hacia la derecha. Se encontraron la frecuencia de individuos con 17 a 32 células *mwh*, se incrementaron 5 veces con respecto al testigo; probablemente esto signifique que el compuesto a esta concentración, tuviera un efecto tóxico (disminuyó la sobrevivencia y la frecuencia de manchas). Las moscas que sobrevivieron pudieran ser resistentes y el hecho de que la distribución de clones *mwh* tienda a la derecha se deba a que el daño se dio de manera temprana. Por lo que podría tratarse de un falso negativo.

En la CE, se encuentra un ligero incremento, no significativo estadísticamente, en las manchas pequeñas y totales para la concentración de 0.1 μM (Fig. 7.7) En la Figura 7.8 se observa un aumento en el número de clones

Fig. 7.1 Cruza bioactivación elevada con PFD - oxidado por tipo de mancha.

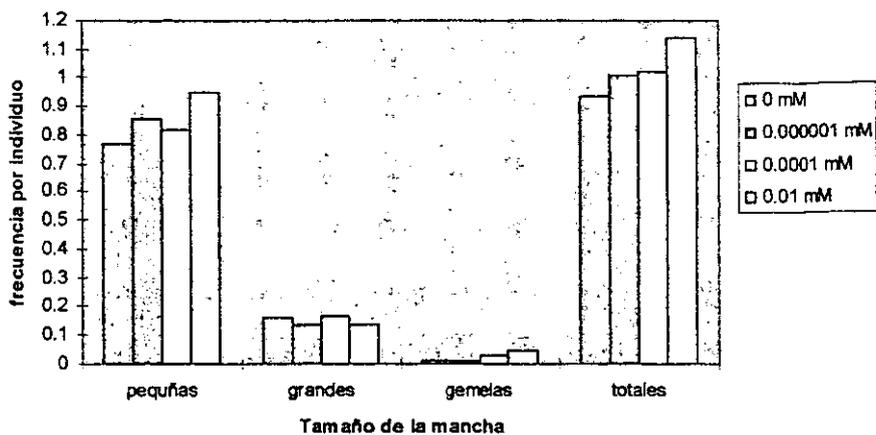


Fig. 7.2 Cruza bioactivación elevada con PFD-oxidado por clones mwh.

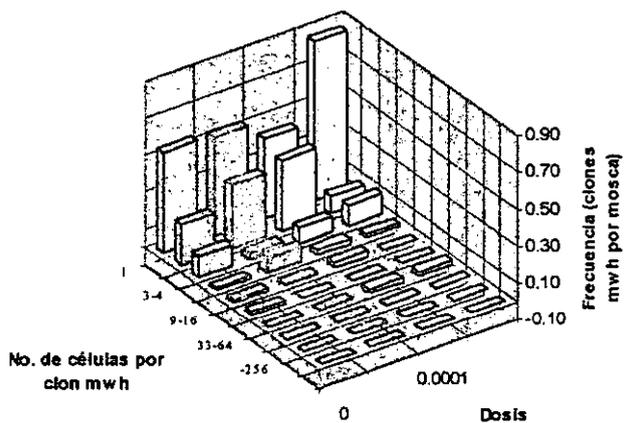


Fig. 7.3 Cruza estandar con PDF-oxidado por tipo de mancha.

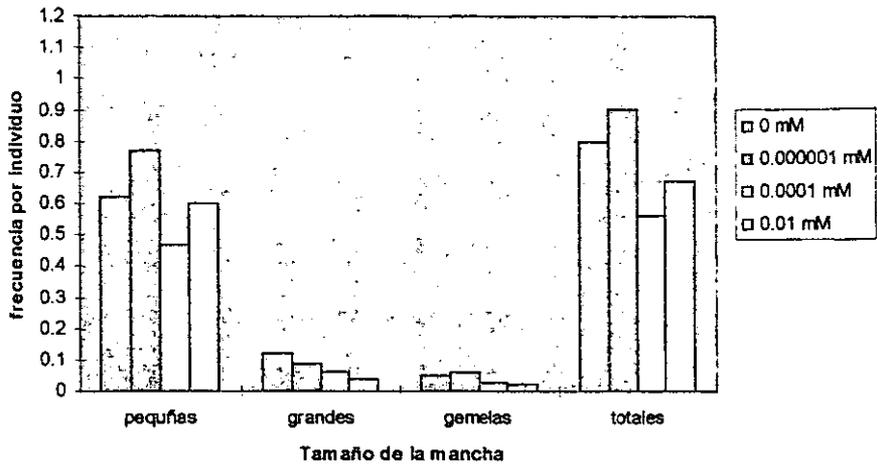


Fig. 7.4 Cruza estandar con PFD - oxidado por clones mwh.

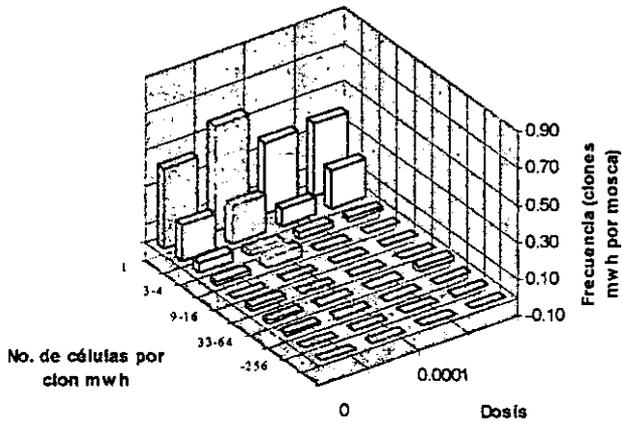


Fig. 7.5 Cruza bioactivación elevada con PFD por tipo de mancha .

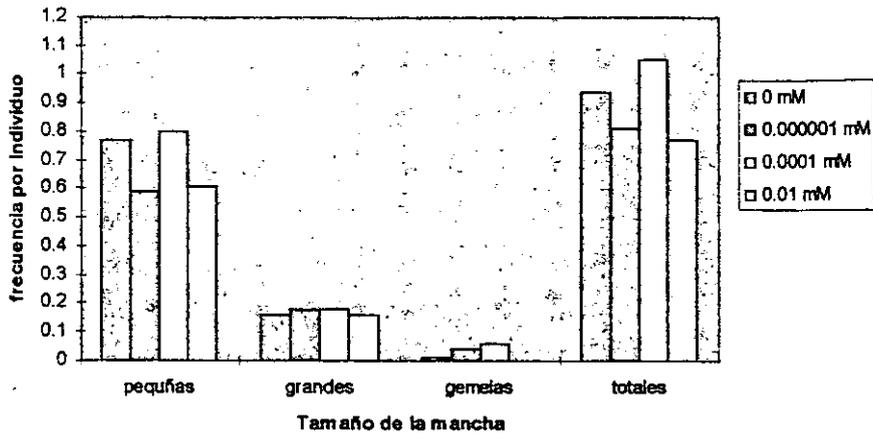


Fig. 7.6 Cruza bioactivación elevada con PFD por clones mwh

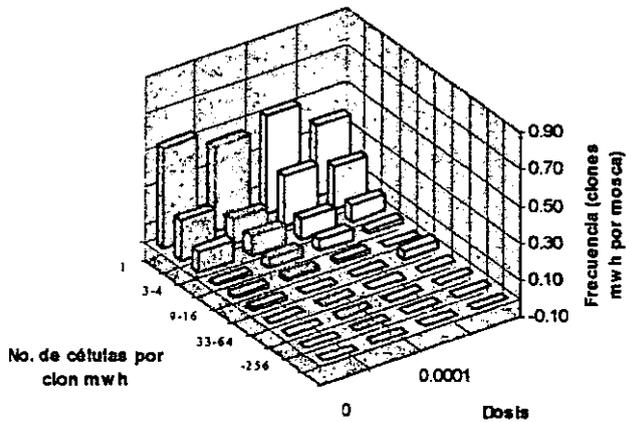


Fig. 7.7 Cruza estandar con PFD por tipo de mancha.

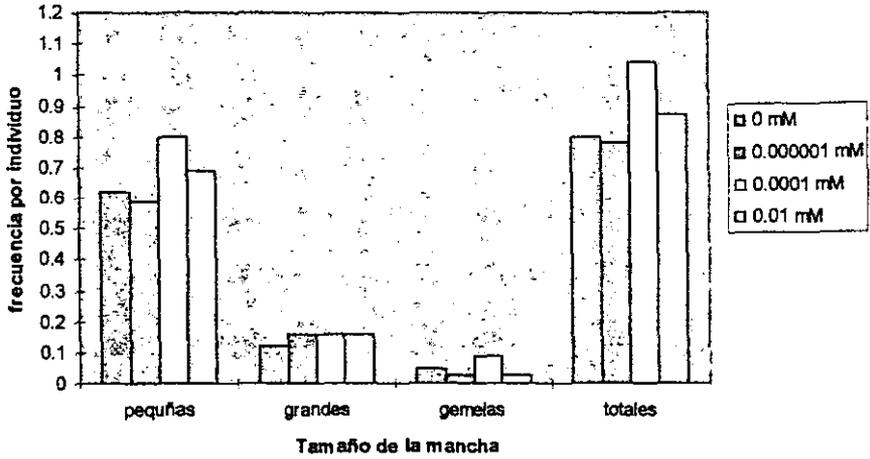
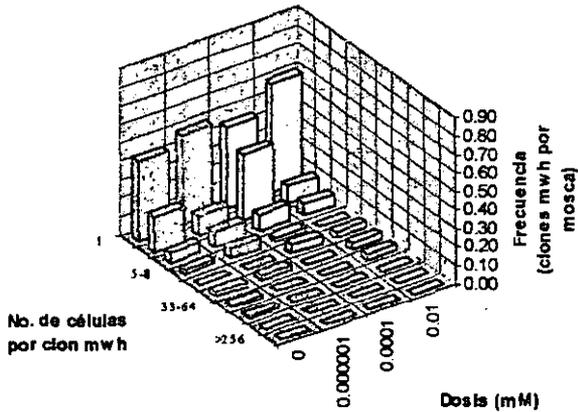


Fig. 7.8 Cruza estandar con PFD por clones mwh.



de células pequeñas y en la concentración 10.0 μM la distribución de los clones tiende hacia la derecha. Además en el clon de 33 -64 células hay 3 veces más individuos con respecto al testigo.

El único antecedente que tenemos para este compuesto con esta prueba es el trabajo de Batiste-Alentorn (1995) quienes en un ensayo del ala con SMART (utilizando únicamente la cruz estándar y el compuesto sin oxidar) obtuvieron resultados positivos. Las concentraciones que usaron fueron mucho más altas y (1 y 2 mM.) que las utilizadas en este trabajo, la dosis es 10 mil veces más alta que la reportada por Burnett a la que están expuestos los usuarios. Nosotros calculamos la dosis basándonos en Burnett (1977) (40 mg/Kg), quien menciona que otros trabajos resultaron positivos porque los investigadores utilizaron en un solo ensayo concentraciones notablemente más altas que las que contienen los tintes (Goldenthal, 1988)

8.- CONCLUSIONES.

Por lo anterior en este ensayo, con estas concentraciones, y alimentando las larvas con el PFD oxidado y sin oxidar los resultados fueron negativos. No se demuestran efectos genotóxicos, aún considerando que las larvas estuvieron expuestas crónicamente al compuesto por 48 horas.

En la concentración 0.001 μM del PFD-oxidado y sin oxidar, los valores para las frecuencias de todos los tipos de mancha son muy similares en ambas cruces, incluso el comportamiento de las frecuencias y distribución de clones *mwh* por mosca son prácticamente los mismos. Posiblemente estos resultados se debieron al hecho de que esta dosis fue muy baja y no hubo diferencia en los tratamientos con respecto al testigo.

En la CBE y PFD-oxidado en que resultó débilmente positivo se sugiere realizar pruebas estadísticas paramétricas y no paramétricas más finas para determinar si las diferencias que se observan en SMART y que no resultaron significativas o no para esta prueba, son consistentes.

La concentración de 10.0 μM resultó la más interesante en todos los tratamientos, lo que sugiere que si se incrementara la concentración se podrían observar resultados positivos; sin embargo no lo consideramos adecuado, ya que las concentraciones utilizadas corresponden a lo que un ser humano se aplicaría al momento de teñirse, por lo que sería alejarse de la exposición real.

de células pequeñas y en la concentración 10.0 μM la distribución de los clones tiende hacia la derecha. Además en el clon de 33 -64 células hay 3 veces más individuos con respecto al testigo.

El único antecedente que tenemos para este compuesto con esta prueba es el trabajo de Batiste-Alentorn (1995) quienes en un ensayo del ala con SMART (utilizando únicamente la cruz estándar y el compuesto sin oxidar) obtuvieron resultados positivos. Las concentraciones que usaron fueron mucho más altas y (1 y 2 mM.) que las utilizadas en este trabajo, la dosis es 10 mil veces más alta que la reportada por Burnett a la que están expuestos los usuarios. Nosotros calculamos la dosis basándonos en Burnett (1977) (40 mg/Kg), quien menciona que otros trabajos resultaron positivos porque los investigadores utilizaron en un solo ensayo concentraciones notablemente más altas que las que contienen los tintes (Goldenthal, 1988)

8.- CONCLUSIONES.

Por lo anterior en este ensayo, con estas concentraciones, y alimentando las larvas con el PFD oxidado y sin oxidar los resultados fueron negativos. No se demuestran efectos genotóxicos, aún considerando que las larvas estuvieron expuestas crónicamente al compuesto por 48 horas.

En la concentración 0.001 μM del PFD-oxidado y sin oxidar, los valores para las frecuencias de todos los tipos de mancha son muy similares en ambas cruces, incluso el comportamiento de las frecuencias y distribución de clones *mwh* por mosca son prácticamente los mismos. Posiblemente estos resultados se debieron al hecho de que esta dosis fue muy baja y no hubo diferencia en los tratamientos con respecto al testigo.

En la CBE y PFD-oxidado en que resultó débilmente positivo se sugiere realizar pruebas estadísticas paramétricas y no paramétricas más finas para determinar si las diferencias que se observan en SMART y que no resultaron significativas o no para esta prueba, son consistentes.

La concentración de 10.0 μM resultó la más interesante en todos los tratamientos, lo que sugiere que si se incrementara la concentración se podrían observar resultados positivos; sin embargo no lo consideramos adecuado, ya que las concentraciones utilizadas corresponden a lo que un ser humano se aplicaría al momento de teñirse, por lo que sería alejarse de la exposición real.

9.- BIBLIOGRAFIA.

1. Ashraf W.; Dawling S.; Farrow L.J. (1994) **Systemic paraphenylenediamine (PPD) poisoning: A case report and review.** Human & Experimental Toxicology. 13(3):167-170. (Resumen)
2. Batiste-Alentorn, M.; Xamena, N.; Creus, A. and R. Marcos. (1995) **Genotoxicity testing of five compounds in three *Drosophila* short-term somatic assays.** Mutation Research 341:161-167.
3. Blair A.; Linos A.; Stewart PA.; Burmeister L.F.; Gibson R.; Everett G.; Schuman L.; Cantor KP. (1992) **Comments On Occupational And Environmental Factors In The Origin Of Non-Hodgkin's Lymphoma.** Cancer Research. 52(19 SUPPL.):5501-5502. (Resumen)
4. Boffetta P.; Andersen A.; Lynge E. (1994) **Employment As Hairdresser And Risk Of Ovarian Cancer And Non-Hodgkin's Lymphomas Among Women.** Journal of Occupational Medicine 36(1):61-65. (Resumen)
5. Bourquia A., Jabrane A.J., Ramdani B. and Zaid D. (1988) **Toxicité systémique de la p-phenylenediamine. Quatre observations.** Presse Med. 17(35):1798-1800. (Resumen)
6. Brown L.M.; Everett G.D.; Burmeister L.F.; Blair A. (1992) **Hair Dye Use And Multiple Myeloma In White Men.** American Journal of Public Health 82(12):1673-1674.
7. Burnett, C., R. Loehr y J. Corbett (1977) **Dominant lethal mutagenicity study on hair dyes.** Journal of Toxicol. and Environmental Health, 2:657-662.
8. Burnett, C., Jacobs, M. M., Seppala, A., Shubik, P. (1980). **Evaluation of the toxicity and carcinogenicity of hair dyes.** Journal of Toxicology and Environmental Health. 6:247-257.
9. Burnett C. (1987) **Hair Dye Safety and Toxicology.** En: *Cosmetic Safety: A primer for cosmetic scientists.* Ed. By James H Wittam. *Cosmetic Science and Technology series V.* 5
10. Burnett, C. M; Corbett, J. F. (1987) **Failure of short-term *in vitro* mutagenicity tests to predict the animal carcinogenicity of hair dyes.** Fd. Chem. Toxic. 25 (9):703-707.
11. Burnett, C.M; y Goldenthal, E.I: (1988) **Multigeneration reproduction and carcinogenicity studies in sprague-dawley rats exposed topically to oxidative hair-colouring formulations containing p-phenylenediamine and other aromatic amines.** Fd Chem. Toxic. 26:5 467-474.
12. Cantor KP.; Blair A.; Everett G.; VanLier S.; Burmeister L.; Dick Fr.; Gibson RW.; Schuman L. (1988) **Hair Dye Use And Risk Of Leukemia And Lymphoma.** American Journal of Public Health 78(5):570-571.
13. Carolina biological supply company. **Carolina *Drosophila* manual**
14. Clark, A. M. (1982) **The use of larval stages of *Drosophila* in screening for some naturally occurring mutagens.** Mutation Research 2:89-97.
15. Colditz-GA 1994 **Hair dye and cancer: reassuring evidence of no association (editorial; comment)** Journal of the National Cancer Institute. 86(3):164-165. (Resumen)
16. Chung K.T.; Murdock C.A.; Zhou Y.; Stevens S.E.Jr; Wei C.I.; Fernando S.Y.; Chou M.W. (1996) **Effects of the nitro group on mutagenicity and toxicity of some benzamines.** Environ. Mol. Mutagen. 27(1):67-74. (Resumen)
17. Cheung Y. L.; Snelling J.; Mohammed N. N.; Gray T. J.; Ioannides C. (1996) **Interaction with the aromatic hydrocarbon receptor, CYP1A induction, and mutagenicity of a series of diaminotoluenes: implications for their carcinogenicity.** Toxicology & Applied Pharmacology. 139(1):203-211. (Resumen)
18. Delgado-Rodríguez, A., Villalobos-Pietrini, R., Gómez-Arroyo, S. y Graf, U. (1994), **Meeting Report. Latin American Workshop on Genetic Toxicology. I. *Drosophila melanogaster*.** Mutation Research 312(1994) 193-194.
19. Delgado-Rodríguez A., Ortíz-Matelo, R., Graf, U., Villalobos-Pietrini R., y Gómez-Arroyo S. (1995) **Genotoxic activity of environmental important polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro derivatives in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*.** Mutation Research 341 (1995) 235-247.

20. Ferguson L.R.; Robertson A.M.; Berriman J. (1990) Direct-acting mutagenic properties of some hair dyes used in New Zealand. Mutation Research Sep., 245 (1):41-46. (Resumen)
21. Frei, H., y F.E. Würgler. (1995) Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. Mutation Research 334(1995)247-258.
22. Gichner-T; López-G-C; Wagner-E-D; Plewa-M-J. (1994) Induction of somatic mutation in *Tradescantia* clon 4430 by three phenylenediamine isomers and the antimutagenic mechanisms of diethyldithiocarbamate and ammonium metavanadate. Mutation Research, 306 (2):165-172. (Resumen)
23. Graf, U.; Würgler, F.E.; Katz, A.J.; Juon, H.; Hall, C.B; Kale, P.G. (1984). Somatic Mutation and Recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environmental mutagenesis. 6:153-188.
24. Graf, U.; y Schaik, N. (1992). Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Mutat Res., 271: 59-67.
25. Graf, U.; Singer, D. (1992). Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Rev. Int. Contam. Ambient. 8(1):15-27.
26. Graf, U. y F.E. Würgler (1996) The Somatic white-ivory Eye Spot Test Does Not Detect the Same Spectrum of Genotoxic Events as the Wing Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. Environmental and Molecular Mutagenesis 27:219-226.
27. Graf, U., Spanó, M. A., Guzmán-Rincon, J. Abraham, S. K. y Andrade, H. H. (1996). The wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds and complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. Second Conference of Pan-African Environmental Mutagen Society (PAEMS). 23-25 Jan. 1996. Manuscript for the African Newsletter on Occupational Health and Safety.
28. Greiner TC.; Medeiros LJ.; Jaffe ES. (1995) Non-Hodgkin's Lymphoma. Cancer (Philadelphia) 75(1 SUPPL.):370-380. (Resumen)
29. Grodstein-F; Hennekens-C-H; Colditz-G-A; Hunter-D-J; Stampfer-M-J (1994) A prospective study of permanent hair dye use and hematopoietic cancer. Journal of the National Cancer Institute (Bethesda) 86(19):1466-1470. (Resumen)
30. Grover I.S. Bala, S. (1993). Studies on antimutagenic effects of guava (*Psidium guajava*) in *Salmonella typhimurium*. Mutation Research 300(1):1-3. (Resumen)
31. Guzmán-Rincón J ; Graf U. (1995) *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. Pletum Press. : 169-181.
32. Hällström, I.; Magnusson J.; and C. Ramel (1982) Relation between the somatic toxicity of dimethylnitrosamine and a genetically determined variation in the level and induction of cytochrome P450 in *Drosophila melanogaster*. Mutation Research 92:161-168.
33. Hardell L.; Moss A.; Osmond D.; Volberding P. (1987) Exposure To Hair Dyes And Polychlorinated Dibenzo P-Dioxins in AIDS Patients With Kaposi Sarcoma: An Epidemiological Investigation. Cancer Detect Prev. Suppl. 1987 1:567-570. (Resumen)
34. Herrinton, L.J.; Weis, N.S.; Koepsell, T.D.; Daling, J.R.; Taylor, J.W.; Lyon, J.L.; Swanson, G.M.; Greenberg, R.S. (1994). Exposure to hair-coloring products and the risk of multiple myeloma. American Journal of Public Health 84(7):1142-1144. (Resumen)
35. Holly EA. Lele C. Bracci PM. (1998) Hair-Color Products And Risk For Non-Hodgkin's Lymphoma: A Population-Based Study In The San Francisco Bay Area. American Journal of Public Health. 88(12):1767-73. (Resumen)
36. Howe, G.R. Burch, J.D. Miller, A.B. Cook, G.M. Esteve, J. (1980). Tobacco use, occupation, coffee, various nutrients, and bladder cancer. Journal of the National Cancer Institute. 64(Apr):701-713. (Resumen)

37. Ido M.; Nagata C.; Kawakami N.; Shimizu H.; Yoshida Y.; Nomura T.; Mizoguchi H. (1996) A case-control study of myelodysplastic syndromes among Japanese men and women. Leukemia Research. 20(9):727-31. (Resumen)
38. Inoue, M. and U. Murakami (1977) Teratogenicity of 2,5-diaminotoluene. A hair-dye constituent in mice. Fd. Cosmet. Toxicol. 15: 447-451.
39. John E.M.; Savitz D.A.; Shy C.M. (1994) Spontaneous abortions among cosmetologists. Epidemiology. 5(2):147-155. (Resumen)
40. Jouhar, A.J. (1982). Hair dye absorption. Soap, Perfumery & Cosmetics. 55(Nov):564-565, 576. (Resumen)
41. Kerckaert G.A.; LeBoeuf R.A.; Isfort R.J. (1998) Assessing the predictiveness of the Syrian hamster embryo cell transformation assay for determining the rodent carcinogenic potential of single ring aromatic/nitroaromatic amine compounds. Toxicological Sciences. 41(2):189-97. (Resumen)
42. Kiese,M; Ranchor, M; Rauscher,E: (1968). The absorption of some phenylenediamines through the skin of dogs. Toxicol and applied pharmacol. 12: 495-507.
43. Kinlen, L.J.; Harris, R.; Garrod, A.; Rodriguez, K. (1977) Use of hair dyes by patients with breast cancer: case control study. British Medical Journal. 2(Aug 6):366-368.
44. Koenig, K.L.; Pasternack, B.S.; Shore, R.E.; Strax, P. (1991). Hair dye use and breast cancer: A case-control study among screening participants. American Journal of Epidemiology. 133(10):985-995.
45. Lahbabi M.S.; Nejari M.; Benomar S. (1998) Intoxication accidentelle d'un nourrisson a la paraphenylene diamine. Archives de Pediatrie. 5(10):1168-1169. (Resumen)
46. Lawrence,P,a (1992) The marking of fly, The genetics of animal desing. Blacwell Scientific Publication. USA.
47. Lifshits N., Yagupsky P. and Sofer S. (1993) Fatal p-phenylenediamine (hair dye) intoxication in a child resembling Ludwig's angina. J. Toxicol. Clin. Toxicol. 33(4):653-656. (Resumen)
48. Mele-A; Szklo-M; Visani-G; Stazi-MA; Castelli-G; Pasquini-P; Mandelli-F (1994). Hair dye use and other risk factors for leukemia an pre-leukemia: a case-control study. Italian Leukemia Study Group. American Journal Epidemiol. 139(6):609-619. (Resumen)
49. Nagata, C.; Shimizu, H.; Hirashima, K.; Kakishita, E.; Fujimura, K.; Niho, Y.; Karasawa, M.; Oguma, S.; Yoshida, Y.; Mitzoguchi, H. (1999) Hair Dye Use And Occupational Exposure To Organic Solvents As Risk Factors For Myelodysplastic Syndrome. Leukemia Research. 23(1):57-62. (Resumen)
50. Najem, R. G; Louria, D.B; Seebode, J. J; Thind, I. S; Prusakowski, J. M; Ambrose, R. B; Fernicola, A. R. (1982) Life Time Occupation, Smoking, Caffeine, Saccharine, Hair Dyes and Bladder Carcinogenesis. Int. Journal Epidemiology. 11(3): 212-217.
51. Nasca P.C.; Baptiste M.S.; Field N.A.; Metzger B.B.; DeMartino R. (1992) An epidemiological case-control study of breast cancer and exposure to hair dyes. Ann Epidemiol (UNITED STATES) 2(5):577-86. (Resumen)
52. National Institute of Health, U.S. Ed., Hair Coloring & Risk Of Cancer. Feb. 1, 1994. haircolor@organicasalon.com
53. Nomura, A., Kolonel, L.N. and C.N. Yoshizawa. (1989) A Brief Original Contribution: Smoking, Alcohol, Occupation, and Hair Dye Use in Cancer of the Lower Urinary Tract. Am. J. Epidemiol. 130(6):1159-63.
54. Olshan-AF; Breslow-NE; Falletta-JM; Grufferman-S; Pendergrass-T; Robison-LL; Waskerwitz-M; Woods-WG; Vielti-TJ; Hammond-GD (1993) Risk factors for Wilms tumor. Report from the National Wilms Tumor Study. Cancer 72(3):938-944. (Resumen)
55. Osterlind A, Tucker MA, Stone BJ, Jensen OM (1988) The Danish case-control study of cutaneous malignant melanoma. IV. No association whit nutritional factors, alcohol, smoking or hair dyes. Int. J. Cancer 42(6):825-828. (Resumen)
56. Pearce N.; Bethwaite P. (1992) Increasing Incidence Of Non-Hodgkin's Lymphoma: Occupational And Environmental Factors. Cancer Research. 52(19 SUPPL.):5496-5500. (Resumen)

57. Ramos, P y colaboradores. (1993). **Manual de laboratorio de Genética para *Drosophila melanogaster***. Schaum. Mcgraw-hill. México.
58. Roeleveld-N; Zielhuis-G-A; Gabreels-F (1993) **Mental retardation and parental occupation: A study on the applicability of job exposure matrices.** British Journal of Industrial Medicine 50(10): 945-954. (Resumen)
59. Rosales, A.A; Dueñas, G.I. (1997) **Determinación de la LD50 del p-fenilendiamina en tres líneas de *D. melanogaster* y colaboración en el mantenimiento de las mismas.** Lab Genética Toxicológica. ENEP Iztacala UNAM. Servicio Social.
60. Saner, C., Weibel, B., Würzler, F.E. and Sengstag Ch. (1996) **Metabolism of Promutagens Catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 Enzyme in *Sacharomyces cerevisiae*.** Environmental and Molecular Mutagenesis 27:46-58.
61. Sardas S. Aygun N. Karakaya AE. (1997) **Genotoxicity studies on professional hair colorists exposed to oxidation hair dyes.** Mutation Research. 394(1-3):153-61. (Resumen)
62. Shahin M-M (1994) **Structure-activity relationship within various series of p-phenylenediamine derivatives.** Mutation Research 307(1):83-93. (Resumen)
63. Shibata A; Sasaki R; Hamajima N; Aoki K. (1990) **Mortality of hematopoietic disorders and hair dye use among barbers.** Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi 53(1):116-118. (Resumen)
64. Shipp J.J. (1992) **Hair-care products.** En: Chemistry and technology of the cosmetic and toiletries industry. Editado por: D.F. Williams and W.H. Schmitt, Blackie Academic & Professional N.Z., U.K.
65. Shore, RE. Pasternack, BS. Thiessen, EU. Sadow, M. Forges, R. (1979). **Case control study of hair dye use and breast cancer.** Journal of the National Cancer Institute. 62(Feb):277-283. (Resumen)
66. Sir Hashim M., Hamza Y.O., Yahia B., Khogali F.M. and Suieman G.I. (1992) **Poisoning from henna dye and p-phenylenediamine mixtures in children in Khartoum.** Ann. Trop. Pediatr. 12(1):3-6. (Resumen)
67. Skov T; Andersen A; Malker H; Pukkala E; Weiner J; Lynge E. (1990). **Risk for cancer of the urinary bladder among hairdressers in the Nordic countries.** Am. J. Ind. Med. 17(2):217-23. (Resumen)
68. Skov T.; Lynge E. (1994) **Cancer Risk Exposures To Carcinogens In Hairdressers.** Skin Pharmacology 7(1-2):94-100. (Resumen)
69. Sood A.K.; Yadav S.P.; Sood S.; Malhotra R.C. (1996) **Hair dye poisoning.** Journal of the Association of Physicians of India. 44(1):69. (Resumen)
70. Spitz MR.; Fueger JJ.; Goepfert H.; Newell GR. (1990) **Salivary Gland Cancer. A Case-Control Investigation Of Risk Factors.** Arch Otolaryngol. Head Neck Surg. 116(10):63-66 Oct 1990. (Resumen)
71. Stavraký, KM. Clarke, EA. Donner, A. (1979). **Case control study of hair dye use by patients with breast cancer and endometrial cancer.** Journal of the National Cancer Institute. 63(Oct):941-945. (Resumen)
72. Sullivan, J. W. (1982). **Epidemiological survey of bladder cancer in greater New Orleans.** Journal of Urology. 128(2):281-283. (Resumen)
73. Tanaka M. Wayda K. Molnar J. Motohashi N. (1996) **Antimutagenicity of benzo[a]phenothiazines in chemically induced mutagenesis.** Anticancer Research. 16(6B):3625-3628. (Resumen)
74. Thun, M.J.; Altekruse, S.F.; Namboodiri, M.M.; Calle, E.E.; Myers, D.G. and C.W. Heath, Jr. (1994) **Hair Dye Use And Risk Of Fatal Cancers In U.S. Women.** Journal of the National Cancer Institute 86(3):210-215. (Resumen)
75. Tzonou A.; Polychronopoulou A.; Hsiesh CC.; Rebelakos A.; Karakatsani A.; Trichopoulos D. (1993) **Hair Dyes, Analgesics, Tranquilizers And Perineal Talc Application As Risk Factors For Ovarian Cancer.** International Journal of Cancer. Sep. 30 1993 55(3):408-410. (Resumen)

76. Vogel E.W. (1991) **Genotoxic Chemicals. An Introduction into Basic Principles of Genetic Toxicology.** Apuntes del Primer Taller Latinoamericano en Genética Toxicológica en *Drosophila melanogaster.*. Tlaxcala, Méx. Sin publicar.
77. Wang L.L.; Li S.L.; Qin Y.H.; Xu F.D.; Wang Z.S.; Song X.D.; Li J. (1991) **Studies on the mutagenicity of hair dyes made in China.** Biomed Environ Sci 4 (3):310-316. (Resumen)
78. Watanabe T; Hirayama T; Fukui S. (1990) **Mutagenicity of commercial hair dyes and detection of 2,7-diaminophenazine.** Mutation Research 244 (4):303-308. (Resumen)
79. Wild, D.; Ming-Tzan, K.; and Eckhardt, K. (1980) **Cytogenetic Effect of Ortho-Phenylenediamine in the Mouse, Chinese Hamster, and Guinea Pig and Derivatives, Evaluated by the Micronucleus Test.** Arch. Toxicol. 43, 249-255.
80. Wilson P.D.; Loffredo C.A.; Correa-Villasenor A. Ferencz C. (1998) **Attributable fraction for cardiac malformations.** American Journal of Epidemiology. 148(5):414-423. (Resumen)
81. Yagi H.; el Hendi A.M.; Diab A.; Elshikh A.A. (1996) **Paraphenylenediamine induced optic atrophy following hair dye poisoning.** Human & Experimental Toxicology. 15(8):617-618. (Resumen)
82. Zahm SH.; Weisenburger DD.; Babbitt PA.; Saal RC.; Vaught JB.; Blair A. (1992) **Use Of Hair Coloring Products And The Risk Of Lymphoma, Multiple Myeloma, And Chronic Lymphocytic Leukemia.** American Journal of Public Health. 82(7):990-997.