

00361  
2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS

“VALORACION GENOTOXICA DEL ACETATO DE  
PLOMO Y LA DIMETILNITROSAMINA (DMN) EN  
LAS CRUZADAS AB Y ST DE *Drosophila melanogaster*  
PRETRATADAS CON FENOBARBITAL, MEDIANTE  
LA PRUEBA DE SMART”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P R E S E N T A

BIOL. MARIA DE JESUS LAURA CASTAÑEDA PARTIDA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. JUDITH ISABEL GUZMAN-RINCON

MEXICO, D. F.

DICIEMBRE, 2003

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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.

## DEDICATORIAS

A Ti mi Dios, por tomarme de la mano y traerme hasta acá. No lo podría haber hecho sin Ti. Gracias por tu amor, por responderme y por rodearme del cariño y apoyo de mis seres queridos y amigos.

A Ángel, mi amado esposo y compañero, el "aire bajo mis alas", por tu infinita paciencia y apoyo ilimitado para que siguiera creciendo y fortaleciéndome en todos sentidos. Porque tuviste la inteligencia para hablar cuando debías hablar y guardaste silencio cuando debías callar.

A mis amados padres, por su amor y apoyo incondicionales, por cuidar a mis hijos con tanto amor cuando lo necesité estos años, pero sobre todo, porque me han tenido más fé que la que yo me he tenido. Espero seguir honrándolos siempre.

A mi amada hija Melissa, por las horas y los días que te quité de bebida persiguiendo esta meta. Por los momentos que me perdí de ti pero atesoraron tus abuelos. Porque sé que me observas. Porque espero estés orgullosa de mí y darte ejemplo junto a tu hermano.

A mi amado hijo Rodrigo, por el tiempo que te he robado estos años, porque has crecido viéndome trabajar en "la tesis", por tu interés en ella y porque yo sé que te alegras conmigo por cruzar la meta. Porque todo lo que se empieza debe terminarse.

A mis hermanos Mario y César con todo cariño con el amor y admiración mutuos.

A mis sobrinos Carla, Arturo, Marco Antonio y a mis cuñadas.

A mi amada y bella abuela Antonia, raíz fuerte.

A mis amados abuelos Antonio y Melchor que forman una de mis dos mitades.

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

NOMBRE: Maria de Jesus  
Carolina Estrada

FECHA: 13-Ene-2003

FIRMA: [Firma manuscrita]



## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Judith Guzmán-Rincón por aceptar dirigir este trabajo de tesis. Por su amistad, cariño y gran paciencia para conmigo. Por entender todos los momentos que experimenté estos años y por sus palabras de aliento. Gracias querida maestra.

Al Dr. Ulrich Graf por su afecto, apoyo y todo el tiempo dedicado para la revisión y comentarios críticos sobre este trabajo. Mille grazie Uell!

A los doctores miembros del jurado: Dr. Rafael Villalobos-Pietrini, Dra. Rosario Rodríguez-Arnáiz, Dra. Patricia Ramos y Dra. Ma. Esther De la Rosa por su tiempo y gentileza para conmigo, la revisión cuidadosa del trabajo y sus expertos comentarios que mucho lo enriquecieron. Gracias a todos Uds.

Al M. en C. Ángel Durán Díaz por su asesoría estadística en los experimentos de LC<sub>50</sub> y pruebas de U de Mann-Whitney. Gracias por toda tu experiencia y los conocimientos académicos que me has transmitido.

Al Biól. Miguel Ángel Pérez del C.R.A.P.A. de la FES. Iztacala por su gentil apoyo en la elaboración y mejoramiento de las imágenes de esta tesis. Gracias por tu tiempo y tu talento Miguel Ángel.

A la M. en C. Irma Elena Dueñas por el mejoramiento de las gráficas con el programa "excel". Gracias amiga.

Al Dr. Salvador Rodríguez Zaragoza por su amistad y el tiempo dedicado para la lectura de esta tesis. Gracias por las "dudas" Salvador.

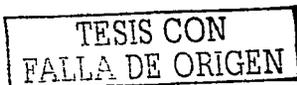
A la M. en C. Tzazná Hernández por su gentil ayuda en la elaboración de las fórmulas químicas. Gracias mil Nany.

## **MUY ESPECILAMENTE...**

A la M. en C. Ma. Eugenia Heres Pulido, maestra, jefe, colega, amiga. Te agradezco por permitirme subir a este barco hace 8 años, por tu apoyo y tus palabras de ánimo en momentos muy duros. Porque me has apreciado tanto y lo has demostrado en los dichos y en los hechos.

A la M. en C. Irma Elena Dueñas, también maestra, colega y amiga. Por todo lo que hemos recorrido, por todos los buenos momentos y las risas juntas compartiendo esta "locura" en compañía de Maru. Porque he tenido la oportunidad y el tiempo de conocerte y apreciarte. Por todo tu cariño y apoyo. ¡Porque siempre sonries y nunca te enojas!

Gracias Señor, porque en este tiempo aprendí que la Biología es mi carrera profesional, que la célula viva es una joya, que no he perdido la capacidad de asombro y que mientras más conozco más entiendo que nada sé pero Tú hiciste los cielos y la Tierra con sabiduría y entendimiento. GRACIAS POR TODO. Eres mi tesoro.



## RESUMEN

Con el objetivo de valorar el efecto genotóxico del acetato de plomo (AcPb), el promutágeno alquilante dimetilnitrosamina (DMN) y el inductor de síntesis del grupo hemo y citocromos P450 (Cit P450), fenobarbital (FB), se utilizaron larvas transheterocigotas de *Drosophila melanogaster* de 48 h de vida de las cruza BE (bioactivación elevada) con altos niveles constitutivos de Cit P450 y E (estándar) con síntesis regulada de Cit P450 de la prueba SMART en el ala para someterlas a pretatamiento (24 h) con y sin AcPb (1, 0.1 y 0.01 mM), con y sin FB (12 mM) y AcPb+FB en cotratamiento. También se sometieron a tratamientos tipo AcPb/DMN, FB/DMN y AcPb+FB/DMN donde la DMN (0.076 mM) se administró a las larvas de 72 h crónicamente (48 h) y hasta la emergencia de los imagos. Éstos fueron fijados en alcohol al 70 %, se disectaron las alas y se montaron en preparaciones permanentes para observar bajo el microscopio óptico a 40 x buscando la presencia de clones (manchas) de tricomas tipo *mwh* y *flr* que son los marcadores genéticos de la prueba que evidencian el daño genotóxico de los tratamientos. Los datos se analizaron en el programa estadístico SMART y con la prueba de U de Mann-Whitney (STATISTICA 6.0).

El AcPb resultó genotóxico pues arrojó frecuencias de manchas pequeñas estadísticamente significativas en la cruz E aunque no se reflejó el efecto en las frecuencias totales de manchas/mosca de ambas cruza; en la cruz BE no se observó efecto porque el AcPb parece ser eliminado vía los Cit P450 con altos niveles de concentración en esta cruz. El FB mostró actividad genotóxica; esto se reporta por primera vez para en la cruz E de la prueba SMART en *Drosophila melanogaster*; en la cruz BE no mostró efecto porque el FB es metabolizado los Cit P450. La DMN tuvo mayor efecto genotóxico para la cruz BE (por su síntesis constitutiva de los Cit P450 que la activan y convierten en genotoxina) que en la cruz E. El cotratamiento AcPb+FB no mostró efecto genotóxico en la cruz BE y sorpresivamente tampoco en la cruz E porque el FB parece inhibirse y/o anularse con el AcPb, mediante precipitación de un fenobarbitato plúmbico, excepto a la concentración más baja (0.01mM), lo que se reporta por primera vez para la prueba SMART. El tratamiento AcPb/ DMN fue genotóxico en ambas cruza lo que sugiere indirectamente que el AcPb no altera la síntesis del grupo hemo ni interviene en la síntesis de los Cit P450 ya que la DMN es activada y ejerce efecto genotóxico. El tratamiento FB/ DMN fue genotóxico en ambas cruza; en BE, sin efecto sinérgico, porque el FB es eliminado por los Cit P450 pero que sí activan la DMN; para E, con efecto sinérgico, porque el FB induce la síntesis regulada de los Cit P450, tiene actividad genotóxica mientras estos se sintetizan, lo eliminan y además activan la DMN. El tratamiento AcPb+FB/ DMN fue genotóxico en ambas cruza: en BE el efecto se debió exclusivamente a la DMN y en E a la acción sinérgica entre FB y DMN y AcPb a la concentración más baja, reduciéndose la frecuencia a la mitad según aumenta el AcPb que se anula con el FB, en congruencia con el cotratamiento AcPb+FB.

**Nota:** Cuando este trabajo de tesis fue registrado en la División de Posgrado de la Facultad de Ciencias de la UNAM en el título se usó la abreviatura AB (Alta Bioactivación) para referirse a la cruz a HB (High Bioactivation) en inglés. De la misma manera, se utilizó la abreviatura ST (Standard) en inglés para referirse a la otra cruz a utilizada en la prueba SMART.

Durante la elaboración de esta tesis, los especialistas mexicanos de la Toxicología Genética acordaron llamar BE (Bioactivación Elevada) a la anterior AB (HB, en inglés) y, por otro lado, denominaron E (Estándar) a la ST (Standard, en inglés).

No siendo posible hacer un cambio de título rápido, doy fé de las diferencias entre las abreviaturas de las cruces en el título de tesis (AB y ST) y las abreviaturas de las cruces a lo largo del texto de este trabajo (BE y E), esperando no confundir al lector.

**Atte.**

**Biól. Laura Castañeda Partida.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Abreviaturas**

**BE: Bioactivación Elevada**

**E: Estándar**

**DMN: Dimetilnitrosamina**

**FB: Fenobarbital**

**AcPb: Acetato de plomo**

**Cit P450: Citocromos P450 - Complejo enzimático**

**mM: milimoles**

**UV: Ultravioleta**

**CHO: Chinese Hamster Ovary**

## INDICE

<b>1. TOXICOLOGÍA GENÉTICA</b>	<b>9</b>
1.1. Antecedentes	9
1.2. Inducción de daño genético: importancia del metabolismo	11
<b>2. AGENTES ALQUILANTES</b>	<b>14</b>
2.1. Formación de aductos entre el ADN y los agentes alquilantes	14
2.2. Sustitución de pares de bases después de la alquilación en el O <sup>6</sup> de la guanina	15
2.3. Compuestos N-nitrosos	15
2.4. Nitrosaminas	15
2.4.1. Dimetilnitrosamina (DMN)	16
2.4.2. Biotransformación de la DMN	16
2.4.3. Estudios con DMN	17
2.4.4. DMN y Fenobarbital (FB)	18
2.4.5. DMN y Acetato de plomo (AcPb)	18
<b>3. CITOCROMOS P450</b>	<b>19</b>
3.1. Desintoxicación y metabolismo de xenobióticos (biotransformación)	19
3.2. Antigüedad, presencia en seres vivos y nomenclatura de los Cit P450	20
3.3. Polimorfismo genético del sistema Cit P450 y sus consecuencias	21
3.4. Cit P450 en <i>Drosophila melanogaster</i>	22
3.4.1. Cit P450, <i>Drosophila melanogaster</i> y DMN	22
3.4.2. Genes del sistema Cit P450 en <i>Drosophila melanogaster</i> (Cyp6A2)	22
3.5. Cit P450 y activación de nitrosaminas	24
<b>4. FENOBARBITAL</b>	<b>25</b>
4.1. FB como inductor de enzimas metabolizadoras de xenobióticos: Cit P450	25
4.2. Inhibición de la inducción del FB	26
4.3. Capacidades cancerígena, mutagénica y de metilación de ADN del FB	26
4.4. FB y receptores nucleares	27
4.5. Inducción de los Cit P450 en <i>Drosophila melanogaster</i> por FB	28
<b>5. GRUPO HEMO</b>	<b>29</b>
5.1. Grupo hemo de insectos	31
5.2. Regulación de la síntesis del grupo hemo	31
5.3. Grupo hemo y el sistema Cit P450	31
5.4. Grupo hemo, Cit P450 y FB	32
5.5. Grupo hemo, Cit P450 y AcPb	32
5.6. Grupo hemo y <i>Drosophila melanogaster</i>	32
<b>6. PLOMO Y ACETATO DE PLOMO</b>	<b>34</b>
6.1. Plomo	34
6.1.1. Vías de absorción y distribución del Pb <sup>2+</sup> en el cuerpo	34
6.1.2. Distribución en el ambiente	35
6.1.3. Propiedades tóxicas y genotóxicas	36
6.1.4. Efectos genotóxicos	36
6.1.5. Efectos bioquímicos	38
6.1.6. Efecto sobre vías metabólicas	39
6.1.7. Carcinogénesis del Pb <sup>2+</sup>	39
6.2. Acetato de plomo: Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	41
6.2.1. Desarrollo y crecimiento	41
6.2.2. Efectos bioquímicos	42
6.2.3. Efecto genotóxico	42
6.2.4. Carcinogénesis del AcPb	43

<b>7. PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICAS (SMART)</b>	<b>44</b>
<b>8. <i>Drosophila melanogaster</i></b>	<b>45</b>
8.1. Características y ciclo de vida	45
8.2. <i>Drosophila melanogaster</i> y los metales (AcPb)	46
8.3. <i>Drosophila melanogaster</i> , nitrosaminas (DMN) y SMART	46
8.4. <i>Drosophila melanogaster</i> , FB y Cit P450	47
<b>9. BASES GENÉTICAS DE LOS EFECTOS DETECTADOS EN LA PRUEBA SMART EN EL ALA DE <i>Drosophila melanogaster</i></b>	<b>49</b>
9.1. Líneas y marcadores	51
9.2. Cruzas de Bioactivación Elevada (BE) y Estándar (E)	53
9.3. Tratamientos	54
9.4. Preparaciones permanentes	55
9.5. Tipos de clones (manchas)	55
9.6. Tamaño de los clones (manchas)	58
9.7. Registro de datos y criterios de lectura.	59
9.8. Hipótesis y estadística	60
<b>10. HIPÓTESIS</b>	<b>61</b>
<b>11. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>61</b>
<b>12. OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>61</b>
<b>13. MATERIALES</b>	<b>62</b>
<b>14. MÉTODOS</b>	<b>63</b>
14.1. LC <sub>50</sub>	63
14.2. SMART	63
<b>15. RESULTADOS</b>	<b>66</b>
15.1. Toxicidad LC <sub>50</sub>	66
15.2. SMART	69
15.3. Cruza BE. Gráficas de tipos de manchas (pequeñas, grandes, gemelas) y de tamaño de clon <i>mwh</i>	76
15.4. Cruza E. Gráficas de tipos de manchas (pequeñas, grandes, gemelas) y de tamaño de clon <i>mwh</i> .....	82
15.5. Frecuencias totales de manchas/ mosca en SMART con tratamientos experimentales como testigo	88
<b>16. DISCUSION</b>	<b>89</b>
<b>17. CONCLUSIONES</b>	<b>97</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>98</b>



# 1. TOXICOLOGÍA GENÉTICA

## 1.1. Antecedentes

La Toxicología Genética es una especialidad que se encarga de identificar y analizar la acción de los agentes cuya toxicidad recae en el material hereditario de los seres vivos. Detecta y comprende las propiedades de un grupo relativamente pequeño de agentes conocidos como genotoxinas, los cuales afectan específicamente el ADN. El término genotóxico fue introducido en la década de los setenta por Ehrenberg (citado en Vogel, 1991) y se aplica a los agentes tóxicos que afectan el material hereditario abarcando cambios letales y hereditarios en células somáticas o germinales.

El inicio de la Toxicología Genética se puede situar en 1927 cuando Müller demuestra que los rayos X son capaces de producir cambios en el material genético de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. En 1940, Auerbach descubre la acción mutagénica del gas mostaza, también en *D. melanogaster*. Durante los siguientes 20 años fue demostrado en animales el cambio genético inducido por radiaciones y agentes químicos. Estos trabajos dieron la pauta para que se pensara que algunas de las enfermedades hereditarias observadas en poblaciones humanas tenían un origen ambiental (Vogel, 1991).

La Toxicología Genética fue reconocida como disciplina alrededor de 1969, cuando se empezó a relacionar el incremento en el ambiente de los productos químicos fabricados por el hombre, con sus posibles consecuencias genéticas. Simultáneamente, se empezó a observar una relación entre los mutágenos y los cancerígenos, lo que realizó la importancia de la Toxicología Genética en la determinación de los efectos adversos en la salud que pueden producir los compuestos genotóxicos, por su capacidad de ocasionar mutaciones hereditarias o infertilidad, cuando afectan a las células germinales o producir muerte celular y cáncer cuando alteran a las células somáticas. En otras palabras, la Toxicología Genética estudia la secuencia de eventos desde la interacción de la genotoxina con el ADN hasta la expresión fenotípica final del daño (Vogel, 1991).

A lo largo de estas décadas se ha estudiado intensamente la capacidad genotóxica (mutagénesis, recombinogénesis, clastogénesis, carcinogénesis y actividad apoptótica) de diferentes agentes a los que las poblaciones humanas están más expuestas, pero también se ha hecho evidente la necesidad de encontrar métodos y biomarcadores para detectar agentes con actividad antimutagénica y anticancerígena, es decir, que inhiban, retarden o reviertan estos procesos (Graf *et al.*, 1998; Lohman *et al.*, 2001).

En el primer caso, las guías o rutas críticas para los estudios genotóxicos persiguen varios objetivos; por ejemplo, en la Comunidad Económica Europea el Programa de Desarrollo e Investigación Ambiental tiene como metas: 1) la caracterización del perfil metabólico y genotóxico de agentes químicos, 2) el desarrollo de nuevas tecnologías adecuadas para la identificación y la evaluación del riesgo de la exposición a las genotoxinas y 3) la validación de los actuales ensayos de genotoxicidad y la evaluación de su uso en actividades reguladoras de la comunidad tales como la clasificación y etiquetamiento de compuestos químicos (Parry, 1988). Ejemplos de la primera meta son el uso del biomonitorio de daño en humanos mediante la cuantificación de aductos de ADN (O<sup>6</sup>-guanina) producidos por un determinado compuesto o grupo químico de compuestos (Margison *et al.*, 1979; Hemminki, 1997; Goto *et al.*, 1999) y la novedosa tecnología de los microarreglos en el campo de la Toxicogenómica para el análisis de expresión génica que examina múltiples genes y vías de señalización simultáneamente para entender los mecanismos tóxicos, lo que impactará el campo de la Salud Pública. Lo anterior, depende de que los perfiles de expresión génica que corresponden a los diferentes agentes químicos puedan distinguirse (Hamadeh *et al.*, 2002 a). En la segunda meta, los programas automatizados para la predicción de la capacidad

mutagénica o cancerígena de compuestos basados exclusivamente en la estructura química han arrojado información, pero a la vez, han resultado limitados (Richard, 1998); los ensayos con compuestos estructuralmente relacionados (isómeros o análogos) revelan que la actividad genotóxica depende de la posición del grupo químico (van Schaik y Graf, 1991; 1993; Frei *et al.*, 1992; Ukawa-Ishikawa *et al.*, 1997; Dueñas-García, 2002; Rodríguez-Arnaiz y Tellez, 2002;) o que la actividad se pierde cuando se sustituyen los grupos (Glende *et al.*, 2002); también se hacen esfuerzos para monitorear la recombinación mitótica homóloga que causa la pérdida de heterocigosis (Frei *et al.*, 1998; Spanó *et al.*, 2001; Hooker *et al.*, 2002) y las aberraciones cromosómicas estructurales pues ambos fenómenos involucran rompimientos en la doble cadena (efecto clastogénico) en células somáticas *in vivo* (Gómez-Arroyo *et al.*, 1995; Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini, 1995; Calderón-Segura *et al.*, 1998; Vogel y Nivard, 1999).

Finalmente, los ensayos genotóxicos tienen como objetivo principal evidenciar qué tipo de daño o a qué nivel de organización del ADN opera el efecto causado por el compuesto evaluado (Vogel, 1991; Sánchez Lamar *et al.*, 2000). Así, se reconocen:

**MICROLESIONES.** Cambios intragénicos o mutaciones génicas que son cambios en genes individuales. Consisten principalmente de sustituciones de pares de bases o cambios de inclusión/delección de pares de bases.

Nivel I.- *Mutaciones genéticas:* cambio de uno o pocos pares de bases.

- a) Mutaciones de sustitución de pares de bases: cambio cualitativo en uno o más pares de nucleótidos. Todas las combinaciones de sustituciones de pares de bases son posibles; las sustituciones de purina por purina y pirimidina por pirimidina se designan *transiciones* mientras que las sustituciones de purina por pirimidina y de pirimidina por purina se llaman *transversiones*.
- b) Mutaciones de corrimiento de lectura: Cambio cuantitativo en uno o más pares de nucleótidos.

## MACROLESIONES

Nivel II.- *Aberraciones cromosómicas estructurales:* cambios gruesos en la estructura por delecciones, rearrreglos, recombinaciones.

*Aberraciones numéricas:* aneuploidías y poliploidías por afectaciones en los componentes del aparato mitótico o meiótico.

Nivel III.- *Ateraciones (daño) al ADN:* formación de aductos.

- a) Rompimientos de banda de ADN: radiación ionizante, radiación ultravioleta (UV), Bleomicina.
- b) Dímeros de pirimidina: UV de onda corta.
- c) Alquilación de base: agentes alquilantes.
- d) Entrecruzamientos inter e intra bandas o cadenas de ADN: UV de onda larga.
- e) Intercalación: Proflavina.

Nivel IV.- *Daño a los mecanismos de reparación del ADN:* incrementando la sensibilidad a los efectos de muchos mutágenos.

La Tabla I muestra algunos ensayos o pruebas genotóxicas utilizadas para el estudio del daño genético inducido en los diferentes Niveles.

**Tabla I. Pruebas genotóxicas (modificado de Sánchez Lamar *et al.*, 2000).**

**Nivel I. Ensayos para mutaciones génicas.**

- Prueba de Ames (*Salmonella typhimurium*/microsomos de mamífero).
- Prueba de mutaciones puntuales en *Saccharomyces cerevisiae*.
- Letales recesivos ligados al sexo en *Drosophila melanogaster*.
- Prueba de mutación y recombinación somática en *Drosophila melanogaster* (SMART).
- Prueba de mutación de los pelos estaminales de *Tradescantia*.

**Nivel II. Ensayos para mutaciones cromosómicas.**

- Prueba citogenética *in vitro* en células de mamíferos.
- Prueba citogenética *in vivo* en ratones.
- Prueba de micronúcleos (ratones y células de ovario de Criceto Chino: CHO).
- Prueba de letales dominantes en ratones.
- Prueba de mutación y recombinación somática en *Drosophila melanogaster* (SMART): deleciones y aneuploidías parciales.
- Prueba citogenética de las células merestimáticas de la raíz de *Vicia faba*.

**Nivel III. Ensayos para daño primario al ADN.**

- Prueba de segregación mitótica en *Aspergillus nidulans*.
- Prueba de conversión génica y recombinación mitótica en *Saccharomyces cerevisiae*.
- Prueba de mutación y recombinación somática en *Drosophila melanogaster* (SMART).
- Prueba de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) *in vitro* con células de mamíferos.

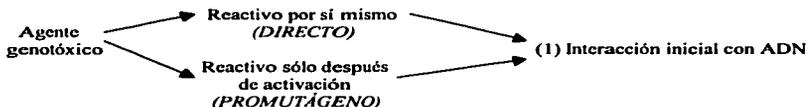
**Nivel IV. Otros ensayos.**

- Prueba de la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratones.
- Prueba de mutación y recombinación somática en *Drosophila melanogaster* (SMART): detección de recombinación mitótica.

**1.2. Inducción de daño genético: importancia del metabolismo**

La inducción de daño genético por agentes genotóxicos es un proceso de pasos múltiples: la interacción química, reparación o no del daño al ADN y efectos biológicos.

(1) **Interacción química** (principalmente de enlaces covalentes) con el ADN. Los agentes genotóxicos pueden ser ligados directamente al ADN o solamente después de que su estructura ha sido modificada por enzimas. Por ello, se les divide en *directos* (los verdaderos agentes genotóxicos) porque reaccionan con macromoléculas (ADN y proteínas) sin activación enzimática y en *precursores* o *promutágenos* si requieren activación metabólica. Los agentes genotóxicos precursores no poseen actividad genotóxica *per se*, pero son convertidos en agentes genotóxicos por el metabolismo de organismos susceptibles (Fig. 1a).



**Fig. 1a. Interacción química entre mutágenos y ADN (tomado de Vogel, 1991).**

Los agentes genotóxicos precursores comprenden una amplia gama de compuestos químicos estructuralmente no relacionados. La mayoría de estos agentes químicos son lipofílicos a pH fisiológico. La excreción eficiente de los compuestos lipofílicos por parte de los mamíferos requiere su conversión metabólica en metabolitos hidrofílicos. En muchos casos esta *biotransformación* es un proceso de pasos múltiples, que resulta en la formación de agentes genotóxicos a través de intermediarios definidos como agentes genotóxicos próximos.

La mayoría (más del 80 %) de los agentes genotóxicos (los promutágenos y los procancerígenos), no son capaces de formar aductos de ADN directamente cuando entran al cuerpo. Sin embargo, el metabolismo de un tejido blanco (hígado, riñón, testículos) puede transformar estas moléculas en metabolitos químicamente lábiles y altamente reactivos, que se ligan a macromoléculas, entre las que están el ADN y las proteínas. Tradicionalmente, se distinguen dos tipos de metabolismo llamados *Fase I* (oxidación, hidrólisis o reducción) y *Fase II* (reacciones de conjugación. Las enzimas relacionadas con estos procesos son llamadas a menudo *enzimas metabolizadoras* o *enzimas metabolizadoras de xenobióticos* (Tabla 2).

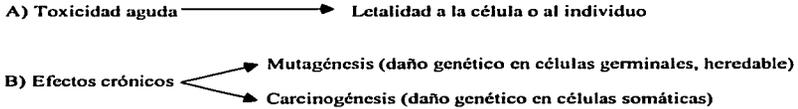
**Tabla 2. Enzimas involucradas en el metabolismo de xenobióticos (tomado de Wolf, 1990)**

Sistema de Enzimas	Abreviatura común	No. de genes	Reacciones	Ubicación
Citocromos P450	CYP450	>50	Oxidación del C, N y S	mitocondria-microsomas
Citocromo P450 reductasa	QR	1	Reducción de un electrón	microsomas
Quinona reductasa	GST	>10	Reducción de quinonas	citósol y microsomas
Glutatión S- transferasa	EH	1	Conjugación electrofílica con glutatión	citósol y microsomas
Epóxido hidrolasa	UDPGT	> 5	Hidratación de epóxidos	citósol y microsomas
UDP glucoronil transferasa		> 5	Conjugación de ac. glucurónico con -OH, -NH	microsomas
Sulfotransferasa	SULT	> 2	Conjugación de SO <sub>3</sub> a -OH, -NH	citósol
N(O- acetil transferasa)	NAT	> 2	Transfere acetil a -NH, -OH	citósol

**(2) Los mecanismos específicos de reparación de ADN** pueden lograr remover o no los aductos formados a través de las interacciones con los agentes genotóxicos.

Formación de aductos → Proceso de daño a ADN → Expresión de daño

**(3) Si el daño genético queda mal reparado o se deja sin reparar puede dar lugar a efectos biológicos (Fig. 1b).**



**Fig. 1b. Efectos biológicos del daño al ADN (tomado de Vogel, 1991).**

## 2. AGENTES ALQUILANTES

Uno de los grupos de mutágenos mejor conocido es el de los *agentes alquilantes*. El primer agente mutagénico descubierto, el gas mostaza, pertenece a esta categoría. Estos agentes químicos transfieren grupos alquilo a macromoléculas biológicamente importantes (ADN, ARN, proteínas). Dos propiedades son muy importantes para su modo de acción: el *tipo* de grupo alquilo transferido, ya sea un etilo ( $-\text{CH}_2 \text{CH}_3$ ), generando una especie *etilante*, un metilo ( $-\text{CH}_3$ ), generando una especie *metilante* u otro complejo como ( $-\text{CH}_2 \text{COCH}_3$ ) y el *número* de grupos alquilo que una sola molécula puede donar. Así, pueden ser *monofuncionales*, *bifuncionales* y *trifuncionales*. La mayoría de los agentes alquilantes conocidos son mutágenos directos y pocos son *indirectos* o *promutágenos* que requieren activación enzimática (Vogel, 1991).

### 2.1. Formación de aductos entre el ADN y los agentes alquilantes

Todos los oxígenos y nitrógenos en los ácidos nucleicos (excepto el nitrógeno ligado al azúcar) pueden ser alquilados; esto suma 20 sitios diferentes. El punto de ataque más frecuente es el  $\text{O}^6$  de la guanina pero también un efecto secundario de la alquilación del N-7 de la guanina es una pérdida del enlace entre la base y la cadena azúcar-fosfato, llevando a la pérdida de la guanina del ADN alquilado. Los espacios o brechas apurínicas (sitios AP) así creados dan como resultado la escisión de la cadena en la cual ocurren y eventualmente, la escisión de doble cadena (rompimiento de la cadena de ADN) (Vogel, 1991) (Fig. 2).

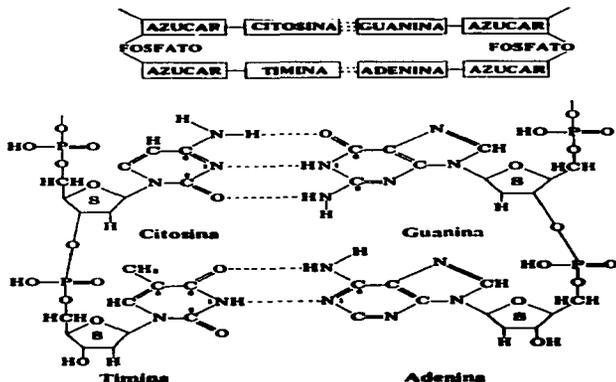


Fig. 2. Posibles sitios de ataque de los agentes alquilantes en la doble hélice de ADN (tomado de Burke, 1971).

## 2.2. Sustitución de pares de bases después de la alquilación en el O<sup>6</sup> de la guanina

Actualmente se acepta de manera general que la alquilación del O<sup>6</sup> de la guanina es una fuente primaria de mutación a través de mala codificación (miscoding) directa. La alquilación de la guanina en el átomo O<sup>6</sup>, esto es, uno de los aceptores de un enlace hidrógeno en la guanina fija un tautómero anómalo (dos enlaces hidrógeno en lugar de tres, en una guanina no modificada), así un sitio esencial se bloquea.

La modificación del sitio O<sup>6</sup> de la guanina es una lesión premutagénica porque la consecuencia de esta modificación es una inhabilidad para formar un par de base específica (C-G) y, si no se repara, esto puede llevar a la incorporación de una T en lugar de una C (transición C-T) durante la replicación del ADN. Las vías de reparación de ADN por agentes alquilantes son, por ejemplo:

- a) Reparación por escisión de bases: productos de alquilación.
- b) Remoción de grupos alquilo sin incisión (respuesta adaptativa): O<sup>6</sup>-alquilguanina.
- c) Reparación de O<sup>6</sup>-alquilguanina por proteína alquiltransferasa (Pegg, 2000).

## 2.3. Compuestos N-nitrosos

Algunos de los más potentes mutágenos y cancerígenos conocidos son productos naturales. Se sabe desde hace 40 años que los compuestos N-nitrosos están presentes en los alimentos tratados con nitrito de sodio, el cual convierte en hepatotóxicos ciertos alimentos para los organismos a través de la formación de nitrosodimetilamina (NDMA). Desde entonces, se ha comprobado con experimentos animales que los compuestos N-nitrosos son el grupo de cancerígenos más potente y de más amplia acción (Kawai, 1998). El papel principal del nitrito y los óxidos de nitrógeno en la formación de compuestos N-nitrosos por la interacción con compuestos amino secundarios y terciarios ha llevado a la investigación mundial de alimentos con presencia de compuestos N-nitrosos, los cuales han sido encontrados casi exclusivamente en aquellos alimentos que contienen nitrito o que han sido expuestos a óxidos de nitrógeno. Entre éstos se encuentran las carnes curadas (especialmente tocino cocinado), pescado japonés ahumado o curado y cerveza. Los niveles de nitrosaminas se han reducido en las últimas tres décadas de manera concurrente con una baja en el nitrito usado en los alimentos y mayor control de exposición de la malta a óxidos de nitrógeno en la fabricación de cerveza. Las pequeñas cantidades de nitrosaminas en los alimentos son, sin embargo, significativas debido a la posibilidad de que los humanos sean más susceptibles a estos cancerígeno que los roedores de laboratorio (Lijinsky, 1999). Gómez *et al.* (1977) ya habían demostrado que pequeñas cantidades de dimetilnitrosamina (DMN) en la dieta (40 µg/kg de peso corporal) no inducían tumores renales o metilación de ADN en ratas porque el hígado metaboliza completamente la DMN que llega por la vena porta sin alcanzar la circulación general.

## 2.4. Nitrosaminas

Las N-nitrosaminas son un grupo grande de agentes químicos muchos de los cuales se sabe que tienen actividades genotóxicas potentes. Está comprobado que algunos requieren ser metabolizados por las enzimas del sistema Cit P450 hasta especies reactivas antes de poder causar daño (Robertson *et al.*, 1983; Hakura *et al.*, 1999). Muchas nitrosaminas y otros compuestos N-nitrosos son citotóxicos y cancerígenos, mutagénicos y teratogénicos y otros son usados en la quimioterapia del cáncer. Un amplio rango de especies es susceptible a su acción cancerígena la cual puede afectar varios órganos (Magee, 1980), incluso a niveles finos como la modulación de la respuesta de la

proteína p53 al daño al ADN por dietilnitrosamina (Finnberg *et al.*, 2000). Las nitrosaminas tales como la DMN se pueden formar, en presencia de nitrito, a través de nitrosación de aminas secundarias y terciarias (como dimetilamina) a pH bajo (3.4) y en pH neutro por ciertas bacterias reductoras de nitrato.

#### 2.4.1. Dimetilnitrosamina (DMN)

El representante más sencillo de las nitrosaminas, la dimetilnitrosamina o DMN (Fig. 3), es un líquido amarillo, muy soluble en agua, alcohol y éter. Su fórmula química es  $(\text{CH}_3)_2\text{NNO}$  y su PM 74.08. Tiene viscosidad baja y densidad de 1.0048. Agudamente tóxica, la  $\text{LC}_{50}$  en ratas es de 32.2-40.0 mg/kg (Windholz *et al.*, 1995; Magee, 1980).

La DMN es usada como solvente en la industria del plástico y la fibra, como aditivo para lubricantes, en la preparación de solventes y como nematocida (Murillo, 1997). Por otro lado, Sen *et al.*, 1973 (citado en Windholz *et al.*, 1995) encontraron DMN presente en productos cárnicos curados, en especial tocino cocinado, en algunos alimentos preservados con nitrito en un rango de concentración de 1-10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Vogel, 1991), condensados de humo de tabaco, pescado frito o ahumado (Fazio *et al.*, 1971; Rhoades y Johnson, 1972 en Windholz *et al.*, 1995).

La DMN es un agente alquilante monofuncional indirecto que requiere activación metabólica y ha demostrado ser mutagénica y cancerígena en distintas especies animales y diversos tejidos (Magee, 1980; Vogel, 1991).

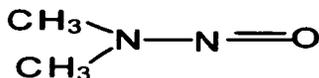


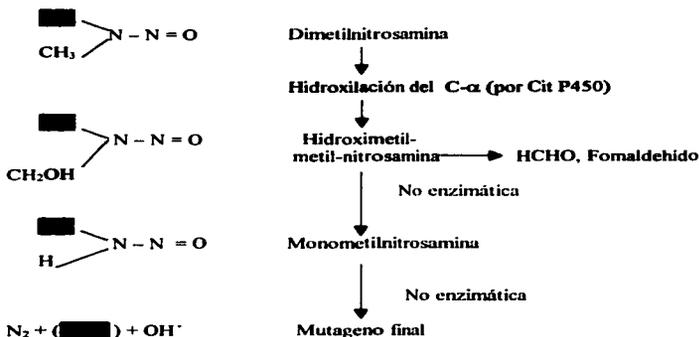
Fig. 3. Molécula de dimetilnitrosamina (DMN).

La DMN produce tumores en ratones, predominantemente en el hígado, pero también en el riñón y el pulmón. Como agente alquilante monofuncional, la DMN tiene actividad *clastogénica* que es resultado predominantemente de su reacción con átomos de nitrógeno en el ADN. Forma aductos de  $\text{O}^6$ -metilguanina, lo que provoca *microlesiones* tipo transiciones G:C $\rightarrow$ A:T (Vogel, 1991; Wang *et al.*, 1998).

Estos aductos en la posición  $\text{O}^6$  de la guanina son un factor importante en la actividad cancerígena, mutagénica, clastogénica (Pegg, 2000) y apoptótica (Horn, 2000 a, b) de los agentes metilantes (alquilantes).

#### 2.4.2. Biotransformación de la DMN

La DMN es metabolizada mediante hidroxilación del átomo C- $\alpha$  que produce una hidroximetil-metil-nitrosamina inestable. Esto desemboca espontáneamente (mediante pasos en cascada) en un ión carbonio ( $\text{CH}_3^+$ ) que es la supuesta especie reactiva. Por otro lado, la biotransformación de la DMN produce un intermedio de monometilnitrosamina reactivo (Haggerty y Holsapple, 1990 en Rodríguez-Arnáiz *et al.*, 1996; Vogel, 1991) (Fig. 4).



**Fig. 4. Biotransformación de la dimetilnitrosamina (DMN)**  
(tomado de Vogel, 1991).

#### 2.4.3. Estudios con DMN

La DMN ha sido estudiada por casi 40 años. Desde entonces, sus propiedades químicas y biológicas como agente mutagénico, clastogénico, apoptótico y cancerígeno han permitido a su vez utilizarla en diferentes estudios a diversos niveles.

- \* La DMN es activada por microsomas de *Drosophila melanogaster* igual que en el ensayo de Ames, cepas de *E. coli* y células de Ovario de Criceto Chino (Baars *et al.*, 1980).
- \* La DMN induce una frecuencia de 21 % de letales recesivos ligados al sexo (LRLS) en *Drosophila melanogaster* (Müller y Habertzettl, 1980).
- \* La DMN tiene una actividad recombinogénica de 67 % en cruizas de la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) en *Drosophila melanogaster* (Rodríguez-Arnaiz *et al.*, 1996).
- \* La DMN no mostró efecto en el ensayo cometa (EC) para detectar rompimientos de banda en células de exudado de peritoneo de ratón (Nishi *et al.*, 1990).
- \* La DMN estudiada en el ensayo de micronúcleos (MN) en médula ósea de ratón tenía 5 reportes positivos y 4 negativos en la bibliografía especializada. Morrison y Ashby (1994) condujeron experimentos con dosis letales y no letales (máxima tolerada) que revelaron la necesidad de considerar cuidadosamente la selección de dosis-niveles en ensayos de genotoxicidad de corto plazo *in vivo*.
- \* La DMN induce fibrosis hepática en ratas y ratones (Savolainen *et al.*, 1988; Nakamura *et al.*, 2000).

#### **2.4.4. DMN y Fenobarbital (FB)**

Klaunig *et al.* (1988) y Weghorst *et al.* (1989) estudiaron el efecto del FB en la evolución de carcinogénesis hepatocelular en cepas de ratones machos infantiles pretratados con DMN. Los resultados mostraron que el FB promueve la tumorogénesis dependiendo de la cepa y el cancerígeno inicial. La mezcla FB-DMN es sinérgica en ratones.

#### **2.4.5. DMN y Acetato de plomo (AcPb)**

Ishibe *et al.* (1970) demostraron que el tratamiento con acetato de plomo (AcPb) y DMN produce cáncer en ratas. Por otra parte, Sakai *et al.* (1990) comprobaron que la administración de AcPb a ratones pretratados con DMN promueve la tumorogénesis de pulmón.

### 3. CITOCROMOS P450

#### 3.1. Desintoxicación y metabolismo de xenobióticos (biotransformación)

El Retículo Endoplásmico Liso (REL) está involucrado en diferentes procesos celulares, que incluyen desintoxicación de drogas, metabolismo de carbohidratos, almacenamiento de calcio y biosíntesis de esteroides como hormonas sexuales y de la corteza adrenal (Becker *et al.*, 2000).

Una reacción de las vías de desintoxicación de drogas y biosíntesis de esteroides es la hidroxilación, la adesión de grupos hidroxilo a moléculas aceptoras orgánicas. Durante la Fase I del metabolismo, uno o más de estos grupos polares son introducidos en las moléculas hidrofóbicas lo que incrementa su solubilidad en agua. Esta alteración es crítica porque la mayoría de los compuestos hidrofóbicos son solubles en las capas lipídicas de las membranas y por tanto, las retiene el cuerpo, mientras que los compuestos solubles en agua son más fácilmente arrastrados por la sangre y subsecuentemente eliminados. Después de la hidroxilación el compuesto progenitor se convierte en un sustrato ideal para las enzimas conjugantes de la Fase II. Los productos conjugados son suficientemente polares y fácilmente excretados de la célula y del cuerpo (Becker *et al.*, 2000).

Aunque la vía metabólica de la hidroxilación básicamente representa un mecanismo de desintoxicación, en el caso de los promutágenos y procancerígenos lleva a la formación de productos mutagénicos/cancerígenos (*metabolismo xenobiótico o biotransformación*). La mayoría de los cancerígenos químicos requiere activación metabólica a metabolitos electrofílicos que sean capaces de enlazarse al ADN y causar mutaciones. El metabolismo xenobiótico es llevado a cabo por grupos grandes de enzimas metabolizadoras que incluyen a los citocromos P450 y a la epóxido hidrolasa microsómica de la Fase I y a varias enzimas conjugantes de la Fase II como la glutatión transferasa (González y Kimura, 2001).

Tanto en la desintoxicación como en la activación, la hidroxilación depende del sistema Citocromo P450 (Cit P450) o también: Sistema de Monooxigenasa o Sistema de Oxidasa de Función Mixta porque en estas enzimas un átomo de una molécula de oxígeno es reducido a agua y el otro es usado para oxidar el sustrato (Rockstein, 1978; Haugen, 1981; Frank y Fogleman, 1992; Boucher *et al.*, 1996); este sistema enzimático está localizado en los microsomas (fracción subcelular) del REL de hepatocitos y otras células. A su vez, cada citocromo P450 es un sistema de multicomponentes ligado a membrana, según descubrieron Omura y Sato (1964), el cual involucra al menos dos proteínas: 1) CITOCROMO P450 (hemoproteína que se caracteriza por una intensa absorbancia de cerca de 450 nm después de la reducción con CO) y 2) NADPH-citocromo P450 reductasa, así como oxígeno molecular y NADPH, (Vogel, 1991; Frank y Fogleman, 1992; Gandhi *et al.*, 1992; Fuchs *et al.*, 1994; Sakai *et al.*, 1992).

Los Cit P450 metabolizan compuestos endógenos como esteroides, ácidos grasos, aminas biogénicas, prostaglandinas y vitaminas, así como xenobióticos tales como metabolitos de la dieta, drogas, pesticidas o contaminantes ambientales (González *et al.*, 1991), metabolitos de plantas y cancerígenos (Gandhi *et al.*, 1992), además de conferir resistencia a insecticidas en insectos (Cariño *et al.*, 1993). Estos sustratos son enzimáticamente modificados por una de las siguientes reacciones: hidroxilación alifática, hidroxilaciones aromáticas, alqueno epoxidaciones, O-dialquilaciones; N-hidroxilaciones, N-desalquilaciones o deshalogenación oxidante (Rockstein, 1978).

Como hemoproteínas, los Cit P450 ligan el  $Fe^{2+}$  del grupo hemo por puentes de tiolato (uniones cisteína-cisteína mediante sus grupos tiol o sulfhidrido -SH) presentes en un dominio cisteinil, muy conservado, de 26 residuos (en la región de la secuencia primaria), cerca del carboxil terminal y que puede considerarse la "huella digital" de estas enzimas (Hobbs *et al.*, 1986; González y Gelboin, 1992) (Fig. 5).

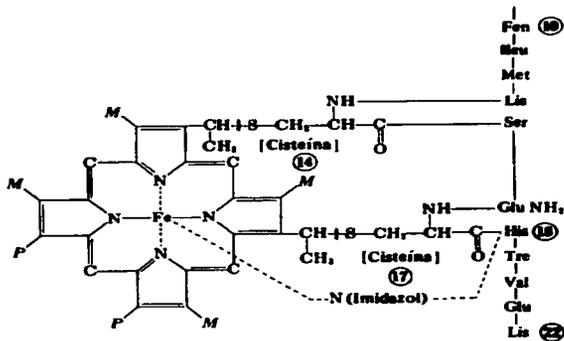


Fig. 5. Citocromo P450 unido a grupo hemo por puentes tiol (-SH) de cisteína (tomado de Burke, 1971).

### 3.2. Antigüedad, presencia en seres vivos y nomenclatura de los Cit P450

El Cit P450 es un sistema enzimático casi universal y conservado. Está presente en bacterias y en todos los organismos de los reinos animal y vegetal, (González *et al.*, 1991). Los miembros de la superfamilia de genes del Cit del P450 son ubicuos en procariontos y en eucariotos (Gandhi, *et al.* 1992). Ha sido encontrado en 90% de los tejidos examinados incluyendo hígado, pulmón, tracto gastrointestinal y riñones, en ratas, ratones, cricetos y monos. La enzima también se ha ubicado en hígado, pulmones y placenta humanos. Aunque está principalmente localizada en microsomas (fracción subcelular), también está presente en las fracciones nuclear y mitocondrial de la célula.

La evolución de la superfamilia de genes de Cit P450 (*CYP450*) exhibe paralelismos cercanos con la evolución de la biota terrestre. Hay correspondencia con el incremento sostenido de la oxigenación atmosférica, que comenzó hace 2000 millones de años, y los cambios dietéticos durante tiempos geológicos más recientes los que quizá expliquen las diferencias en el metabolismo de ciertas especies (Lewis *et al.*, 1998).

Los Cit P450 existen como una superfamilia de genes y e cálculo de su número dentro de un organismo dado van de 50 a 200. El sistema de nomenclatura usado por la mayoría de los autores se

basa en la similitud de la secuencia primaria de aminoácidos entre los Cit P450. Los genes individuales se bautizan con el prefijo *Cyp* (en inglés: Cytochrome P450) seguido por un número arábigo que designa la familia del gen, una letra que designa la subfamilia y el número del gen. Así, *Cyp1A1* y *Cyp1A2* son genes individuales 1 y 2 en la familia 1, subfamilia A (Nebert *et al.*, 1989 citado por González *et al.*, 1991).

Las actividades catalíticas de formas individuales de los Cit P450 han sido analizadas por reconstitución de enzimas purificadas con lípido artificial y oxidoreductasa NADPH-P450 (Magee *et al.*, 1980).

Por otra parte, la fracción subcelular de microsomas que contienen el sistema Cit P450 ligado a membrana se extrae a partir de un homogenizado de insectos completos u órganos y ultracentrifugación (100, 000 a 200,000 g) de un sobrenadante postmitocondrial por 1 h ó más (Rockstein, 1978).

El complejo enzimático Cit P450 metaboliza cancerígenos indirectos como: hidrocarburos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas, aminas nitroaromáticas, nitrosaminas, hidracinas, aflatoxinas e hidrocarburos halogenados (González *et al.*, 1991).

Las enzimas del Cit P450 son especificadas por loci genéticos múltiples y son diferencialmente inducibles (Fuchs *et al.*, 1993). Su síntesis puede ser disparada por una serie de sustancias como el fenobarbital (FB), 3-metilcolantreno, aroclor 1254 (mezcla bifenil policlorinada) (Levin *et al.*, 1980), acetona y pirazola.

### 3.3. Polimorfismo genético del sistema Cit P450 y sus consecuencias

Se ha reconocido desde hace mucho tiempo que existen enormes diferencias específicas entre las enzimas que metabolizan drogas y cancerígenos. En particular, las diferencias en los Cit P450, principales enzimas de activación metabólica de procancerígenos, están muy diseminadas y podrían determinar las susceptibilidades individual y de especie los agentes químicos que causan cáncer (Sundseth *et al.*, 1990).

Una de las principales causas de variación individual de los efectos de una droga es la variación genética del metabolismo de drogas. El *polimorfismo genético de las enzimas metabolizadoras* de drogas da lugar a distintos subgrupos en la población que difieren en su capacidad de llevar a cabo ciertas reacciones de biotransformación. Los polimorfismos son generados por mutaciones en los genes de estas enzimas, lo que causa una expresión o actividad reducida, incrementada o ausente debido a múltiples mecanismos moleculares. Los alelos variantes existen en la población en una frecuencia relativamente alta. Los polimorfismos han sido descritos para la mayoría de las enzimas que metabolizan drogas (Meyer y Zanger, 1997).

Como existen marcadas diferencias entre especies en las expresiones y las actividades catalíticas de las múltiples formas de Cit P450 que activan cancerígenos, el proceso de validación se vuelve especialmente difícil (González y Kimura, 2001).

Los inhibidores del sistema Cit P450 isoforma-selectivos han facilitado mucho la caracterización de las especificidades catalíticas y el significado farmacológico y toxicológico de las enzimas P450 individuales. Entender la base de la especificidad deberá llevar a un diseño racional de una nueva generación de inhibidores de los Cit P450 basada en la estructura para su uso, como sondas y moduladores, de la función de los Cit P450 *in vivo* (Halpert, 1995).

### 3.4. Cit P450 en *Drosophila melanogaster*

El efecto opuesto del metabolismo de xenobióticos mediado por el sistema enzimático de los Cit P450 en la activación de promutágenos a compuestos genotóxicos puede ser estudiado con *Drosophila melanogaster*. Este organismo ofrece una excelente herramienta para conocer y comprender mejor los mecanismos de inducción de las formas del Cit P450 usándole en lugar de eucariotes superiores como mamíferos (Saner *et al.*, 1996).

Los Cit P450 de insectos son en muchos aspectos similares a los de los vertebrados (Andersen *et al.*, 1993).

#### 3.4.1. Cit P450, *Drosophila melanogaster* y DMN

Baars *et al.* (1980) aislaron fracciones subcelulares de *D. melanogaster* que presentaban varias actividades enzimáticas capaces de biotransformar xenobióticos, para investigar su capacidad de activación metabólica, antes de ejercer sus efectos mutagénicos (como DMN). Se comparó el sistema de *D. melanogaster* con el ensayo de Ames, cepas de *E. coli* 343/113/R-9 y 343/113/uvrB y células de Ovario de Criceto Chino. Los microsomas de *Drosophila* parecieron ser al menos tan activos como los de hígado de rata en su capacidad de activar promutágenos. Por otro lado, se ha observado un nivel incrementado de las actividades enzimáticas de desalquilación para agentes como la DMN, la aminopirina y la benzofetamina lo que correlaciona con un alto nivel constitutivo de hemoproteínas (Fuchs *et al.*, 1994).

Hällstrom *et al.* (1982) demostraron que la cepa resistente a pesticidas Hikone R de *D. melanogaster* difiere genéticamente de cepas susceptibles porque tiene una actividad de los Cit P450 más alta y no es inducida por el FB. Las pruebas de toxicidad con DMN mostraron que: el efecto tóxico de DMN fue más alto en la cepa resistente que en las susceptibles (Vogel, 1980) y que la inducción con FB aumentó la toxicidad de DMN en las cepas susceptibles pero no en la resistente.

#### 3.4.2. Genes del sistema Cit P450 en *Drosophila melanogaster* (*Cyp6A2*)

Waters *et al.* (1984) efectuaron electroforesis de microsomas de *D. melanogaster* encontrando dos bandas de proteínas que contienen grupo hemo con PM de 59, 290 (banda A) y 55,750 (banda B). La banda A está presente en todas las cepas examinadas, la B no. La dimetilnitrosamina dimetilasa, una enzima P450, es componente de la banda B. En el análisis electroforético de la proteína microsómica de alrededor de 20 líneas de *Drosophila* se revela la presencia de bandas de las subunidades del Cit P450. Estas subunidades son P450-A la cual indica todas las formas P450 con un PM de 59 kda, y P450-B indicando todas las isoenzimas con un PM de 56 kda entre ellas la DMN-d (dimetilnitrosamina desmetilasa) (Waters y Nix, 1988; Sundseth *et al.*, 1990). El P450-A es ubicuo en muchas cepas de *D. melanogaster* pero el P450-B es único para ciertas cepas como Hikone-R (BG) y Oregon-*flare*, que lo posee en concentraciones bajas en comparación con la primera según Waters y Nix (1988). En 1980, Waters y Nix (en Russell *et al.*, 1990) mapearon los genes que codifican el gen para la expresión del Cit P450-B de *Drosophila melanogaster* que se encuentran en el cromosoma 2R y confieren resistencia a insecticidas; la máxima expresión del Cit P450-B se encuentra regulada por dos loci presentes en cada brazo del cromosoma 3 (Sundseth *et al.*, 1990).

Tijet *et al.* (2001) encuentran por bioinformática (programa BLAST), que la superfamilia de genes de los Cit P450 está representada por 90 secuencias en el genoma de *D. melanogaster*. De

éstas, 83 codifican para genes aparentemente funcionales mientras que siete parecen ser pseudogenes. Más de la mitad de estos genes pertenecen a sólo dos familias *Cyp4* y *Cyp6*. La familia *Cyp6* es específica de insectos mientras que la familia *Cyp4* incluye secuencias presentes en vertebrados. El mapa genético de la distribución de los *CypP450* de *D. melanogaster* muestra: (a) la ausencia de genes *CypP450* en los cromosomas 4 y Y, (b) más de la mitad de los *Cyp P450* se encuentran en el cromosoma 2 y (c) el conjunto más grande contiene 9 genes. Los alineamientos de secuencia para armar árboles filogenéticos y para analizar la organización intrón-exón arrojaron que sólo 5 *CypP450* carecen de intrones. Aunque la función de muchos Cit P450 de vertebrados, hongos, plantas y bacterias se conoce, sólo un P450 de *D. melanogaster*, *Cyp6A2*, ha sido funcionalmente caracterizado. Danielson *et al.* (1997) apuntan que la familia *Cyp6* tiene fuertes homologías regionales con la familia *Cyp3* de vertebrados. Ésta, junto con la familia *Cyp2* juegan un papel determinante en el metabolismo de drogas en los vertebrados (Danielson *et al.*, 1998). Por otra parte, Saner *et al.* (1996) caracterizaron la estructura genética, el patrón de expresión y la capacidad metabólica hacia los procarcinógenos del Cit P450-6A2 de *Drosophila melanogaster* a partir de larvas de la cepa resistente Oregon-flare utilizada en la prueba de SMART.

Maitra *et al.* (1996) demostraron que la expresión del gen *Cyp6A2* es mucho más alta en la cepa 91-R resistente a DDT que en la cepa susceptible 91-C de *D. melanogaster*. También aislaron y caracterizaron dos nuevos genes *Cyp6A* de la cepa 91-R (*Cyp6A8* y *Cyp6A9*) que muestran una expresión constitutiva o inducida por barbitúrico diferencial.

Dunkov *et al.* (1996) amplifican por RT-PCR, clonan, secuencian, localizan por hibridación *in situ* y descubren 9 genes que codifican para los Cit P450 en el genoma de *D. melanogaster*. Posteriormente, estudiaron el gen *Cyp6A2* de *D. melanogaster* que codifica para el Cit P450 correspondiente. Está localizado en el brazo derecho del cromosoma 2 en la posición 43A1-2 y comprende dos exones separados por un intrón de 69 pb. El tratamiento de moscas con FB lleva a un rápido aumento en el ARNm del *Cyp6A2* y a una elevada producción de la enzima del *Cyp6A2*. El ADN de la región del promotor del *Cyp6A2* fue funcional cuando se le ligó a un gen reportero de luciferasa y se transfeció a células Schneider de *D. melanogaster*. Además, una inducción dosis-dependiente de la actividad de la luciferasa por parte del FB indicó que los elementos necesarios para la inducción por FB están localizados dentro de 428 pb del sitio de inicio de traducción. El *Cyp6A2* cataliza el metabolismo de insecticidas organofosforados e implican la sobre-expresión del *Cyp6A2* en la resistencia metabólica. El gen *Cyp6A2* por tanto, parece ser un modelo adecuado para el análisis genético del proceso de inducción del FB (Dunkov *et al.*, 1997)

Dombrowski *et al.* (1998) vuelven a demostrar que los niveles de uno o más Cit P450 y los respectivos ARNm se expresan en niveles más altos en insectos resistentes a insecticidas que en insectos susceptibles. Examinaron la expresión de *Cyp6A2* en varias cepas de *D. melanogaster*. La expresión constitutiva de *Cyp6A2* varía de cepa a cepa; el ARNm de *Cyp6A2* apenas se detecta en la cepa *rj*<sup>506</sup> pero está sobre-expresado en las cepas 91-R y MH-III-D23.

Amichot *et al.* (1998) analizaron los Cit P450 de *D. melanogaster* midiendo 4 de sus actividades enzimáticas (incluida la hidroxilación). Usaron la cepa susceptible Canton<sup>S</sup> y la cepa resistente (RDDT<sup>R</sup>). Indujeron diversos genes de las familias *Cyp4* y *Cyp6* con agentes químicos, entre ellos el FB (hubo desde inhibición hasta inducción de las actividades enzimáticas). Los resultados mostraron que las actividades dependientes de Cit P450 son numerosas en *Drosophila*. Los detalles de la regulación de estas actividades son complejos.

Maitra *et al.* (2000) midieron la expresión de *Cyp6A2* en varias cepas de *D. melanogaster*: *ry*<sup>506</sup> y 91-C (susceptibles) mostraron niveles bajos o indetectables de ARNm de *Cyp6A2*, esto significa que una expresión baja de *Cyp6A2* es el fenotipo silvestre; pero en 91-R y MHIII-D23 (resistentes) hubo sobreexpresión. Se cruzaron ambas cepas susceptibles y ambas cepas resistentes. Las cantidades de ARNm del *Cyp6A2* en los híbridos de la F1 eran menores de la mitad de las cantidades de estos ARN's encontrados en las cepas progenitoras. Esto sugiere que las cepas susceptibles portan loci que silencian ("downregulate") la expresión génica de *Cyp6A2*. En conclusión, los resultados sugieren que el gen *Cyp6A2* ligado al cromosoma 2 está regulado por loci presentes en el cromosoma 3 y que la función silvestre de estos loci es reprimir al gen *Cyp6A2*. Por tanto, la sobreexpresión de *Cyp6A2* en las cepas resistentes es probable que se deba a una mutación en el locus (o loci) represor (es) más que en las secuencias reguladoras-*cis* del gen *Cyp6A2*. En el cromosoma 3 de *D. melanogaster* se controla la actividad del Cit P450 en varias cepas resistentes.

### 3.5. Cit P450 y activación de nitrosaminas

La activación metabólica puede ser un paso crítico en la transformación de las nitrosaminas a metabolitos cancerígenos, por ello, Lee *et al.* (1989) probaron que los Cit P450 mostraron una especificidad de sustrato y selectividad del grupo alquilo en el metabolismo de las nitrosaminas: cambiar un grupo metilo por uno benzilo o butilo, cambia sustancialmente la especificidad de la enzima.

#### 4. FENOBARBITAL

El fenobarbital (FB) es un barbitúrico lipofílico de origen sintético y corresponde químicamente a la clase de los ureidos cíclicos (Fig. 6). En medicina se usa como sedante y anticonvulsivo. Hace más de 35 años se reportó por primera vez que el FB incrementa la capacidad metabólica de los hepatocitos (Zelko y Negishi, 2000). Induce la proliferación del REL y la síntesis y la actividad de enzimas microsómicas que metabolizan otras drogas disminuyendo su actividad farmacológica en forma manifiesta (Beckman, 1984). La eliminación de drogas barbitúricas, por ejemplo, es estimulada por enzimas de hidroxilación asociadas con el REL. Esto puede ser demostrado inyectando el sedante FB a una rata. Uno de los efectos más sorprendentes es un rápido aumento en el nivel de enzimas desintoxicantes de barbitúricos en el hígado, acompañado por una dramática proliferación del REL (Becker *et al.*, 2000). Hoy día se sabe que en realidad el FB activa numerosos genes que codifican varias enzimas metabolizadoras de xenobióticos tales como los Cit P450 (Fase I del metabolismo) (Zelko y Negishi, 2000) y transferasas (Fase II del metabolismo) (Nims *et al.*, 1997). De hecho, el FB mismo es metabolizado, mediante hidroxilación, por el Cit P450 (Tredger *et al.*, 2002).

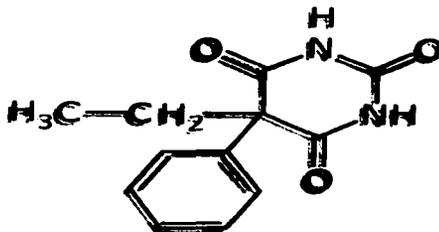


Fig. 6. Molécula de fenobarbital (FB)  
(tomado de Graf y Singer, 1992).

##### 4.1. FB como inductor de enzimas metabolizadoras de xenobióticos: Cit P450

El FB es un potente inductor de enzimas Cit P450 y REL; después de la inducción con FB hasta 2/3 o incluso ¾ del total de los fosfolípidos hepáticos se localizan en el retículo junto con los Cit P450 ligados a su membrana (DePierre y Ernster, 1980). Por lo tanto, el FB ha sido utilizado en experimentos para dilucidar las características y propiedades (estructura, actividad enzimática, etc.) de los Cit P450. También ha sido eficaz en el estudio del metabolismo y farmacocinética de diferentes sustancias como: nicotina, primidona, lidocaína, colesterol y sus metabolitos, clonazepam y diazepam (anticonvulsivos de benzodizepina), perfiles de regulación de la expresión génica (con técnica de microarreglos según Hamadeh *et al.*, 2002 b y con técnica de "RT-PCR" de acuerdo con Pan *et al.*, 2000), inhibición e inducción de actividad enzimática de diversas vías metabólicas, activación de promutágenos y cancerígenos, ensayos de toxicidad de supuestos agentes genotóxicos

(incluido el FB), análisis de secuencia de genes de Cit P450 (*cyp's*), y estudio de receptores nucleares, entre otros.

Todo esto se ha realizado en la mosca doméstica, *Musca domestica* (Andersen *et al.*, 1993), ratas (Halpert y Neal, 1980; Dees *et al.*, 1980; Sakai *et al.*, 1992; Fuchs *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1995; Kocarekly Reddy, 1996; Nakamoto *et al.*, 1997; Yamada *et al.*, 1999; Yamada *et al.*, 2000), larvas de *Pleurodeles* (Anfibios, Salamandridae) (Fernández *et al.*, 1989), pollos (Ryan y Ades, 1993), faisanes, pavos y patos (De Matteis y Marks, 1996), ratones (Corcos, 1992; Donato *et al.*, 2000; Fontaine *et al.*, 2001), cerdos (Myers *et al.*, 2001), humanos (Tang *et al.*, 1979; Donato *et al.*, 2000), macacos (Seaton *et al.*, 1991), conejos (Magee, 1980) y bacterias (prueba de Ames) con fracciones S9 de hígado humano e hígado de ratas Sprague-Dawley (Hakura *et al.*, 1999).

#### 4.2. Inhibición de la inducción del FB

A pesar de la capacidad inductora de la expresión génica de las enzimas Cit P450, el FB puede ser inhibido por el antiprogesterin-antigluocorticoide RU486 (Shaw *et al.*, 1993), el AMPc intracelular y la protein-cinasa-A (Sidhu y Omiecinski, 1995), citocinas proinflamatorias (Pan *et al.*, 2000) y el TNF (Van Ess *et al.*, 2002).

Sorprendentemente, el (-) - N-3-Benzil-fenobarbital (enantiómero del fenobarbital) es un inhibidor selectivo muy potente de genes de Cit P450 como el *Cyp2C19* humano (Suzuki *et al.*, 2002).

#### 4.3. Capacidades cancerígena, mutagénica y de metilación de ADN del FB

Como compuesto químico, el FB ha demostrado su potencial cancerígeno en bioensayos a largo plazo (El-Masri *et al.*, 1998; Hamadeh *et al.*, 2002 b) y por ello se utiliza para generar la fase de promoción de tumores en ratas macho Fischer 344 (Williams *et al.*, 1998) y para estudiar los genes que se activan durante la fase de promoción en la carcinogénesis (Shibutani *et al.*, 2002).

Por otro lado, la mutagenicidad del FB fue investigada por Shane *et al.* (2000 a) en hígados de ratones transgénicos *Big Blue*. El aumento de transversiones en los pares G:C encontradas en el espectro derivado del FB fue probablemente debido al daño oxidante resultado de la inducción de Cyp2B por la administración crónica de FB. Para probar lo anterior, Deutsch *et al.* (2001) utilizaron el ensayo cometa para medir daño a ADN en células expuestas a FB (1 mM) pero no encontraron rompimientos de banda sencillos o dobles. Sin embargo, al agregar fracciones S9 a las células expuestas en presencia de FB sí se produjo daño significativo al ADN a través de un mecanismo aún por estudiar.

La metilación natural del ADN es clave importante de la expresión génica; en sitios específicos de islas ricas en CpG en la región del promotor parece "silenciar" la expresión (Pegg, 2000), mientras que los genes hipometilados tienen un potencial alto de expresión (Samiec y Goodman, 1999). Por otro lado, recientemente se ha empezado a comprender en Toxicología que la mutagénesis no es el único mecanismo que produce alteraciones heredables al genoma y que es importante entender la base epigenética del fenómeno. Así, queda claro que la metilación del ADN es un mecanismo epigenético que juega un papel principal en una variedad de toxicidades químicamente inducidas, incluyendo, pero no limitado a la carcinogénesis. Por tanto, una valoración del estado de metilación puede proporcionar información importante como parte de una estimación global de seguridad del uso humano de compuestos con esta actividad. Por esta razón, Watson y Goodman, (2002) estudiaron ratones con diferentes niveles de susceptibilidad a la tumorigénesis a los que administraron dosis de FB como cancerígeno no genotóxico en roedores

(Diez-Fernandez *et al.*, 1998) para generar la fase de promoción. Sus resultados indican claramente más cambios de metilación en las regiones ricas en GC del ADN, principalmente hipermetilación, en grupos de ratones susceptibles a tumor en respuesta al FB.

#### 4.4. FB y receptores nucleares

La habilidad del FB para inducir la síntesis de los Cit P450 se conoce hace décadas. Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen en la expresión elevada de estas enzimas del metabolismo xenobiótico no habían sido dilucidados, principalmente porque no existían los sistemas modelo *in vitro* e *in vivo* en los que se pudiera estudiar la inducción (Kemper, 1998).

Los *receptores nucleares* son factores de transcripción activados por una multitud de hormonas, otras sustancias endógenas y moléculas exógenas. Estas proteínas modulan la regulación de genes blanco que contactan sus secuencias *promotoras* o *activadoras* (*enhancer*) en sitios específicos de reconocimiento. La identificación de estos *elementos de respuesta* es el primer paso al conocimiento detallado de los mecanismos reguladores que afectan a un gen (Podvinec *et al.*, 2002).

Desde que Shaw *et al.* (1993) demostraron que el efecto inductor del FB, representado por la acumulación del ARNm del *Cyp2C6* y la transcripción del gen correspondiente, era bloqueado por el antiprogesterin-antigluocorticoide RU486, se sugirió que un receptor esteroide estaba involucrado en el proceso de inducción.

Posteriormente, Shinohara *et al.* (1995) estudiaron el blanco específico al que se liga el FB disparando la inducción de enzimas Cit P450. Prepararon dos azido-FB's como ligandos de fotoafinidad. El sustituyente azido fue introducido en la posición *para-* o *meta-* del anillo aromático del FB y después se estimó su utilidad examinando sus actividades inductoras *in vivo* en ratas. Los resultados fueron: (a) la ausencia de cualquiera de los sustituyentes en el anillo aromático del FB era necesaria para alcanzar la máxima actividad inductora, (b) la sustitución en la posición *meta-* del anillo aromático tendía a reducir la efectividad como inductor más que la sustitución en la posición *para-*.

Finalmente, se demostró que los elementos de respuesta del FB están compuestos de varios sitios de enlace a receptores nucleares y que el principal receptor nuclear que media la inducción de FB es el CAR (*constitutive active/androstane receptor*) presente en el citoplasma, que tras el tratamiento con FB se trasloca al interior del núcleo, forma un heterodímero con el receptor retinoide X (RXR) y activa el elemento de respuesta (*enhancer*) vía enlace a los motivos DR-4 lo que lleva a la inducción de numerosos genes (Zelko y Negishi, 2000; Sueyoshi y Negishi, 2001). Lo anterior también ha sido probado en extractos de embrión de *Drosophila* por Kim *et al.*, (2001).

De manera interesante, Yoshinari *et al.* (2001) demostraron que CAR es un factor regulador que lleva a la inducción dimórfica sexual en ratas Wistar-Kyoto (WKY): hay inducción del FB en machos pero no en hembras para el gen *Cyp2B1*.

Como el CAR es un receptor nuclear "huerfano", Ueda *et al.* (2002) trabajaron con ratones que presentaban un CAR silvestre y ratones "*knockout*" (CARKO) y microarreglos de cADN para examinar la expresión génica en ambos tipos de ratones. Los resultados mostraron que CAR regula un porcentaje de genes inducidos por FB pero otros están presentes por inducción con FB en los ratones "*knockout*". Lo anterior significa que CAR parece tener diversas funciones, como regulador positivo y negativo en la expresión de genes en respuesta al FB.

Por otra parte, Bader *et al.*, (2002) demostraron que la activación transcripcional del *Cyp2C45* está mediada por el CXR (*chicken xenobiotic receptor*) que interactúa con una secuencia promotora (*enhancer*) del elemento de respuesta del FB lo que sugiere una conservación evolutiva de las

interacciones receptor nuclear-interacciones ADN en la inducción de genes; de la misma manera Handschin *et al.* (2001) señalan que los receptores nucleares cercanamente relacionados, los factores de transcripción y vías de señalización, median la activación transcripcional de múltiples genes por parte de xenobióticos en aves, roedores y el hombre.

#### 4.5. Inducción de los Cit P450 en *Drosophila melanogaster* por FB

Hällström *et al.* (1982) probaron la inducción del FB en la cepa resistente a insecticida Hikone-R de *D. melanogaster* (que tiene una actividad de Cit P450 alta) y cepas susceptibles. Utilizando el promutágeno DMN encontraron que: (a) el efecto de DMN fue mayor en la cepa resistente que en las susceptibles, (b) la inducción con FB aumentó la toxicidad de DMN en las cepas susceptibles pero no en la cepa resistente. De la misma manera, Graf y Singer (1992) utilizando el ensayo SMART en ala de *Drosophila* demostraron que la actividad de ciertos promutágenos se incrementa de dos a cuatro veces cuando se usa la cruzada de bioactivación elevada (hembras Oregon-flare y machos *mwH*) o cuando las larvas son pretratadas por 24 h con FB a 10 y 20 mM. Sin embargo, este tratamiento experimental con FB en la cruzada estándar (hembras *flare* y machos *mwH*) arrojó resultados indecisos (i) sobre la genotoxicidad del FB.

Hällström *et al.* (1984) encontraron que la cepa Oregon-R, abreviada OR(R) o también ORR de *Drosophila melanogaster* resistente a DDT responde mejor a la inducción de Cit P450 que otras líneas resistentes (p.ej: Karsnas, Canton S, Berlin K, Florida-9, y Lausanne-S), lo cual revela una marcada variación genética entre líneas de *Drosophila* para llevar a cabo metabolismo xenobiótico. Así mismo, Waters *et al.* (1992) (en Maitra *et al.*, 1996) demostraron que la expresión de *Cyp6A2* es más alta en la cepa resistente a DDT (91-R) que en la susceptible (91-C) de *D. melanogaster*.

Existen diferentes sustancias que inducen los genes de las familias *Cyp4* y *Cyp6* en *D. melanogaster*. Sin embargo, sólo la familia *Cyp6A2* (inducida por FB) ha sido ampliamente caracterizada en *D. melanogaster* (Amichot *et al.*, 1998; Sauer *et al.*, 1996).

Dunkov *et al.* (1996, 1997) demostraron que el *Cyp6A2* de *Drosophila* está localizado en el brazo derecho del cromosoma 2 en la posición 43A1-2 además de que el tratamiento con FB lleva a un rápido aumento en el nivel de ARNm de *Cyp6A2* y a una producción alta de la proteína del *Cyp6A2*. Por otra parte, los elementos necesarios para la inducción del FB están localizados dentro de 428 pb del sitio de inicio de la traducción.

Evolutivamente hablando, las familias de genes de Cit P450 (*Cyps P450*) inducidos por FB parecen haber divergido de un gen ancestral común hace 600 millones de años. Aparentemente, el gen inducible por FB sufrió eventos de duplicación génica al momento de la divergencia entre aves y mamíferos. Lo anterior implica que la mayoría de los mamíferos deben tener al menos 4 subfamilias de genes inducibles por FB distantemente relacionadas (Hobbs *et al.*, 1986).

Nakagawa, (1992) demostró que el acetato de plomo (AcPb) administrado a ratones machos reduce los niveles de actividad de la glutatión-S-transferasa (GST). Sin embargo, al administrarse AcPb y FB juntos no había cambio de la GST. La posible respuesta es que el FB acelera la conversión de la GST disminuyendo la inhibición, inducida por el AcPb, de la conjugación de xenobióticos por GST.

## 5. GRUPO HEMO

El hierro es indispensable para la vida ya que sirve como metal cofactor para muchas enzimas, ya sea proteínas no hemo o hemoproteínas. En estas últimas, el hierro se inserta como una joya en el centro del grupo prostético hemo (Ponka, 1997). Desde el punto de vista químico, el grupo hemo presenta una estructura tetrapirrólica conocida como protoporfirina IX, con un núcleo central de hierro unido a ésta. Es una estructura plana, altamente hidrofóbica, que se aloja en un "bolsillo" hidrofóbico de las globinas como la hemoglobina y la mioglobina (Díaz y Hicks, 1988) (Fig. 7).

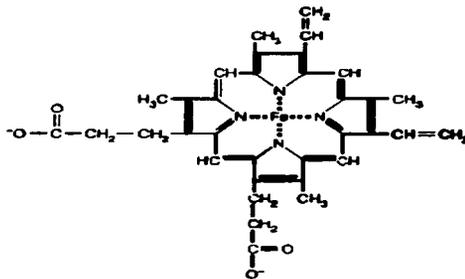
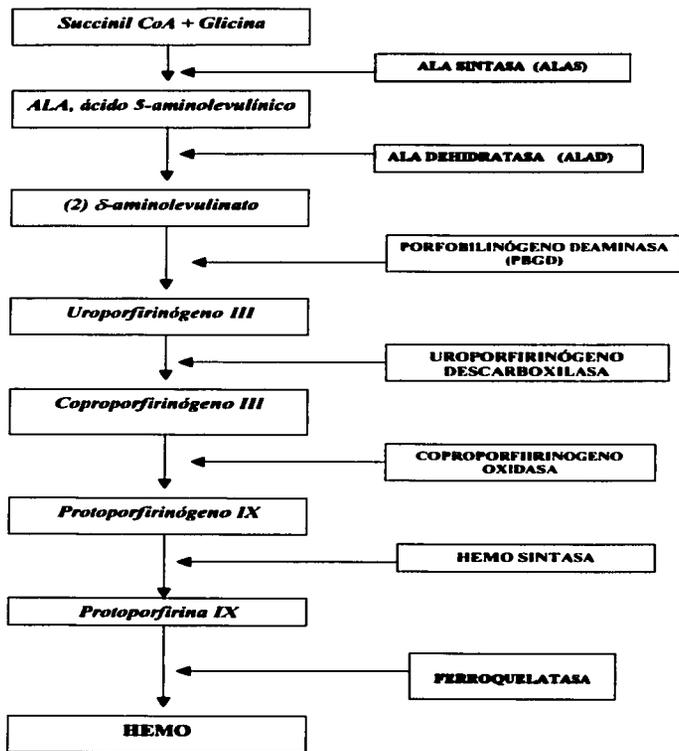


Fig. 7. Estructura química del grupo hemo (protoporfirina IX) mostrando los radicales vinilo que lo enlazan a los Cit P450 (tomado de Becker, 2000).

Las hemoproteínas están involucradas en un amplio espectro de funciones biológicas cruciales que incluyen: el enlace de oxígeno (hemoglobinas), metabolismo de oxígeno (oxidases, peroxidases, catalasas e hidroxilasas), transferencia de electrones (citocromos mitocondriales) y metabolismo endo y exobiótico (Cit P450 microsomales) (Beri y Chandra, 1993; Ponka, 1997). Por tanto, el grupo hemo se forma en casi todos los sistemas vivos, excepto por algunos anaerobios obligatorios y ciertos organismos unicelulares auxotróficos para las proferinas y/o el grupo hemo. A finales de la década de los 40's y principios de los 50's, Shemin y Neuberger (en Ponka, 1997) dilucidaron los aspectos básicos de la biosíntesis del grupo hemo. La bacteria *Rhodobacter spheroides* tiene una biosíntesis del grupo hemo sujeta a un control negativo de retroalimentación por el grupo hemo mismo que es el producto final de la vía. El hemo regula la producción de las enzimas que lo sintetizan, como la ácido 5-aminolevulínico sintetasa (ALAS) (Fig. 8), interrumpiendo la transcripción de los genes que codifican las enzimas, inestabilizando los ARNm correspondientes, y de las enzimas que lo degradan como la hemo-oxigenasa: (OH), según demostraron Burnham y Lascelles en 1963 (en Ponka, 1997; Srivastava, 1989; Jover *et al.*, 2000; Cable *et al.*, 1996). Los organismos superiores permanecen fieles a este principio básico de control de síntesis por hemo (Ponka, 1997). La biosíntesis del grupo hemo involucra 8 enzimas: la primera y las 3 últimas se localizan en la mitocondria y las otras 4 son citoplásmicas (Beri y Chandra, 1993) (Fig. 8).



**Fig. 8. Biosíntesis del grupo hemo.** Se muestran las enzimas particularmente susceptibles a la inhibición por Pb<sup>2+</sup>: 8-aminolevulinato sintasa (ALAS), 8-aminolevulinato deshidratasa (ALAD) y ferroquelatasa (tomado de Díaz y Hicks, 1988 y Johnson, 1998).

### 5.1. Grupo hemo de insectos

En los organismos animales la mayoría de los tetrapirroles importantes están basados en un subgrupo de porfirinas (metaloporfirinas), los hemos, en los que un átomo de hierro está simétricamente ligado por los átomos N de los cuatro pirroles de la protoporfirina IX, la principal porfirina biológica (Fig. 7). En insectos, el grupo prostético de los citocromos *a*, *b*, *c* y P450 y la hemoglobina, cuando ésta existe, es el protohemo IX (Fig. 9).

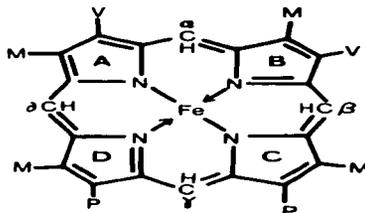


Fig. 9. Molécula de protohemo IX (tomado de Rockstein, 1978).

### 5.2. Regulación de la síntesis del grupo hemo

Srivastava *et al.* (1989) demostraron que aunque bajos niveles de hemo llevan a un aumento de la síntesis del ARNm de la enzima 5-aminolevulinato-sintetasa (ALAS) no hay un efecto sobre los niveles de ARNm del Cit P450, lo que implica que el grupo hemo no se requiere para la transcripción génica del Cit P450.

Cable *et al.* (1996) estudiaron cultivos primarios de embriones de pollo para saber si una baja concentración de hemo aumentaba la estabilidad del ARNm de ALAS (al que inestabiliza normalmente para regular la vía de síntesis) y si algunas metaloporfirinas revertían el fenómeno. La estabilidad de ALAS fue modulada por los inhibidores de la biosíntesis de grupo hemo como la deferroxamina y el ácido 4,6-dioxohepatónico y metaloporfirinas como zinc y cromo mesoporfirinas.

### 5.3. Grupo hemo y el sistema Cit P450

Marks *et al.*, (1988) demostraron que se generaba una interrupción en la biosíntesis del grupo hemo en hepatocitos, después de la interacción con algunos xenobióticos, tales como compuestos heterocíclicos, alilisopropilacetamida e hidrocarburos aromáticos policíclicos polihalogenados planares, con los Cit P450.

Danielson *et al.*, (1997) utilizaron la secuencia conservada del asa de 10 péptidos que sirve a todos los Cit P450 para ligar el grupo hemo y clonaron 4 genes de la familia *Cyp28* de *Drosophila*.

#### 5.4. Grupo hemo, Cit P450 y FB

La regulación de Cit P450 por el grupo hemo ha sido objeto de numerosos estudios controvertidos, por lo que se ha propuesto un modelo de involucramiento del grupo hemo en la regulación transcripcional del Cit P450 hepático de animales modelo. En este, una presunta concentración regulatoria nuclear de hemo modula positivamente la inducción de la transcripción de genes *Cyp P450* generada por FB. Jover *et al.* (2000) estudiaron ratones "knock-out" para la tercera enzima de la vía de síntesis del grupo hemo (PBGD). Sus resultados demuestran que una concentración limitada de hemo está asociada con una disminución en la inducción del FB para algunas isoformas específicas de Cit P450 (*Cyp2A3*) como consecuencia de una transcripción génica interrumpida.

#### 5.5. Grupo hemo, Cit P450 y AcPb

Jover *et al.*, (1996) estudiaron el efecto de la deficiencia del grupo hemo en la función, síntesis de ARNm y transcripción del Cit P450 en ratones C57BL/6 tratados con AcPb (75 mg/kg). El AcPb aumentó los niveles de la enzima ALAS y disminuyó la concentración de hemo libre. Las actividades (O- desalquilación y O-desetilación) de los Cit P450 bajaron en las primeras 20h. Los niveles de ARNm del *Cyp3a11* también bajaron (medidos por PCR de transcripción reversa semi-cuantitativa) después de la inyección de AcPb, lo que revela la inhibición de la transcripción génica de *Cyp3a11*. Por tanto, la baja de Cit P450 después de envenenamiento por AcPb es consecuencia de dos mecanismos: (a) Un mecanismo no relacionado con hemo, en el que el AcPb baja la transcripción de Cit P450 y (b) un mecanismo dependiente de hemo, en el que el plomo inhibe la síntesis de hemo y éste lleva a una baja saturación de hemo del contenido de P450.

Harada *et al.* (1990) estudiaron el efecto del AcPb en el sistema Cit P450 y el metabolismo de porfirinas usando ratas Wistar macho. El AcPb a dosis agudas (10 a 50 mg/kg) bajó los contenidos de Cit P450 microsomal y actividades de enzimas del metabolismo xenobiótico y un poco menos en dosis crónicas. La conclusión es que las ratas ganaron una resistencia gradual contra el AcPb en el estado crónico. En otro experimento, el AcPb bajó los niveles de grupo hemo en los microsomas y aumentó la actividad de la hemo-oxigenasa.

Hjelle *et al.* (1982) encontraron que el AcPb (105  $\mu$ mol/kg, i.p.) redujo el Cit P450 en ratas 24 y 48 h después de su administración. Se encontraron altas concentraciones de la enzima ALAS en orina (U-ALAS) indicando una depresión en la síntesis de hemo. El FB (100 mg/kg) indujo los Cit P450, proliferación del REL y no alteró los niveles de U-ALAS. El cotratamiento de FB y AcPb produjo una inducción retardada pero robusta de los Cit P450, un moderado aumento en U-ALAS y una proliferación reducida del REL. Por tanto, el FB, un inductor de las enzimas sintetizadoras del grupo hemo, es capaz de revertir la inhibición de síntesis del grupo hemo inducida por el AcPb según se mide por la inducción del sistema Cit P450 hepático y contenido de U-ALAS.

#### 5.6. Grupo hemo y *Drosophila melanogaster*

Ruiz de Mena *et al.* (1999) determinaron la estructura de la copia única del gen que codifica la supuesta isoforma de la primera enzima de la vía de biosíntesis del grupo hemo: delta-aminolevulinato sintasa (ALAS). Los análisis por electrotransferencia tipo southern e Inmunotransferencia sugieren que la isoforma de la enzima existe en *Drosophila*. Localizaron una

región crítica de la actividad de promotor para una secuencia de 121 pb que contiene un motivo (*motif*) que es potencialmente reconocido por factores de la familia (NRF-1)/P3A2 del factor-1 respiratorio nuclear, flanqueado por dos sitios AP4. El grupo hemo inhibe la expresión del gen bloqueando la interacción de las supuestas proteínas reguladoras a su región proximal 5', un mecanismo diferente de aquellos propuestos para otros promotores regulados por hemina. Experimentos de northern blot e hibridización de ARN *in situ* muestran que el ARNm materno de *alus* se almacena en el huevo; su nivel disminuye rápidamente durante las primeras horas del desarrollo y aumenta de nuevo después de la gastrulación en un periodo donde la síntesis de varios ARNm que codifican enzimas metabólicas se activa. En el inicio del blastodermo, el ARNm de *alus* está ubicuamente distribuido y es menos sustancialmente por todo el blastodermo celular. En el desarrollo embrionario tardío *alus* muestra un patrón de expresión específico, con un elevado nivel de ARNm en nocitos, células presentes en la hemolinfa con acumulaciones masivas de lipoproteínas al momento de la muda (Bursell, 1974), sugiriendo un papel importante de éstas en la biosíntesis de hemoproteínas en *Drosophila*.

## 6. PLOMO Y ACETATO DE PLOMO

### 6.1 Plomo

El plomo es quizá el elemento químico ambiental tóxico más usado y mejor reconocido; Hipócrates se dio cuenta de la acción tóxica del metal y describió un ataque grave de cólico en un individuo que extraía metales. En el siglo II a. de C., Nicandro refirió la constipación, el dolor abdominal y la palidez al efecto del metal en el cuerpo. Las primeras descripciones se refieren a individuos que habían estado expuestos a grandes cantidades de este metal. Hasta el siglo XVII no se apreciaron las formas más sutiles de intoxicación (Von Domarus *et al.*, 1997).

Sin embargo, continuó siendo usado por sus beneficios sin importar las consecuencias a la salud hasta sólo muy recientemente. El plomo ha sido investigado encontrándose que es capaz de generar una respuesta positiva en un rango extraordinariamente amplio de ensayos biológicos y bioquímicos, entre ellos: pruebas de inhibición enzimática, fidelidad de síntesis de ADN, mutaciones, aberraciones cromosómicas, cáncer y defectos de nacimiento, reacciona o forma complejos con muchas biomoléculas y afecta los sistemas: reproductor, nervioso, gastrointestinal, inmune, renal, cardiovascular, esquelético, muscular y hematopoyético, así como procesos de desarrollo. Es probable que el plomo sea un agente selectivo que continúa actuando sobre la estructura genética de las poblaciones de plantas y animales expuestas (Johnson, 1998).

El plomo es un elemento metálico suave, denso, insípido y gris. Es el quinto miembro del grupo IV de la tabla periódica. Aparece en pequeñas cantidades en una gran variedad de minerales pero solamente algunos son económicamente importantes. Los casos de intoxicación se dividen en dos categorías: *industrial y doméstica*.

El plomo y sus compuestos juegan un papel importante en la industria moderna; una amplia variedad de poblaciones está en riesgo de exposición ocupacional (Fracasso *et al.*, 2002). En especial riesgo se encuentran los trabajadores de minas, fundiciones y refinadoras, de manufactura de productos como alambre y planchas de plomo, artículos para plomeros, balas, acumuladores eléctricos, etc. También los tipógrafos, los pintores y los que elaboran alfarería vidriada. Además, el metal se utiliza en muchos otros procesos de manufactura.

#### 6.1.1. Vías de absorción y distribución del $Pb^{2+}$ en el cuerpo

El plomo se absorbe lentamente, pero la absorción lenta y constante basta para producir intoxicación. Los rasgos clínicos de la intoxicación progresiva se deben a la acumulación gradual del tóxico en el organismo (Fig. 9a).

La distribución del plomo en el cuerpo es de la mayor importancia porque es un factor decisivo para su efecto. El plomo se introduce en la circulación por diversos modos. Antes se creía que el metal era transportado en la sangre en forma de compuestos solubles. Sin embargo, datos más recientes indican que más del 90 por ciento del plomo circulante está asociado con los eritrocitos (Von Domarus *et al.*, 1997).

A pesar de que existe un mecanismo regulador de su concentración en el cuerpo (un adulto puede excretar diariamente cerca de 2 mg en promedio), en ocasiones la población está expuesta a dosis elevadas del elemento.

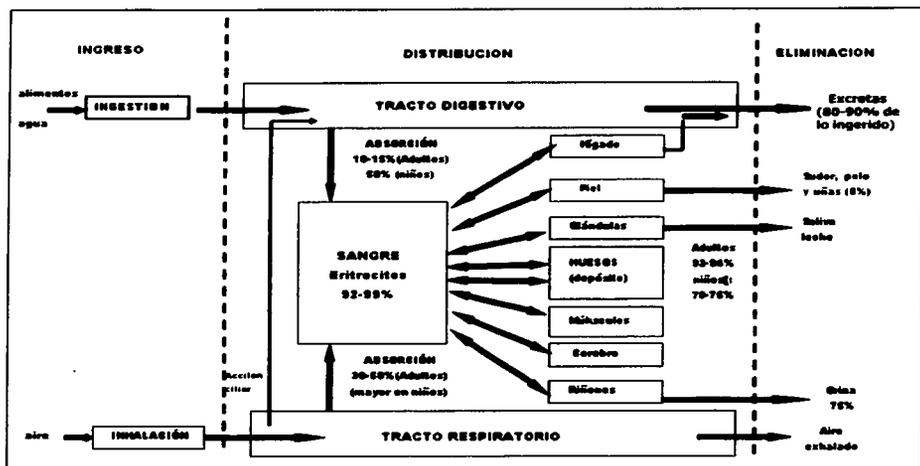


Fig. 9a. Vías de absorción, distribución y eliminación del plomo en el organismo humano (tomado de OPS, Criterios de Salud Ambiental 3, Plomo. 1979).

### 6.1.2. Distribución en el ambiente

El plomo tiene amplia y persistente distribución en el ambiente (Fig. 9b) de ahí su importancia en la salud pública (García-Arenas *et al.*, 1999). En forma de  $Pb^{2+}$ , aparecía en una gran cantidad de alimentos enlatados, como la leche (ya que se usaba plomo en la soldadura de la lata). También lo encontramos en el agua, ya que muchas tuberías también se sueldan con este elemento. Otra fuente era el plomo generado por la combustión de la gasolina, a la cual antes, se le agregaba tetraetilo de plomo,  $Pb(CH_2CH_3)_4$ , como antidetonante.

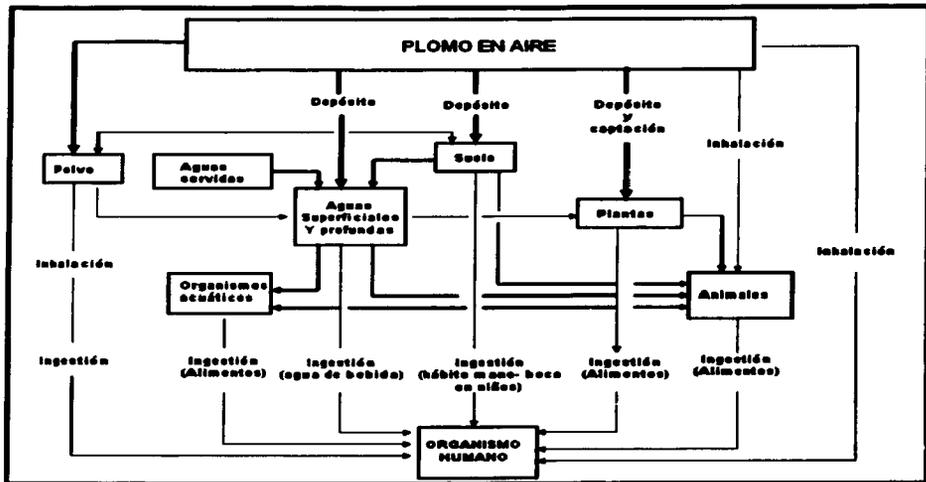


Fig. 9b. Importancia del plomo atmosférico en la contaminación global del ambiente y en el aporte de plomo al organismo humano (tomado de OPS, Criterios de Salud Ambiental 3, Plomo, 1979).

### 6.1.3. Propiedades tóxicas y genotóxicas

La presencia constante del  $Pb^{2+}$  en compuestos orgánicos e inorgánicos de uso frecuente en el área urbana y rural a niveles aún por debajo de los recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1990) podría tener efectos genotóxicos o tóxicos (Ferrante, 1979; O.P.S., 1979; Corey y Galvao, 1989; Goyer, 1990; Hernández-Avila *et al.*, 1991; Bellinger *et al.*, 1991; Weisel *et al.*, 1991; Fuentes-Aguilar y Soto-Mora, 1993). Estos efectos incidirían en los seres vivos como una fuente constante de cambio, de daño o modulación de las funciones celulares, lo que explica la importancia del estudio del  $Pb^{2+}$  y sus propiedades tóxicas (Johnson, 1998).

Por otra parte, la toxicidad del  $Pb^{2+}$  se ha relacionado con el tipo de tejido, la dosis (Zelikoff *et al.*, 1988; Johnson, 1998), el tiempo de exposición, el sexo, la edad (Sokol y Berman, 1991), el tabaquismo y la ingestión de café y alcohol (Beck, 1992).

### 6.1.4. Efectos genotóxicos

Los datos sobre la acción genotóxica del plomo son controvertidos. Aunque sus efectos tóxicos se han estudiado por muchos años, los resultados sobre sus propiedades mutagénicas, clastogénicas y cancerígenas son inconsistentes (Tablas A y B). Sin embargo, se le considera un cancerígeno

humano potencial. Las diferencias específicas de las toxicidades de los iones, como el  $Pb^{2+}$ , han sido relacionadas por Stohs y Bagchi (1995) con la solubilidad de sus compuestos, su absorción, el transporte, la reactividad química y los complejos que forman *in vivo*. Este metal participa en la reacción de Fenton, lo cual produce estrés oxidante al incrementar los radicales  $\cdot OH$  y  $\cdot O_2$  y el  $H_2O_2$  que impactan directamente al ADN (Roy y Rossman, 1992).

**Tabla A. Estudios con resultados positivos sobre la genotoxicidad del  $Pb^{2+}$ .**

COMPUESTO	PRUEBA	MODELO	EFECTO	AUTOR/Año
Plomo ( $Pb^{2+}$ )	Exposición con niveles sanguíneos de $Pb^{2+}$ de 10 $\mu g/l$ de 100 ml de sangre	Linfocitos humanos	Aberraciones cromosómicas	Corey y Galvao (1989)
Plomo ( $Pb^{2+}$ )	Co-exposición con otros metales	Humano	Aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas. Posible rol sinérgico con otros metales	Ferm, (1969) Bauchinger <i>et al.</i> (1976, 1977) Gerber <i>et al.</i> (1980)
Cloruro de plomo ( $PbCl_2$ )	<i>In vitro</i> con concentraciones de $10^{-5}$ M	Humano	Disminución de la fidelidad de la transcripción. Inhibición de la ADN polimerasa.	Sirover y Loeb (1976)
Nitrato de plomo [ $Pb(NO_3)_2$ ]	Mutaciones recesivas ligadas al sexo	<i>Drosophila melanogaster</i> expuesta a 25, 50 y 75 ppm	Mutagénico a 50 y 75 ppm.. La alta fue la $LD_{50}$	Rodríguez-Arnaiz <i>et al.</i> (1986)
Plomo ( $Pb^{2+}$ )	Aberraciones cromosómicas	Linfocitos humanos en cultivo	Positivo solamente a concentraciones muy altas y cultivos con exposición por más de 3 días	Johnson (1998)

**Tabla B. Estudios con resultados negativos sobre la genotoxicidad del Pb<sup>2+</sup>.**

COMPUESTO	PRUEBA	MODELO	EFEECTO	AUTOR/Año
Plomo (Pb <sup>2+</sup> )	<i>Salmonella</i> /microsomos de mamífero	Ratón	Negativo	Goyer (1990)
Plomo (Pb <sup>2+</sup> )	Micronúcleos y aberraciones cromosómicas	Ratón	Negativo	Jacquet <i>et al.</i> (1977)
Nitrato y cloruro de plomo con y sin MMS	SMART en ojo	<i>Drosophila melanogaster</i>	Negativo	Rasmuson (1985)
Nitrato y calcio de plomo	SMART en el ala	<i>Drosophila melanogaster</i>	Negativo	Heres (2001)
Nitrato de plomo (5 días) y sulfuro de plomo (24 h) a 500 mM	Locus de hipoxantina fosforribosiltransferasa	Células de criceto chino V79	No se observaron rompimientos, enlaces, adiciones o intercambios de cromátidas hermanas. Aumentó x 5 la tasa espontánea de mutación	Zelikoff <i>et al.</i> (1988)
Plomo (Pb <sup>2+</sup> )	Exposición laboral o ambiental	Humanos	Negativos	O'Riordan y Evans (1974) Bauchinger <i>et al.</i> (1976, 1977)

### 6.1.5. Efectos bioquímicos

Los mecanismos bioquímicos y moleculares de la toxicidad del Pb<sup>2+</sup> están pobremente entendidos, pero datos recientes sugieren que algunos de los efectos del Pb<sup>2+</sup> pueden deberse a su interferencia con el calcio en la activación de la proteinquinasa C (PKC) y/o a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (Fracasso *et al.*, 2002).

El plomo muestra gran afinidad por los fosfatos, por las cadenas laterales de cisteína e histidina de las proteínas, por las purinas, las pteridinas y las porfirinas (grupo hemo). También inhibe algunas ATPasas y deshidrogenasas. Se une a los fosfatos de los ácidos nucleicos afectando su estructura y cataliza la hidrólisis no enzimática de nucleótidos como el ATP. En ciertos animales y vegetales se ha comprobado que desacopla la fosforilación oxidante y altera la estructura mitocondrial. También activa o inactiva enzimas al sustituir a los átomos de Zn<sup>2+</sup> en los centros activos de las mismas (dedos de zinc) o a átomos de Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, y Mg<sup>2+</sup> modificando la actividad y la especificidad de dichas proteínas (Becker *et al.*, 2000).

### 6.1.6. Efecto sobre vías metabólicas

Los estudios relacionados con las vías metabólicas del plomo se han concentrado en la síntesis del grupo hemo, inicialmente porque se relacionaron casos de anemia con la intoxicación por plomo y además porque las enzimas más susceptibles a su acción están involucradas con esta función (Von Dörmann *et al.*, 1997). Como ya se mencionó una fracción substancial del grupo hemo sintetizado sirve como grupo prostético para las hemoproteínas microsómicas Cit P450 que son parte importante del metabolismo xenobiótico (Tabla C).

**Tabla C. Estudios sobre el efecto del Pb<sup>2+</sup> en la síntesis de grupo hemo y Cit P450.**

COMPUESTO	PRUEBA	MODELO	EFEECTO	AUTOR/Año
Plomo (Pb <sup>2+</sup> )	Bioquímica	Células eritroides	Interferencia en síntesis de grupo hemo por inhibición de enzimas sulfhidrilo	Alvares <i>et al.</i> (1972)
Plomo (Pb <sup>2+</sup> )	Bioquímica	Ratas	Depresión del contenido de Cit P450 microsómico hepático asociada a la depresión de la síntesis de hemo	Goldberg <i>et al.</i> (1977)
Plomo (Pb <sup>2+</sup> )	Bioquímica	Rata	Inhibición de epóxido hidrolasa regulando la actividad enzimática	Draper y Hammock (1999)
Nitrato de Pb <sup>2+</sup>	Bioquímica	Rata	Inhibición de síntesis de ARNm de <i>Cyp1A2</i>	Degawa <i>et al.</i> (1993)

### 6.1.7. Carcinogénesis del Pb<sup>2+</sup>

Aún se desconoce el mecanismo de la carcinogénesis inducida por metales, pero una vía posible puede involucrar la interacción del metal con el ADN, ya sea directa o indirectamente. Se ha demostrado que el Pb<sup>2+</sup> es capaz de inducir transformación *in vitro*, que bajo ciertas circunstancias es mutagénico, que actúa modulando el daño producido por otros agentes y se considera cancerígeno real en roedores (Tabla D) y potencial para humanos (Zelikoff *et al.*, 1988; IARC, 1994; Hartwig, 1995; Johnson, 1998). Tully *et al.* (2000) utilizaron un ensayo comercialmente desarrollado, CAT-Tox(L). Éste emplea una batería de líneas celulares HepG2 recombinantes para estudiar la capacidad de activación transcripcional de xenobióticos en 13 vías de transducción de señales, para identificar promotores con respuesta a metales y determinar si el patrón de expresión génica cambiaba con una mezcla de metales. El plomo mostró inducción de GST, Cyp1A1 y XRE, GRP78. Es decir, hay inducción de promotores y, por lo tanto, existen datos sobre los mecanismos bioquímicos de toxicidad y carcinogénesis de metales.

**Tabla D. Estudios sobre el efecto carcinogénico del Pb<sup>2+</sup> en animales.**

COMPUESTO	PRUEBA	MODELO	EFECTO	AUTOR/Año
Plomo (Pb <sup>2+</sup> )	Administración de dosis altas por 76 ó 79 semanas en dieta (0.016 mM) o agua (0.005 mM)	Ratas	<b>Positivo.</b> Tumores renales en 45 % y 81 % respectivamente.	Kasprzak <i>et al.</i> , (1985).
Óxido de plomo (PbO <sub>2</sub> )	Administración traqueal con benzopireno	Cricetos sirios	<b>Positivo.</b> Cocancerígeno	Kobayashi y Okamoto, (1974).

Con base en los resultados obtenidos en roedores se concluyó en el Séptimo Reporte Anual sobre Cancerígenos (IARC, 1994), que el plomo y sus sales reúnen requisitos para considerarlos de manera anticipada como cancerígenos humanos. Sin embargo, hay controversia en los resultados de distintos ensayos (Tabla E).

**Tabla E. Estudios sobre el efecto carcinogénicos del Pb<sup>2+</sup> en humanos.**

COMPUESTO	PRUEBA	MODELO	EFECTO	AUTOR/Año
Plomo (Pb <sup>2+</sup> )	Estudios epidemiológicos	Humanos	<b>Negativos</b> Aún en concentraciones altas	Johnson (1998)
Plomo (Pb <sup>2+</sup> )	Estudio epidemiológico	Trabajadores de fundidoras de baterías de auto.	<b>Positivo</b> Aumento leve pero significativo de muerte por cáncer. <b>NO se consideraron los efectos del tabaquismo.</b>	Coni <i>et al.</i> (1985)
Plomo (Pb <sup>2+</sup> )	Ensayo cometa	Linfocitos humanos de trabajadores de baterías de auto.	<b>Positivo</b> Rompimiento de ADN. Posible rol del Pb <sup>2+</sup> como promotor de tumor	Fracaso <i>et al.</i> (2002).

## 6.2. Acetato de plomo: $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$

El acetato de plomo (AcPb) (Fig. 10) es una sal orgánica cuyo PM es 325.28 en la que el plomo representa el 63.70 %. Presenta cristales incoloros o gránulos de polvo blanco, ligero olor acético y es venenoso. Se utiliza en la tinción e impresión de algodones, barnices, pigmentos de cromo, manufactura de plaguicidas, tintes para el cabello, manufactura de sales de plomo, cromo amarillo, también para varios procesos analíticos como p.ej: detección de sulfuros, determinación de  $\text{CrO}_3$ ,  $\text{MoO}_3$  (Johnson, 1998). Las personas laboralmente expuestas no deben aspirar su polvo y requieren el uso de una mascarilla recomendada para ello. Se recomienda lavarse las manos vigorosamente antes de comer o fumar y mantenerse alejado de los alimentos. Sin embargo, el AcPb tiene uso terapéutico como astringente y sedante (usualmente en lociones) para contusiones e inflamaciones superficiales. Ha sido usado para el control de diarreas (Windholz *et al.*, 1995).



Fig. 10. Molécula de acetato de plomo (AcPb).

### 6.2.1. Desarrollo y crecimiento

Como sal de plomo, el AcPb tiene efecto sobre el desarrollo y crecimiento de animales (Tabla F).

Tabla F. Estudios sobre el efecto del AcPb en desarrollo y crecimiento de animales.

COMPUESTO	PRUEBA	MODELO	EFFECTO	AUTOR/Año
Acetato de Pb	Exposición a 2475 ppm en el agua, del día 4 al 55	Ratas	En el desarrollo de esqueleto. Inhibición de la osteoblastogénesis <i>in vivo</i> en animales adultos	Ronis <i>et al.</i> (2001)
Acetato de Pb	Una sola dosis de (100 mg/kg) en el día 2	Gaviotas	Sobre el desarrollo cognitivo. Se pierde la capacidad del reconocimiento	Burger (1998)
Acetato de Pb	Exposición a 0, 250, 500 y 1000 ppm en el agua por 14 días	Ratón	Se produce microvascularización del cerebro.	García-Arenas <i>et al.</i> (1999)

### 6.2.2. Efectos bioquímicos

Jover *et al.*, (1996) demostraron que el AcPb (75 mg/kg) en ratones interrumpe la transcripción de los Cit P450 e inhibe la síntesis del grupo hemo. Harada *et al.* (1990) comprobaron que el AcPb a dosis agudas (10 a 50 mg/kg) reduce el contenido de los Cit P450 microsómicos y las actividades de enzimas del metabolismo xenobiótico en ratones. Hjelle *et al.* (1982) encontraron que el AcPb (105 µmol/kg, i.p.) disminuyó los Cit P450 en ratas. El FB (100 mg/kg) indujo los Cit P450 y proliferación del REL. En el tratamiento con FB y AcPb juntos, el FB, un inductor de las enzimas sintetizadoras del grupo hemo, es capaz de revertir la inhibición de síntesis del grupo hemo inducida por el AcPb.

### 6.2.3. Efecto genotóxico

**Tabla G. Estudios con resultados negativos sobre el efecto genotóxico del AcPb.**

COMPUESTO	PRUEBA	MODELO	EFEECTO	AUTOR/Año
Acetato de Pb	Exposición directa a bajas concentraciones, no tóxicas	Ratas	No se detectaron rompimientos de cadenas de ADN	Valverde <i>et al.</i> (2001)
Acetato de Pb	Inducción de mutantes resistentes a trifluoro-timidina a dosis bajas	Células L.5178/TK+	No se indujeron mutantes	Amacher y Paillet, (1982)

**Tabla H. Estudios con resultados positivos sobre el efecto genotóxico del AcPb.**

COMPUESTO	PRUEBA	MODELO	EFEECTO	AUTOR/Año
Acetato de Pb	Exposición en cultivo celular	Leucocitos humanos	Aberraciones de cromátidas tipo abierto	Beek y Obe, (1974)
Acetato de Pb	Descendientes excepcionales	<i>Drosophila melanogaster</i>	Aumento significativo de la pérdida de los cromosomas 4 y X en la 1ª generación	De la Rosa, (1984)
Acetato de Pb	Exposición <i>in vivo</i>	Núcleos aislados de células HeLa	Inhibición de síntesis de ácidos nucleicos por inhibición de sintetetas	Frenkel y Middleton, (1987)
Acetato y nitrato de Pb			Rompimientos sencillos a dosis tóxicas	Roy y Rossman, (1992)
Acetato de Pb	Mutaciones recesivas ligadas al sexo	<i>D melanogaster</i> expuesta a 650, 750 y 850 ppm.	Mutagénico a 850 ppm que también fue la LD <sub>50</sub>	Rodríguez-Arnáiz <i>et al.</i> (1986)
Acetato de Pb	Exposición con dosis entre 200 y 400 mg/kg <i>in vivo</i>	Ratón	Aberraciones cromosómicas en médula ósea y anomalías en células espermáticas	Aboul-Ela, (2002)

#### **6.2.4. Carcinogénesis del AcPb**

Con base en los resultados obtenidos en roedores se concluyó en el Séptimo Reporte Anual sobre Cancerígenos (IARC, 1994), que el *AcPb* reunía requisitos para ser considerado de manera anticipada, como cancerígeno humano.

En los riñones de rata y de ratón y en el hígado de rata, una sola inyección de *AcPb* ha demostrado inducir potente actividad mitogénica, hiperplasia y proliferación celular sin necrosis celulares (Calabrese y Baldwin, 1992; Coni *et al.*, 1985).

Se ha encontrado que el *AcPb* induce la transformación morfológica en células de criceto sirio, aunque se concluye que estos efectos pueden ser el resultado de la alteración de los mecanismos enzimáticos de la síntesis o de la reparación del ADN (Beck, 1992).

Koller *et al.* (1986) indujeron neoplasia en hígado al alimentar ratones machos con *AcPb*, etilurea y nitrato de sodio.

## 7. PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICAS (SMART)

La prueba SMART (del inglés: Somatic Mutation and Recombination Test) de *Drosophila melanogaster* se originó al considerar que la correlación entre las actividades mutagénica y cancerígena de agentes químicos estaba generando mucho interés respecto a su genotoxicidad en células somáticas. Actualmente, no solo su actividad mutagénica sino también la recombinogénica se discuten en relación con su potencial carcinogénico (Graf *et al.*, 1984). En ese sentido, la prueba SMART es uno de los tres únicos sistemas eucariotes *in vivo* que pueden medir la recombinación mitótica cuantitativamente, los otros son: sistemas de levaduras y el "spot test" en ratón (Dr. Graf. Com. Pers).

La prueba SMART detecta de manera rápida y económica agentes genotóxicos en un ensayo *in vivo*. Se basa en la expresión de mutaciones recesivas en células somáticas de organismos transheterocigóticos debida a la pérdida de heterocigosis de marcadores genéticos apropiados que determinan fenotipos detectables expresados en los ojos y las alas (Graf *et al.*, 1984).

Las pruebas SMART en ala y ojo de *Drosophila* son versátiles ensayos de genotoxicidad a corto plazo que han sido validados en todas las clases de químicos genotóxicos. Estas pruebas *in vivo* pueden ser vistos como un enlace entre los sistemas de prueba *in vitro* de microorganismos y los *in vivo* de mamíferos. Para la prueba SMART en ala se han probado cerca de 400 compuestos, obteniéndose resultados positivos con: varias drogas antineoplásicas, pequeños alquilantes, compuestos formadores de aductos grandes, compuestos formadores de entrecruzamiento, intercaladores, inhibidores de la topoisomerasa, antimetabolitos de la síntesis de ADN, análogos de nucleósidos y muchos otros. La prueba SMART detecta fácilmente los promutágenos que requieren bioactivación (productos de pirólisis, nitrosaminas, hidrazinas, dihaloalcanos, aromáticos policíclicos, alcaloides de pirrolizidina, aflatoxinas, y otros) (Frei *et al.*, 1998).

La prueba SMART en ala de *Drosophila melanogaster* también permite evaluar las relaciones entre la estructura y la actividad de grupos de compuestos y la genotoxicidad de mezclas complejas (Graf *et al.*, 1984; Graf *et al.*, 1996).

De la misma manera, son posibles estudios de antigenotoxicidad de compuestos específicos o de mezclas usando cotratamientos crónicos, así como pretratamientos separados con un agente antigenotóxico seguido por un tratamiento crónico con una genotoxina (Graf *et al.*, 1998).

En general, los resultados que son positivos en ésta prueba ser considerados como válidos para la predicción de posible genotoxicidad en mamíferos (Guzmán-Rincón y Graf, 1995; Sharpe *et al.*, 2002). A ese respecto, Vogel (1987) mencionaba la necesidad de comparar los resultados de pruebas con células germinales de *Drosophila* con los resultados de pruebas *in vivo* con células germinales de mamíferos basados en estudios de dosimetría molecular. Lo anterior permitiría una adecuada comparación a partir de los mecanismos de mutagénesis. Usando como base de datos el Gen-Tox Report, Vogel concluye que la prueba de letales recesivos ligados al sexo de *Drosophila* tiene una baja sensibilidad (0.33-0.79) y una baja exactitud (0.50-0.73), sobre todo cuando se ensayan promutágenos. Sin embargo, su alta especificidad (0.86-1.0) permite hacer predicciones de genotoxicidad en mamíferos. Finalmente, comparó la prueba SMART en células somáticas de *Drosophila*: los datos del Gen-Tox Report señalaban una sensibilidad de (0.75-0.78) y una exactitud de (0.83-0.86) que ya mostraban su potencial como ensayo genotóxico.

Recientemente, un estudio epidemiológico en humanos ha sugerido que los antidepresivos tricíclicos que mostraron actividad genotóxica en la prueba SMART en el ala de *Drosophila* (van Schaic y Graf, 1991; 1993) podrían, en efecto, aumentar el riesgo de cáncer de mama en mujeres que los utilizan por prescripción médica (Sharpe *et al.*, 2002).

## 8. *Drosophila melanogaster*

### 8.1. Características y ciclo de vida

Por muchos años, la mosca del vinagre o de la fruta *Drosophila melanogaster* (Fig. 11) ha sido un organismo de investigación prominente para los genetistas. Gran cantidad de mutantes ha sido aislada y sujeta a estudios exhaustivos, lo que contribuye a un conocimiento genético y molecular de sus genes; al comparar la homología de muchos de los genes implicados en diversos organismos, incluyendo los seres humanos, se ha revelado que una buena parte de los mecanismos involucrados en la respuesta de mutagenicidad son similares (Russell *et al.*, 1990). Otra ventaja es que *Drosophila* puede realizar la mayoría de las funciones enzimáticas que se efectúan en el REL de hepatocitos humanos, lugar donde se activan gran cantidad de los cancerígenos y mutágenos indirectos. El retículo endoplásmico es considerado el responsable del metabolismo de drogas y pesticidas en insectos; las enzimas involucradas tienen acción de oxidasas y se caracterizan por carecer de especificidad al sustrato, tal como ocurre en hepatocitos de mamíferos (Guzmán y Graf, 1995).

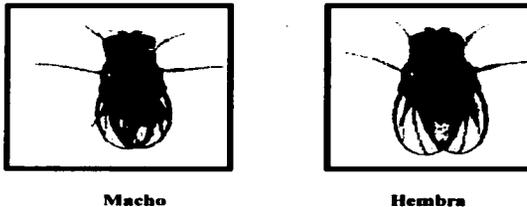
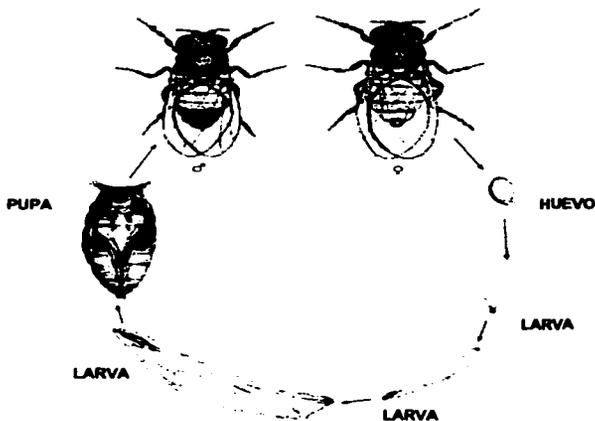


Fig. 11. La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*.

Posee además una organización celular y cromosómica similar a la de mamíferos. Presenta cuatro pares de cromosomas que han sido completamente mapeados y secuenciados (Adams *et al.*, 2000); se cultiva fácilmente a bajo costo y su ciclo de vida es de sólo dos semanas a 21 °C o de diez días a 25 °C. Una hembra puede poner hasta 500 huevos en diez días (Würgler *et al.*, 1984; Flagg, 1988; Ramos, 1993). Este elevado número de individuos por generación permite un buen análisis de tratamientos de dosis crónicas, agudas y fraccionadas (Mitchell y Combes, 1984).

El ciclo de vida de *D. melanogaster* tiene una secuencia de eventos bajo estricto control genético (Fig. 12). El ciclo inicia con la oviposición, a las 24 horas eclosionan las larvas de 1er estadio que pasan por dos estadios más de 24 y 48 horas respectivamente. Durante la fase larvaria la ingesta de alimento es continua, llegando a consumir de 3 a 5 veces su peso, incrementándolo de 0.5 a 2.0 mg (Mitchell y Combes, 1984).



**Fig. 12. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (tomado de Kalthoff, 1996).**

Una de las consecuencias de la secuenciación completa del genoma de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* es que ahora se sabe que más del 60 % de los genes implicados en enfermedades humanas tienen ortólogos en *Drosophila* (Bernards y Hariharan, 2001).

### **8.2. *Drosophila melanogaster* y los metales (AcPb)**

Está probado que los insectos como la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* responden a toxinas como los iones de metales por resistencia evolutiva (Wilson, 2001). Por otra parte, Akins, *et al.*, (1992) experimentaron con *Drosophila* como modelo para estudiar la neurotoxicidad de metales como el AcPb. La concentración experimental de 3.07 mM retardó el desarrollo de manera dosis-dependiente pero no se observó efecto sobre el sistema nervioso.

### **8.3. *Drosophila melanogaster*, nitrosaminas (DMN) y SMART**

Knasmuller *et al.* (1990) diseñaron un ensayo rápido de reparación de ADN para investigar la biotransformación de xenobióticos en *Drosophila melanogaster in vivo*. Se inyectaron soluciones de nitrosaminas aromáticas (entre ellas nitrosodimetilamina: NDMA). El orden de valores de actividades genotóxicas de las nitrosaminas encontradas en *Drosophila* está en concordancia con

aquellas potencias cancerígenas establecidas con base en experimentos con ratas. Alimentar a las moscas con FB potenció el daño de las nitrosaminas, excepto para NDMA y nitrosodietanolamina (NDELA) con menos de 25 % debido probablemente a que otras enzimas aparte del Cit P450 las activan. Los intentos por localizar la formación y/o distribución de metabolitos en los cuerpos de las moscas por separación del tegmata de los animales químicamente tratados y la determinación de efectos genotóxicos en los diferentes segmentos indican que los efectos más pronunciados ocurren en el abdomen mientras que en la cabeza y torax se detectaron actividades comparativamente menores.

Waters *et al.* (1983) estudiaron la relación entre la actividad de la DMN-desmetilasa y la mutagenesis inducida por la dimetilnitrosamina (DMN) en diferentes cepas de *Drosophila melanogaster*. Se encontró una falta de correlación entre las dos variables en todas las cepas (sobre todo Hikone-R). Las explicaciones posibles son: (i) Presencia de inhibidores de DMN-desmetilasa en los extractos de las cepas con baja actividad, (ii) un efecto secundario en la cepa Hikone-R en la cual la actividad enzimática está confinada a las hembras, (iii) posibilidad de que el tratamiento con DMN induce la actividad de la DMN-desmetilasa en las cepas de baja actividad y (iv) la posibilidad de que la cepa Hikone-R tenga un sistema de reparación de ADN más eficiente que otras cepas.

Rodríguez-Arnaiz *et al.* (1993) usaron el ensayo SMART en ojo de *Drosophila melanogaster* para estudiar la heterogeneidad genética en respuesta a cancerígenos genotóxicos que requieren conversión metabólica. Las cepas estudiadas fueron: Berlin-K, BK; Oregon-K, OK; Leiden-S, LS; y 91-C y tres resistentes a DDT (91-R; Hikone-R, HR; y Haag-79, HG). Se les sometió, entre otros compuestos a DMN, que fue fácilmente detectable en todos los distintos genotipos.

Kaya *et al.* (2000) estudiaron la respuesta adaptativa de larvas de *Drosophila* a tres agentes alquilantes usando el ensayo SMART en el ala. El diseño experimental incluyó un pretratamiento de 24 h a larvas de dos días con dos dosis adaptativas diferentes, seguidas de una dosis de reto aplicada hasta el final del desarrollo. Los resultados parecen demostrar una reducción de la frecuencia de los clones mutantes inducidos por la dosis de reto, siendo ésta la primera vez que se reporta la existencia de una respuesta adaptativa a los agentes alquilantes después de tratamiento larvario de *Drosophila* en SMART en el ala.

#### **8.4. *Drosophila melanogaster*, FB y Cit P450**

Hällström *et al.* (1983) estudiaron la actividad de enzimas microsómicas de larvas y moscas adultas de *Drosophila* pretratadas con FB. Los resultados revelan que las larvas respondieron más a la inducción que los adultos.

Zijlstra *et al.* (1984) estudiaron el metabolismo xenobiótico de *Drosophila* tomando en cuenta: a) Niveles normales de enzimas metabolizadoras de xenobióticos y sus actividades en las moscas completas, diferentes partes del cuerpo y ambos sexos, (b) los cambios en niveles y actividades de las enzimas después de pretratamiento con varios inductores (como: FB, aroclor 1254 e hidroxitolueno butilado), c) diferencias entre cepas (4 tipos silvestres, 3 resistentes a insecticidas y la w/w). Los resultados muestran considerables diferencias en algunas actividades enzimáticas entre cepas. El mejor inductor fue el FB. La línea resistente Hikone-R no fue inducible. La respuesta a compuestos inductores de enzimas tuvo comportamiento dependiente de la cepa.

Hällström *et al.* (1984) encontraron una marcada variación genética en el contenido de Cit P450 y varias actividades enzimáticas entre cepas de *Drosophila*. La cepa Oregon R resistente a insecticida difirió de las cepas susceptibles mostrando mayor actividad de metabolismo

xenobiótico. Después de tratamiento con FB se observó desde una ausencia de respuesta hasta un aumento notorio en estas variables. Las similitudes en la regulación, comparada con la de mamíferos, puede ayudar a entender la genética del metabolismo xenobiótico.

Fuchs *et al.* (1993) encontraron que el desarrollo de *Drosophila* fue marcadamente retardado y la sobrevivencia disminuyó después del tratamiento larvario con inductores como FB. La degradación de la hormona de pupación por la actividad de los Cit P450 inducido puede ser una respuesta de la elevada mortalidad larvaria.

Fuchs *et al.* (1994) estudiaron la inducibilidad de los Cit P450 en cepas de *Drosophila* (como Oregon R y 91 R). El tratamiento con FB aumentó los niveles de actividad enzimática en las cepas susceptibles más que en resistentes.

Amichot *et al.* (1998) analizaron las actividades enzimáticas de los Cit P450 de *Drosophila* en la cepa susceptible a insecticida (Canton<sup>S</sup>) y la resistente (RDDTR) con altos niveles del complejo Cit P450 induciéndolas con pretratamiento de FB. Los agentes químicos probados tuvieron diferentes efectos en las actividades enzimáticas pasando por la inducción hasta la inhibición. Los efectos variaron con las cepas y fueron inefectivos en RDDTR. Lo anterior demuestra que las actividades dependientes de Cit P450 son numerosas en *D. melanogaster* y que la regulación de éstas es compleja. La disponibilidad de cepas mutantes como RDDTR permitirá estudios fundamentales del Cit P450 en insectos.

Dunkov *et al.* (1996, 1997) y Saner *et al.* (1996) caracterizaron por primera vez un Cit P450 de *Drosophila*, el *Cyp6A2*. Este último grupo hizo secciones histológicas de larvas del 3er. estadio de la línea resistente Oregon usada en la prueba SMART teñidas con un antisuero anti-*Cyp6A2* para revelar la expresión de la enzima: ésta fue detectable en todos los tejidos, excepto las glándulas salivales y el sistema muscular de la pared corporal y el intestino. La expresión más fuerte se encontró en la grasa corporal. También se detectó en los discos imagales. Por otro lado, comprobaron por electrotransferencia tipo northern de ARN total, de diferentes estados de desarrollo de larvas de la cepa Oregon-flare usada en la prueba de SMART, que el Cit P450 *Cyp6A2* se transcribía poco a poco desde el estado embrionario, aumentando en intensidad durante los últimos estados larvarios, con un pico en el 3er. estadio larvario y la pupación para llegar a concentraciones menores en las moscas adultas. Esto es crucial en la prueba SMART porque los promutágenos deben ser activados en el estado larvario cuando la mayoría de las células se están dividiendo en los discos imagales llevando a la expresión de eventos mitóticos reconocidos como clones de células alteradas. Finalmente, estudiaron la especificidad de sustrato del Cit P450 *Cyp6A2* probando la activación de 3 cancerígenos: aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) que resultó recombinogénica, 3-amino-1metil-5H-piridol(4,3-b)indol (Trp-P-2) y 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) que no fueron recombinogénicos sino citotóxicos.

## 9. BASES GENÉTICAS DE LOS EFECTOS DETECTADOS EN LA PRUEBA SMART EN EL ALA DE *Drosophila melanogaster*

La prueba SMART (Somatic Mutation And Recombination Test) consiste en exponer a la acción de un compuesto o mezcla a poblaciones de células indiferenciadas de larvas de *Drosophila* (ordenadas en los llamados discos imagales) que están destinadas a multiplicarse en configuraciones determinadas de tal manera que una mutación inducida en una de las células expuestas dará lugar a un clon detectable. Para asegurarse de que el clon es identificable en la superficie del ala de la mosca adulta, se eligen marcadores genéticos que se expresan autónomamente en las células del ala (Graf, 1984; Guzmán-Rincón y Graf, 1995).

Las larvas de *Drosophila melanogaster* tienen dos linajes celulares: larvario e imagal. El primero está implicado exclusivamente con el desarrollo larvario y su funcionamiento, mientras que el imagal está formado por paquetes de células que se conocen como discos imagales (bolsas epiteliales que permanecen en un estado embrionario y durante la metamorfosis se evaginan y diferencian para formar las estructuras particulares del cuerpo adulto como: antenas, ojos, halterios, patas, genitales externos, etc.) (Russell *et al.*, 1990), (Fig. 13).

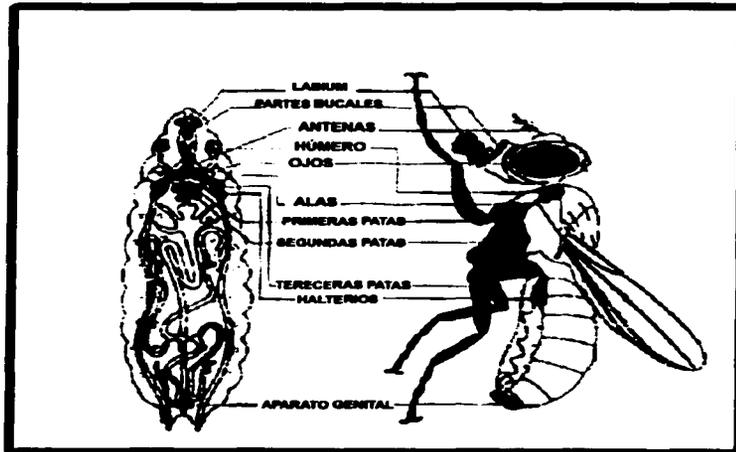


Fig. 13. Distribución de los discos imagales en la larva de *D. melanogaster* (tomado de Russell, 1998).

Desde el punto de vista genético, los discos imagales constituyen un excelente material de estudio. Cada uno de ellos aparece desde el primer estadio larvario y consiste de 20 a 50 células. A partir de este momento, el número de células por cada disco se incrementa por mitosis hasta el final de la fase larvaria en la que llega a contener miles de células por disco. Al final del tercer estadio larvario, 5 días aproximadamente después de la eclosión, la larva inicia el período de pupación en el que parte del material larvario degenera y las células indiferenciadas forman los tejidos y las estructuras del adulto que se derivan de cada disco imagal; durante este estadio la cutícula que constituye el *puparium* se oscurece y 5 días más tarde emerge la mosca adulta. Aproximadamente de 6 a 8 horas después de que las moscas macho emergen son fértiles, mientras que las hembras lo son a las 10 ó 12 horas (Mitchell y Combes, 1984).

Si durante el desarrollo larvario se induce alguna alteración en el material genético de las células imagales de las larvas (concretamente a las que darán origen a las alas), ésta será transmitida a las células hijas formando un clon o mancha de células alteradas en las alas de moscas adultas (Graf *et al.*, 1984); estas manchas se pueden observar y contabilizar con ayuda del microscopio óptico y analizar por medio del programa estadístico SMART (Frei y Würzler, 1988).

El ensayo SMART puede detectar daños generados por mutación y recombinación mitóticas. Como es sabido, la recombinación genética es un fenómeno universal de importancia para todos los sistemas biológicos desde los virus hasta los eucariotes superiores. Los procesos de recombinación contribuyen a la variabilidad genética y tienen, por tanto, aspectos evolutivos importantes. Curt Stern (1936) demostró que en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* la recombinación genética ocurre no sólo en las células meióticas sino también en las células somáticas durante la división celular mitótica. Más recientemente se ha demostrado que los fenómenos de recombinación son importantes para otras funciones celulares, como la reparación del ADN y la variación en las inmunoglobulinas de mamíferos (Engler y Strob, 1988). En la Toxicología Genética el énfasis se ha colocado tradicionalmente en la búsqueda de alteraciones genéticas clásicas como las mutaciones genéticas y las aberraciones cromosómicas. Sin embargo, también se han desarrollado pruebas para la determinación de recombinación mitótica recíproca y conversión génica mitótica, principalmente en levaduras (Zimmerman *et al.*, 1996). Se fue haciendo evidente que muchos agentes que causan daño al ADN también tienen actividad recombinogénica y que la recombinación también puede ser responsable por la pérdida de heterocigosis en las células somáticas y germinales. La pérdida de heterocigosis puede promover la manifestación de enfermedades recesivas heredables o puede estar involucrada en la progresión de las neoplasias. Este mecanismo se ha demostrado que es operativo en el caso de varios oncogenes y genes supresores de tumores (Bishop, 1991; Marshall, 1991; Sengstag, 1994; Happle, 1999). El reconocimiento de la importancia de la actividad recombinogénica para una evaluación segura de los agentes químicos ha llevado al desarrollo de sistemas experimentales capaces de medir cuantitativamente la recombinación mitótica (Spanò *et al.*, 2001). Actualmente existen diferentes sistemas de prueba en bacterias, levaduras, *Drosophila*, células de mamífero en cultivo y un mamífero *in vivo* (ratón) (Sengstag, 1994).

El ensayo de ala SMART tiene la posibilidad de exponer a un gran número de células mitóticas en los discos imagales de la larva, que darán origen a una cantidad mayor de células en estado adulto, por lo que este ensayo permite analizar muchas de células (aproximadamente 25,000 células por ala), al revisar una sola mosca (Graf *et al.*, 1984).

Las alas de *Drosophila* 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 que regulan a las células de la capa dorsal son independientes de aquellos de los de la capa ventral. 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 del ala. De esta manera puede establecerse una relación directa entre el número de pelos o tricomas en los distintos sectores de las alas y el número de células que los forman (Demerec, 1965; García-Bellido y Merriam, 1971; García-Bellido y Dapena, 1974).

### 9.1. Líneas y marcadores

Para asegurarse de que el clon es identificable en la superficie del ala de la mosca adulta, se eligen marcadores genéticos que se expresan autónomamente en las células del ala (Graf *et al.*, 1984).

Para realizar la prueba del ala de SMART se utilizan tres líneas de *D. melanogaster*: "multiple wing hairs": (*mwh/mwh*), "flare": *flr<sup>1</sup>/In(3LR)TM3, ri p<sup>o</sup> sep bx<sup>34c</sup> e (3) 89 Au Bd<sup>S</sup>* (de manera abreviada: *flr<sup>1</sup>/TM3, Bd<sup>S</sup>*) y "Oregon-flare": (*ORR(1); ORR(2); flr<sup>1</sup>/TM3, Bd<sup>S</sup>*).

"multiple wing hairs" (*mwh*): Mutación autosómica recesiva de un gen localizado en el brazo izquierdo del cromosoma 3 a 0.3 unidades de mapa (3-0.3). En homocigosis total o en mosaicos somáticos tiene la expresión fenotípica de la aparición de tres o más tricomas por célula en lugar de uno, como es el caso del fenotipo silvestre (Lindsley y Zimm, 1990). (Fig. 14).



Fig. 14. Mancha simple tipo *mwh*  
(cortesía Dr. U. Graf y Dr. H. Frei. Institute of Toxicology, ETH & University of Zürich, 1997).

"flare" (*flr<sup>1</sup>*): Mutación autosómica recesiva letal de un gen en homocigosis (Ramos, 1993). Ubicada en el cromosoma 3 a 38.8 unidades de mapa (3-38.8) más proximal que *mwh*. 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 de la mosca adulta (Graf *et al.*, 1984; Graf *et al.*, 1996). La expresión fenotípica son tricomas malformados y cortos en forma de "flama" o "rosetas de maíz" (Fig.15).



Fig. 15. Mancha simple tipo "flare"  
(cortesía Dr. U. Graf y Dr. H. Frei. Institute of Toxicology, ETH & University of Zürich, 1997).

"Beaded-Serratia" ( $Bd^S$ ): Para reconocer fenotípicamente a la línea, se utiliza este marcador dominante que se manifiesta como "muescas" en el borde de las alas. Este alelo del locus *Beaded* fue originalmente llamado *Serratia* (*Ser*): se localiza en el brazo derecho del cromosoma 3 (3-92.5) y es letal en homocigosis (Ramos, 1993; Lindsley y Zimm, 1990) (Fig. 16).



Fig. 16. Ala con muescas en los bordes  
(marcador "*Beaded-Serratia*").

*In(3LR)TM3* ("Inversion (3 left, right) Third Multiple 3"): Como los marcadores  $flr^1$  y  $Bd^S$  son letales en homocigosis, para mantener las líneas *flare* y *Oregon-flare* portadoras de esa mutación, se requiere la presencia del cromosoma balanceador  $TM3$  que porta tres inversiones, dos paracéntricas (L y R) y una paracéntrica (L + R), que reduce la probabilidad de obtener recombinación entre los cromosomas homólogos durante la meiosis, manteniendo así intacto el gen mutante de interés ya que se impide la formación de nuevos arreglos cromosómicos originados por recombinación y se producen sólo los individuos heterocigotos para los marcadores letales (Graf *et al.*, 1996).

"*Oregon-flare*": *Drosophila* cuenta con enzimas de desintoxicación similares a las contenidas en la fracción S9 del hígado de mamíferos (Clark, 1982; Hällström *et al.*, 1984) y se ha demostrado que están presentes en mayor proporción durante la fase larvaria de este insecto. Estas enzimas son parte del complejo Cit P450 (Mitchell y Combes, 1984) y participan de manera importante en la

reducción-activación de promutágenos y en el metabolismo de xenobióticos, en particular en moléculas que contienen átomos de nitrógeno, como en el caso de aminas metiladas, aminas, nitrosaminas, hidrazinas y aminas aromáticas (Zijlstra, 1984).

Con el objetivo de detectar mediante esta prueba a los promutágenos que deben ser activados metabólicamente por los Cit P450, Frölich y Würglar construyeron la línea Oregon-flare en 1989. Esta línea porta los cromosomas 1 y 2 de la línea Oregon R(R) resistente al DDT (Graf y van Schaik, 1992; Delgado Rodríguez *et al.*, 1995). El cromosoma 2 a su vez porta la mutación dominante *Rst(2)DDT* ubicada en la región 43E (2-164.5) la cual confiere no solo la resistencia a DDT e insecticidas organofosforados en larvas y adultos, sino también el incremento general en el metabolismo xenobiótico. Esta mutación es responsable de incrementar de manera constitutiva los niveles de Cit P450 (Hällström y Blanck, 1985 en Graf y van Schaik 1992; Delgado Rodríguez *et al.*, 1995) pues provoca la expresión constitutiva de una proteína inductora de los genes del complejo Cit P450 (*Cyp6A8* y *Cyp6A9* del cromosoma 1 y *Cyp6A2* del cromosoma 2); consecuentemente esto ha permitido detectar la genotoxicidad de promutágenos (Graf y Singer, 1992). En otras palabras, existe una línea silvestre Oregon (abreviada OR), de ésta se deriva la línea resistente al DDT llamada Oregon R (abreviada OR(R) y también (ORR) y en la prueba SMART se utiliza la línea Oregon-flare que consta del marcador flare más los cromosomas 1 y 2 de ORR (abreviada: ORR-*flr*<sup>+</sup>) usada para la cruce de bioactivación elevada (BE). Saner *et al.* (1996) han probado que el Cit P450 *CYP6A2* de esta línea es el responsable de su resistencia al aumentar su metabolismo xenobiótico.

## 9.2. Cruzas de Bioactivación Elevada (BE) y Estándar (E)

**Cruza de Bioactivación Elevada (BE):** Originalmente se diseñó con hembras vírgenes Oregon-*mwh* y machos Oregon-*flare* según lo propuesto por Frölich y Würglar (1989), pero Graf y van Schaik (1992) demostraron que la cruce presentaba numerosas desventajas como la presencia de un patrón irregular en las manchas de las alas que las hacía difíciles de clasificar generando gran variación en los resultados de las repeticiones de los experimentos, por lo que sugirieron el uso de la cruce recíproca además de que así se obtienen más individuos por generación. Actualmente la cruce se realiza con hembras vírgenes Oregon-*flare* y machos *mwh*. Es decir: (ORR(1); ORR(2); *flr*<sup>+</sup>/TM3, *Bd*<sup>5</sup>) x *mwh/mwh* lo que da origen a larvas transheterocigotas (ORR(1)/+; ORR(2)/+; *mwh flr*<sup>+</sup>/*mwh*<sup>+</sup> *flr*<sup>+</sup> y también ORR(1)/+; ORR(2)/+; *mwh flr*<sup>+</sup>/TM3, *Bd*<sup>5</sup>).

La cruce BE tiene altos niveles constitutivos del sistema Cit P450 por lo que estas enzimas se encuentran siempre presentes.

**Cruza Estándar (E):** Se cruzan hembras vírgenes *flare* con machos *mwh* (Guzmán-Rincón y Graf, 1995); es decir (*flr*<sup>+</sup>/TM3, *Bd*<sup>5</sup> x *mwh/mwh*). Las larvas transheterocigotas producidas tienen genotipo (*mwh flr*<sup>+</sup>/*mwh*<sup>+</sup> *flr*<sup>+</sup>) y las heterocigotas (*mwh flr*<sup>+</sup>/TM3, *Bd*<sup>5</sup>).

La cruce E tiene niveles regulados de Cit P450, por ello, requiere una concentración mínima del compuesto a metabolizar para que haya síntesis de estas enzimas (Parke *et al.*, 1991).

En ambas cruizas, los dos genotipos de larvas que se producen lo harán teóricamente en proporción 1:1, pero no será sino hasta que se recuperen los adultos que se verá que el primer genotipo produce moscas con alas tipo silvestre (sin muescas en los bordes) y el segundo genotipo alas con muescas en los bordes (tipo *Beaded-Serratia*) por el gen heredado (Fig. 17).



Fig. 17. Tipos de alas según el genotipo heredado por las larvas de las cruizas BE y E.

### 9.3. Tratamientos

Las larvas transheterocigotas pueden ser tratadas de manera aguda (2 a 6 horas) o crónica (48 h) por vía oral, inhalación o inyección de los compuestos a probar (Fig. 18).

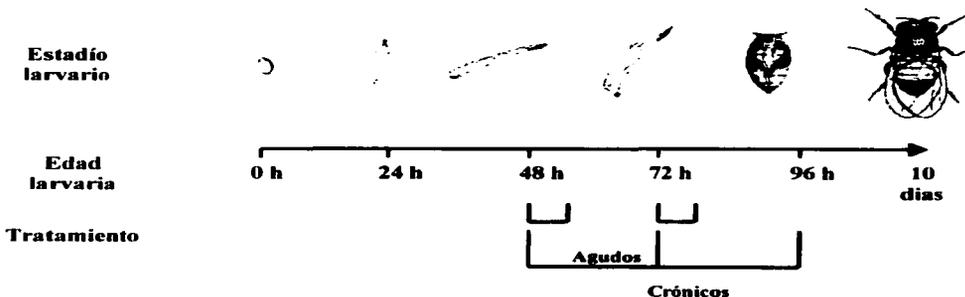


Fig. 18. Tiempos de tratamientos para la prueba SMART de *Drosophila melanogaster* (tomado y modificado de Guzmán-Rincón *et al.*, 2001).

#### 9.4. Preparaciones permanentes

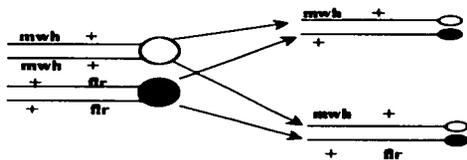
Cuando emergen las moscas adultas, se colectan y se fijan en alcohol de 70 %. Después se realizan preparaciones permanentes lavando con agua simple las moscas que estaban en alcohol, separando las alas del resto del cuerpo con pinzas entomológicas y colocándolas en un portaobjetos con solución de Faure. Se ponen los portaobjetos en una plancha a 40°C durante 24 h, se agregan 2 gotas de solución de Faure y se cubren con un cubreobjetos del No. 1. Ya secas se revisan en el microscopio óptico a 40X buscando la presencia de manchas o clones de células mutantes inducidos por el agente probado. Se contabiliza la frecuencia de manchas por ala y por individuo, así como el tipo de estas (Graf *et al.*, 1984).

#### 9.5. Tipos de clones (manchas)

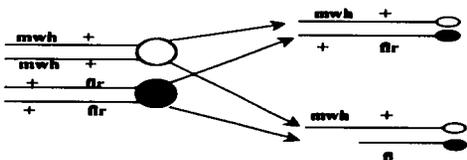
Las diferentes clases de manchas registradas pueden deberse a varios tipos de eventos genéticos (Figs. 19a, b). Las manchas **simples *mwh*** indican entre otros eventos, recombinación entre *mwh* y *flr<sup>3</sup>*. También pueden recobrase manchas **simples *flr<sup>3</sup>* ó *mwh*** por eventos como mutación puntual, pérdida parcial y total del cromosoma 3, aneuploidía y no disyunción (Graf *et al.*, 1984). El uso de dos genes en el mismo cromosoma marca la posibilidad de discernir la ocurrencia de recombinación en la región delimitada entre el marcador *flr<sup>3</sup>* y el centrómero. Como resultado de eventos de recombinación pueden recobrase manchas **gemelas** que presentan tricomas tipo *mwh* y tipo *flr<sup>3</sup>* (Fig. 24) por recombinación en el intervalo proximal al centrómero que es acotado por el marcador *flr<sup>3</sup>*.

**1 CELULA MITOSIS 2 CELULAS**

**CLONES RESULTANTES**

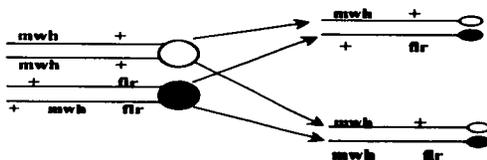


**NORMAL**



**MANCHA SENCILLA**  
*mwh*

**DELECIÓN**



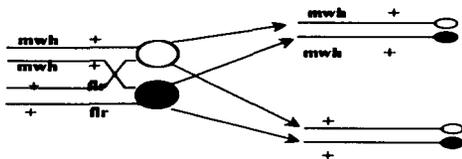
**MANCHA SENCILLA**  
*mwh*

**MUTACIÓN PUNTUAL**

**Fig. 19a. Eventos genéticos que llevan a la pérdida de la heterocigosia y la formación de manchas en la prueba SMART (tomado de Guzmán-Rincón y Ramírez-Victoria, 2001. Modificado de Graf *et al.*, 1984).**

1 CELULA MITOSIS 2 CELULAS

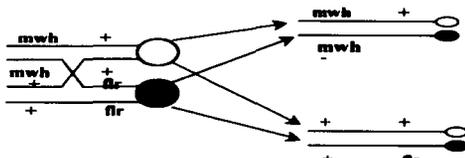
CLONES RESULTANTES



RECOMBINACIÓN



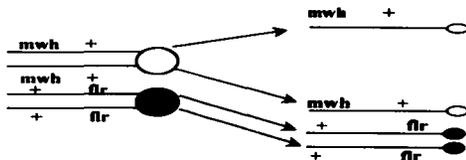
MANCHA  
GEMELA  
*mwh/ flr<sup>2</sup>*



RECOMBINACIÓN



MANCHA  
SENCILLA  
*mwh*



NO DISYUNCIÓN



MANCHA  
SENCILLA  
*mwh*

Fig. 19b. Eventos genéticos que llevan a la pérdida de la heterocigosis y la formación de manchas en la prueba SMART (tomado de Guzmán-Rincón y Ramírez-Victoria, 2001. Modificado de Graf *et al.*, 1984).



**Fig. 20. Mancha gemela ( $mwh-flr^1$ )**  
(cortesía Dr. U. Graf y Dr. H. Frei. Institute of Toxicology, ETH & University of Zürich, 1997).

Por todo lo anterior, la observación al microscopio de las alas con borde silvestre (sin muescas) y genotipo  $mwh\ flr^{2+} / mwh^+ flr^2$ , (para la cruce estándar) o genotipo  $(ORR(1)/+ ; ORR(2)/+ ; mwh\ flr^{2+} / mwh^+ flr^2$  (para la cruce de bioactivación elevada) permite observar los tres tipos de manchas (simples  $mwh$ , simples  $flare$  y gemelas). Las simples pueden ser producto de mutación y de recombinación y las gemelas exclusivamente de la recombinación. En cuanto a las alas de borde con muesca que heredan el cromosoma balanceado que porta el gen  $Bd^S$  (*Serratia*) y cuyo genotipo es  $mwh\ flr^{2+} / + flr^{2+} / TM3, Bd^S$  (para la cruce estándar) y  $ORR(1)/+ ; ORR(2) / + ; mwh\ flr^{2+} / TM3, Bd^S$  (para la cruce de bioactivación elevada) no se puede presentar la recombinación por lo que todas las manchas que se recuperen serán producto de mutaciones somáticas. Lo anterior permite determinar cuantitativamente la actividad recombinogénica de las genotoxinas, al comparar la frecuencia de manchas simples  $mwh$  en alas de mosca *Serratia*, con la obtenida en las alas de fenotipo silvestre (Graf *et al.*, 1984; Graf y van Schaik, 1992; Delgado Rodríguez y Graf, 1994).

#### 9.6. Tamaño de los clones (manchas)

Es importante registrar el tamaño de las manchas ya que teóricamente refleja el número de divisiones celulares<sup>1</sup> que ocurrieron después de la inducción del cambio genético en la célula afectada original, por lo que puede ser un indicador indirecto de la actividad del compuesto y de la velocidad con la que alcanza a la célula blanco (Graf *et al.*, 1984). Lo anterior es válido siempre y cuando no exista detención mitótica o muerte celular, en cuyo caso el tamaño de las manchas recobradas será menor al que teóricamente debiera ser recobrado. Así, una mancha formada por 16 tricomas (células) debe haberse formado a través de 4 ciclos de división.

<sup>1</sup> 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<sup>0</sup> a 2<sup>n</sup> 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 *et al.*, 1984).

Por otro lado, ante una misma exposición a un mutágeno, es posible encontrar algunos organismos especialmente susceptibles en los cuales el efecto se expresa de forma marcada, mientras que otros no muestran signos de la exposición. Lo anterior es cuantificado a través de la determinación del número de manchas por mosca lo que indica la proporción de organismos afectados y la magnitud del daño encontrados en éstos. El uso de diferentes métodos de análisis de los resultados obtenidos, permite la revisión de distintos niveles de la respuesta de genotoxicidad.

#### 9.7. Registro de datos y criterios de lectura.

La Fig. 21 muestra un ala de *Drosophila melanogaster* con sus venas y secciones (A, B, C', C, D', D, E). Cada ala en las preparaciones se observa bajo el microscopio óptico a 40X y los datos se registran en un formato diseñado para ese fin, anotando el sector donde se encontró la mancha. Por ejemplo: A 2-0 significaría que se encontró una mancha simple en la sección A del ala con un clon *mwh* de dos células y ningún clon tipo *flare*. En otro ejemplo, C' 0-4 significaría que se encontró una mancha simple en la sección C' ningún clon *mwh* y un clon *flare* de cuatro células. Finalmente, en el siguiente ejemplo: E 3-4 la interpretación es que se encontró una mancha gemela en la sección E con un clon *mwh* de tres células y un clon *flare* de cuatro células.

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

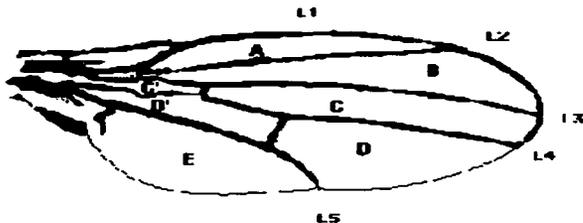


Fig. 21. Ala de *Drosophila melanogaster* con sus venas y secciones (A, B, C', C, D', D y E) (tomado de García-Bellido, 1971).

## 9.8. Hipótesis y estadística

Frei y Würgler (1988) diseñaron un programa estadístico para evaluar la significancia de los datos y discutir los parámetros que pueden afectar un experimento, así como decidir si los resultados indican un resultado positivo, débil positivo, negativo o indeciso (Frei, 1994; Frei y Würgler, 1995). Para éste fin se combinan dos pruebas estadísticas: una la hipótesis nula ( $H_0$ ) que supone que el tratamiento experimental no incrementa la frecuencia de la expresión de las manchas ocurridas de manera espontánea en el testigo negativo; y otra relacionada con la hipótesis alternativa ( $H_A$ ) que supone *a priori* que un tratamiento experimental determinado incrementa la frecuencia espontánea por un cierto múltiplo ( $\rho$ )<sup>2</sup> de la frecuencia obtenida en el testigo negativo.

Rechazar ( $H_A$ ) significa que la frecuencia de daño en los tratamientos experimentales no es estadísticamente significativa. Dado que el nivel de riesgo "cero" es imposible debido a que existe mutación espontánea, el riesgo se establece en términos de un cierto número múltiplo de la frecuencia de mutación espontánea ( $\rho$ )<sup>2</sup> (Frei y Würgler, 1995).

Para el análisis estadístico se utiliza el programa estadístico SMART PC-versión 2.1 realizado por Frei y Würgler (1989, sin publicar) el cual se basa en la prueba no paramétrica de  $\chi^2$  de proporciones con la corrección de Yates. El nivel de ensayo se fija en  $\alpha=0.05$ .

El análisis estadístico de las manchas *pequeñas* (de 1 ó 2 células) se considera de manera independiente de las manchas *grandes* (de 3 células o más), así como de las manchas *gemelas*. Para asignar resultados negativos se escoge de manera empírica un factor de multiplicación (se designa  $m$  en lugar de  $\rho$ ). Se usa  $m=2$  para las manchas *totales* y las simples *pequeñas*, 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 rechace la ( $H_0$ ) y se acepte la ( $H_A$ ): **positivo (+)**.
3. Que se acepte ( $H_A$ ) cuando ( $H_0$ ) es verdadera: **débil positivo (w)**.
4. Que no se rechace ( $H_0$ ) cuando es falsa o que no se rechace ( $H_0$ ) cuando la ( $H_A$ ) es verdadera: **indeciso<sup>3</sup> (i)**.

De acuerdo con Frei y Würgler (1995) para obtener un diagnóstico estadístico confiable el tamaño de muestra óptimo es de 55 individuos (110 alas) por tratamiento.

**Testigo negativo ( $H_2O$ ):** Es necesario descartar el porcentaje de manchas debido a la tasa espontánea para observar el verdadero efecto producido por la sustancia en estudio. Al tener un testigo negativo disolvente, en este caso agua, se obtendrá una tasa contra la que se contrastarán las obtenidas con las concentraciones de los compuestos químicos experimentales.

<sup>2</sup>( $\rho$ ):  $\rho$  indica cuántas veces debe incrementarse el número de eventos de los tratamientos experimentales, con respecto al testigo negativo para considerar una respuesta positiva. Por ejemplo, en radiación es frecuentemente aplicado el riesgo denominado doble dosis ( $\rho=2$ ), (Frei y Würgler, 1995).

<sup>3</sup> De acuerdo con Villalobos-Pietrini, R. (1994). Términos genéticos en español. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 10 (Supl.1):31.

## **10. HIPÓTESIS**

1. Si el AcPb inhibe la síntesis del grupo hemo y por tanto la del Cit P450 y éste activa metabólicamente a la DMN, entonces el daño producido por la DMN será menor o nulo en ambas cruzas al añadir AcPb en pretratamiento de 24 h.
2. El cotratamiento de FB con AcPb puede tener dos resultados: a) efecto nulo porque el FB induce la síntesis de los Cit P450 pero el AcPb afecta la síntesis del grupo hemo destinado a los Cit P450 y b) presentar efecto si el AcPb no afecta la síntesis del grupo hemo del Cit P450 y el FB induce más su síntesis, sobre todo en la craza E.

## **11. OBJETIVO GENERAL**

Valorar el efecto genotóxico del AcPb y la DMN en larvas de las cruzas E y BE de *Drosophila melanogaster* pretratadas con FB, mediante la prueba de SMART en el ala.

## **12. OBJETIVOS PARTICULARES**

Valorar el efecto genotóxico inducido por pretratamientos agudos (24 h) con y sin AcPb (0.01, 0.1 y 1 mM), con y sin FB (12 mM), cotratamientos con AcPb+FB, y tratamientos crónicos (48 h) con y sin DMN (0.076 mM) tipo AcPb/DMN, FB/DMN y AcPb+FB/DMN en larvas de las cruzas E y BE de la prueba SMART en el ala.

### 13. MATERIALES

#### Líneas mutantes

- (a) *flare*: + *flr<sup>3</sup>* / TM3, *Bd<sup>S</sup>*
- (b) Oregon-*flare* : *ORR(1);ORR(2);flr<sup>3</sup>* / TM3, *Bd<sup>S</sup>*
- (c) multiple wing hairs: *mwh/mwh*

#### Compuestos químicos

Fenobarbital : Fenobarbital sódico, Sevenal, Laboratorios Chinoín. Lote: 410105.

Acetato de plomo: Fluka N° Cat. 15334

DMN: Sigma. CAS: N 7756. Lote: 29F0679.

Extracto de levadura: Bioxon de México. Cat: 155. Lote: 974 BOEL.

Drosophila Instant Medium: Carolina Biological Supply Co, NC, USA.

Solución de Faure: goma arábiga 30g, glicerol 20ml, clorohidrato 50g, agua 50ml.

## 14. MÉTODOS

### 14.1. LC<sub>50</sub>

Al efectuar experimentos de toxicidad (LC<sub>50</sub>) en larvas de 72 h de las líneas Oregon-flare y flare de *Drosophila* se pretendió buscar las concentraciones de AcPb que permitieran obtener el número de moscas necesarias para montar 55 organismos (110 alas) por tratamiento experimental y datos estadísticamente significativos, además de poder trabajar con la porción normal, no resistente o susceptible, de la población (Dra. Ramos. Com.pers).

1. Se cultivaron las líneas flare y Oregon-flare de *D. melanogaster* en frascos de 250 ml con hojuelas de puré de papa (Dueñas *et al.*, 2001) en incubadora a 25 °C (Graf, 1986; Katz y Foley, 1993) y 60 % humedad por 10 días.
2. Se permitió que las hembras de ambas líneas maduraran y fueran fecundadas por 3 días más.
3. Para la colecta de huevos de cada línea se trasvasaron las moscas a frascos de 250 ml con 5 cm de levadura fresca activada con agua y sacarosa preparada 24 h antes (Graf y van Shaick, 1992) y se pusieron en incubadora a 25 °C y 60 % de humedad por 8 h.
4. Posterior a las 8 h se retiraron las moscas y los frascos se mantuvieron en incubadora a 25 °C y 60 % de humedad por 72 h.
5. La colecta de larvas de 72 h (Graf, 1995) de ambas líneas se hizo retirando la levadura de los frascos con agua corriente a temperatura ambiente y utilizando una coladera de acero de malla fina.
6. En viales de cristal se añadieron 0.5 g de *Drosophila* Instant Medium (Carolina Biological Supply Co, NC, USA) y 2 ml de AcPb en las siguientes concentraciones: 0.01, 0.005, 0.0025 y 0.000625 M además de agua como testigo negativo.
7. Se introdujeron 10 larvas por vial y hubo 5 réplicas por tratamiento experimental en 5 experimentos independientes para cada línea. Se mantuvieron a 25 °C y 60 % de humedad hasta la emergencia de los imagos.
8. Se contaron las moscas sobrevivientes según emergieron.
9. Para obtener la LC<sub>50</sub> de cada línea se ajustó una función de regresión logística a los datos experimentales obtenidos utilizando el programa STATISTICA versión 6.0

### 14.2. SMART

1. Se cultivaron las líneas flare, mwh y Oregon-flare de *D. melanogaster* en frascos de 250 ml con hojuela de puré de papa (Dueñas *et al.*, 2001) en incubadora a 25 °C y 60 % humedad por 10 días.
2. Posteriormente se sexaron y aislaron hembras vírgenes de las líneas flare y Oregon-flare en las primeras 8 h de nacidas y se separaron machos de la línea mwh.
3. A más tardar el cuarto día de sexado de hembras se efectuaron las cruza E y BE en frascos de 250 ml con hojuelas de puré de papa fresco y se mantuvieron en una incubadora a 25 °C constantes (la expresión del marcador mwh es afectada por fluctuaciones en la temperatura (Graf, 1986))y 60 % de humedad durante tres días.
4. Para la colecta de huevos de cada cruza se trasvasaron las moscas a frascos de 250 ml con 5 cm de levadura fresca activada con agua y sacarosa preparada 24 h antes (Graf, 1992) y se pusieron en incubadora a 25 °C y 60 % de humedad por 8 h.
5. Posterior a las 8 h se retiraron las moscas y los frascos de levadura de la colecta de huevos se mantuvieron en incubadora a 25 °C y 60 % de humedad por 48 h.

6. La colecta de larvas de 48 h se hizo retirando la levadura de los frascos con agua corriente a temperatura ambiente y utilizando una coladera de acero de malla fina.
7. Inmediatamente después se sometieron a los siguientes pretratamientos: con y sin FB 12 mM, con y sin AcPb 1, 0.1 y 0.01 mM y con FB y AcPb en las tres concentraciones en frascos de 250 ml con 5 g de extracto de levadura en polvo más sacarosa en 20 ml de agua como alimento para recuperar las larvas 24 h después.
8. Las larvas de 72 h se colocaron en viales con 0.5 g de Drosophila Instant Medium (Carolina Biological Supply Co, NC, USA) para someterse a tratamientos crónicos: con y sin DMN (0.076 mM, según Murillo, 1997) con tres repeticiones por tratamiento experimental. Se dejó continuar el ciclo en incubadora a 25°C y 60 % de humedad hasta que emergieron los imagos.
9. Se fijaron en alcohol al 70 %, se montaron las alas por pares en preparaciones permanentes con solución de Faure.
10. Se analizaron al microscopio las superficies ventral y dorsal de cada ala en todas sus secciones con aumento de 40X.
11. Los datos obtenidos de manchas  $flr^3$  y  $mwh$  simples y gemelas fueron procesados con el programa estadístico SMART PC- versión 2.1 diseñado por Frei y Würgler (1989). En el caso de resultados tipo (i) ó (w) se llevó a cabo la prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon (Frei y Würgler, 1995) con el programa STATISTICA versión 6.0 para PC.

**Tabla 3. TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES**

<b>Cruza Estándar (E)</b> <i>flr<sup>1</sup>/TM3, Bd<sup>1</sup> x mwh/mwh</i>	<b>Cruza de Biosactivación Elevada (BE)</b> <i>ORR(1);ORR(2);flr<sup>1</sup>/TM3, Bd<sup>1</sup> x mwh/mwh</i>
<b>LARVAS</b>	
<b>* PRETRATAMIENTO (24 h)</b> (larvas de 48 h de edad)	<b>** TRATAMIENTO (48 h)</b> (larvas de 72 h de edad)
H <sub>2</sub> O	
H <sub>2</sub> O	DMN (0.076 mM)
FB (12 mM)	H <sub>2</sub> O
FB (12 mM)	DMN (0.076 mM)
AcPb (0.01 mM)	H <sub>2</sub> O
AcPb (0.1 mM)	H <sub>2</sub> O
AcPb (1 mM)	H <sub>2</sub> O
AcPb (0.01 mM)	DMN (0.076 mM)
AcPB (0.1 mM)	DMN (0.076 mM)
AcPb (1 mM)	DMN (0.076 mM)
AcPb (0.01mM) + FB (12 mM)	H <sub>2</sub> O
AcPb (0.1 mM) + FB (12 mM)	H <sub>2</sub> O
AcPb (1 mM) + FB (12 mM)	H <sub>2</sub> O
AcPb (0.01mM) + FB (12 mM)	DMN (0.076 mM)
AcPb (0.1 mM) + FB (12 mM)	DMN (0.076 mM)
AcPb (1 mM) + FB (12 mM)	DMN (0.076 mM)

AcPb (acetato de plomo), DMN (dimetilnitrosamina), FB (fenobarbital).

\*Levadura en polvo con sacarosa 10 mM.

\*\* Carolina Instant Medium.

## 15. RESULTADOS

### 15.1. Toxicidad LC<sub>50</sub>

De acuerdo con los resultados de regresión logística la LC<sub>50</sub> del AcPb para la línea *Oregon-flare* (Tabla 4) fue de 2.72 mM (Fig. 22) y para la línea *flare* (Tabla 5) de 2.91 mM (Fig. 23) (Castañeda *et al.*, 2001). Lo anterior permitió escoger las concentraciones 1, 0.1 y 0.01 mM de AcPb para lograr el 80 % de sobrevivencia y la fracción normal de la población.

Por otro lado, la consistencia de datos en cinco experimentos independientes permitió observar que para la línea *Oregon-flare* la curva de mortalidad es suave y continua (Fig. 22) pero para la línea *flare* (Fig. 23) la curva comienza disparándose rápidamente, alcanza un porcentaje de mortalidad alto en las primeras concentraciones de AcPb y luego cae bruscamente en un "valle" para después tomar la forma suave y continua de la curva en la línea *Oregon-flare*.

Lo anterior sugiere la presencia continua de los Cit P450 en *Oregon-flare* donde las concentraciones de este complejo enzimático son constitutivas (Graf *et al.*, 1984) de tal manera que al metabolizar el compuesto desde el principio de la administración (de concentraciones bajas hasta concentraciones más altas) se presenta este tipo de curva de mortalidad.

En el caso de la línea *flare* donde la síntesis de los Cit P450 está regulada (Graf *et al.*, 1984) la curva sugiere que al principio cuando la concentración de éstos es baja en las células el compuesto administrado es tóxico y mata rápidamente un porcentaje importante de individuos. Posteriormente cuando el compuesto químico alcanza una concentración mínima (Parke *et al.*, 1991) podría indicirse la síntesis de más Cit P450 que comienzan a metabolizar el agente químico disminuyendo el porcentaje de mortalidad (el "valle" en la Fig. 23). Posteriormente la curva de mortalidad se vuelve suave y continua como en *Oregon-flare* quizá porque el nivel de los Cit P450 aumentó.

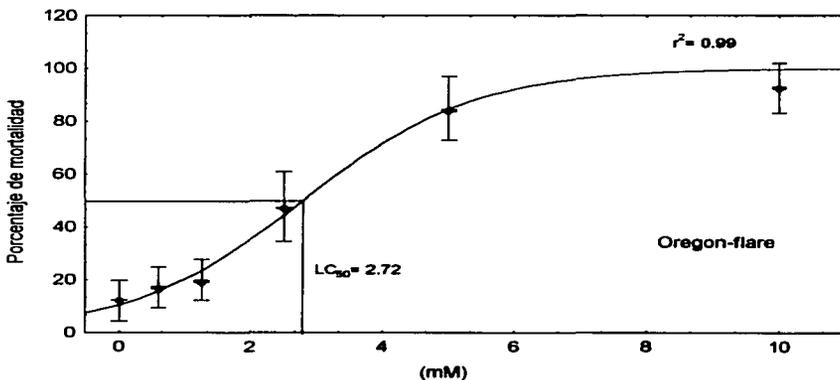
Aunque esta diferencia entre las dos líneas se repite consistentemente con otros compuestos (Castañeda *et al.*, 2001) se requieren las pruebas bioquímicas para comprobar lo anterior.

**Tabla 4. Resultados de regresión logística para calcular la LC<sub>50</sub> del AcPb en la línea Oregon-flare.**

Oregon-flare Acetato de Pb	
X	y
0	12.4
0.0071125	16.8
0.014225	19.2
0.02845	47.2
0.0569	83.97
0.1138	92.36

M= -58.7029567	$y=93,36/1+e,20150169e^{-58,7029567x}$
B= 1.82479147	$LC_{50}=0.03337586686\text{ g}$
B'= 6.20150169	$=2.72\text{ mM}$



**Fig. 22. LC<sub>50</sub> del AcPb en la línea Oregon-flare.**

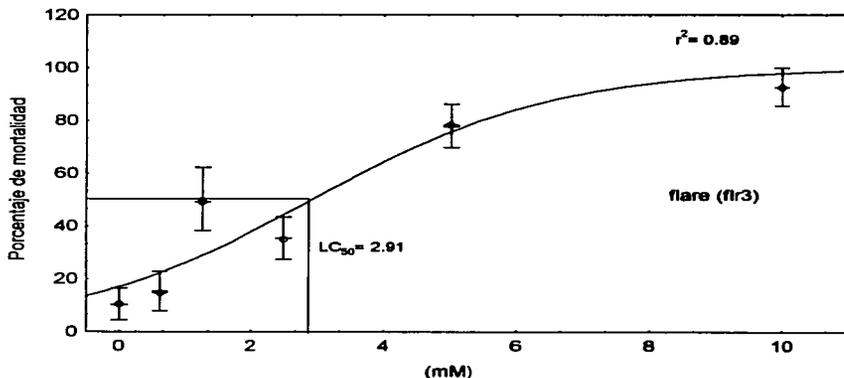
**Tabla 5. Resultados de regresión logística para calcular la LC<sub>50</sub> del AcPb en la línea flare.**

**Flare Acetato de Pb.**

x	y
0	10.8
0.0071125	14.8
0.014225	49.2
0.02845	35.2
0.0569	78.4
0.1138	92.75

**M=** -55.5775826    **y=** 83.75/1+5.475405397e<sup>-34.6773625x</sup>  
**B=** 1.70266318    **LC<sub>50</sub>=** 0.03303840302 g  
**=** 2.91 mM  
**B'=** 5.4754054



**Fig. 23. LC<sub>50</sub> del AcPb en la línea flare.**

## RESULTADOS

### 15.2. SMART

#### Testigo negativo (H<sub>2</sub>O)

El *testigo negativo* (H<sub>2</sub>O) presentó frecuencias totales de manchas/ mosca de 1.08 en BE (Fig. 24 y Tabla 6) y 0.92 en E (Fig. 25 y Tabla 7). El tamaño promedio de clon (*mean clone size*) fue de 1.56 para BE (Tabla 6) y 1.82 para E (Tabla 7).

#### Tratamiento con DMN

El *tratamiento con DMN* (48 h) arrojó frecuencias totales de manchas/ mosca de 5.15 en BE (Fig. 24, y Tabla 6) y 2.97 en E (Fig. 25 y Tabla 7) estadísticamente significativas al compararse con las frecuencias del tratamiento testigo. El tamaño promedio de clon fue de 1.86 para BE (Tabla 6) y 1.99 para E (Tabla 7). El tipo de mancha más frecuente fue pequeñas, en ambas cruzas (Figs. 28 a-b y 33 a-b).

#### Pretratamiento con FB

El *pretratamiento de FB* (24 h) tuvo una frecuencia total de manchas/ mosca) de 0.89 en BE (Fig. 24 y Tabla 6) que no fue estadísticamente significativa. Para E la frecuencia total de manchas/ mosca fue 1.6 (Fig. 25 y Tabla 7) y fue estadísticamente significativa. El tamaño promedio de clon fue de 1.87 para BE (Tabla 6) y 1.25 para E (Tabla 7). El tipo de mancha más frecuente fue pequeñas, sobre todo en E (Figs. 28 a-b y 33 a-b).

#### Pretratamiento con FB y tratamiento con DMN

El *pretratamiento de FB (24 h) con DMN (48 h) en tratamiento* presentó frecuencias estadísticamente significativas de 5.76 en BE (Fig. 24 y Tabla 6) y 5.54 en E (Fig. 25 y Tabla 7) respectivamente. El tamaño promedio de clon fue de 2.0 para BE y E (Tablas 6 y 7). El tipo de mancha más frecuente fue pequeñas, en ambas cruzas (Figs. 28 a-b y 33 a-b).

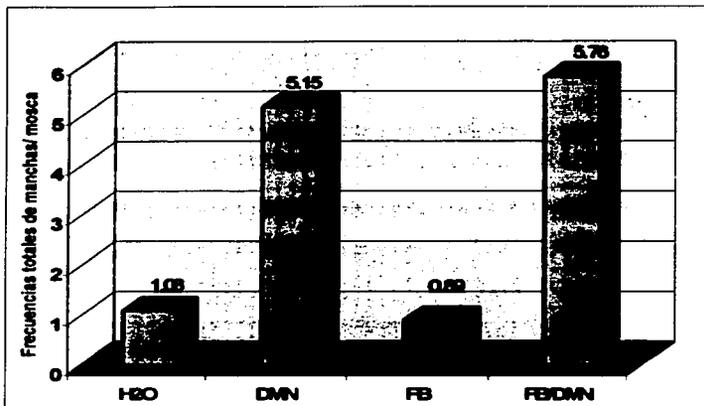


Fig. 24. Cruza BE. Frecuencias totales de manchas/ mosca paratéstigo negativo, DMN, FB, FB/ DMN.

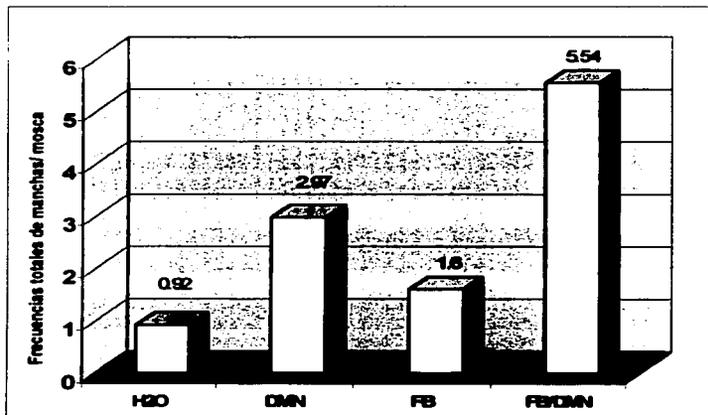


Fig. 25. Cruza E. Frecuencias totales de manchas/ mosca para testigo negativo, DMN, FB y FB/ DMN.

### **Pretratamientos con AcPb**

El *pretratamiento de AcPb (0.01 mM)* tuvo frecuencias totales de manchas/ mosca no estadísticamente significativas de 1.27 en BE (Fig. 26 y Tabla 6) y 1.11 en E (Fig. 27 y Tabla 7). El tamaño promedio de clon fue de 1.92 para BE (Tabla 6) y 1.50 para E (Tabla 7). El tipo de mancha más frecuente fue pequeñas, en ambas cruzas (Figs. 29 a-b y 34 a-b).

El *pretratamiento de AcPb (0.1 mM)* arrojó frecuencias totales de manchas/ mosca no estadísticamente significativas de 0.85 para BE (Fig. 26 y Tabla 6) y 1.41 para E (Fig. 27 y Tabla 7). El tamaño promedio de clon fue de 1.72 para BE (Tabla 6) y 1.91 para E (Tabla 7). El tipo de mancha más frecuente fue pequeñas en ambas cruzas (Figs. 29 a-b y 34 a-b).

El *pretratamiento de AcPb (1 mM)* tuvo frecuencias totales de manchas/ mosca no estadísticamente significativas de 1.27 en BE (Fig. 26 y Tabla 6) y 1.18 en E (Fig. 27 y Tabla 7). El tamaño promedio de clon fue de 1.65 para BE (Tabla 6) y 1.60 para E (Tabla 7). El tipo de mancha más frecuente fue pequeñas, en ambas cruzas (Figs. 29 a-b y 34 a-b).

### **Pretratamientos con AcPb+FB**

El *pretratamiento de AcPb(0.01 mM) con FB* arrojó la frecuencia total de manchas/ mosca no estadísticamente significativa de 0.88 en BE (Fig. 26 y Tabla 6) y 1.28 en E que sí fue estadísticamente significativa (Fig. 27 y Tabla 7). El tamaño promedio de clon fue de 1.70 para BE (Tabla 6) y 1.76 para E (Tabla 7). El tipo de mancha más frecuente fue pequeñas, en ambas cruzas (Figs. 30 a-b y 35 a-b).

El *pretratamiento de AcPb(0.1 mM) con FB* dio frecuencias totales de manchas/ mosca de 1.18 en BE (Fig. 26 y Tabla 6) y 0.94 en E (Fig. 27 y Tabla 7), no estadísticamente significativas. El tamaño promedio de clon fue de 1.69 para BE (Tabla 6) y 1.55 para E (Tabla 7). El tipo de mancha más frecuente fue pequeñas, en ambas cruzas (Figs. 30 a-b y 35 a-b).

El *pretratamiento de AcPb(1.0 mM) con FB* tuvo frecuencias totales de manchas/ mosca de 1.18 en BE (Fig. 26 y Tabla 6) y 1.15 en E (Fig. 27 y Tabla 7), no estadísticamente significativas. El tamaño promedio de clon fue de 1.77 para BE (Tabla 6) y 1.84 para E (Tabla 7). El tipo de mancha más frecuente fue pequeñas, en ambas cruzas (Figs. 30 a-b y 35 a-b).

### **Pretratamientos con AcPb y tratamiento con DMN**

El *pretratamiento de AcPb(0.01 mM) con tratamiento de DMN* arrojó frecuencias totales de manchas/ mosca estadísticamente significativas de 4.53 en BE (Fig. 26 y Tabla 6) y 2.92 en E (Fig. 27 y Tabla 7). El tamaño promedio de clon fue 2.08 para BE (Tabla 6) y 1.99 para E (Tabla 7). El tipo de mancha más frecuente fue pequeñas, en ambas cruzas (Figs. 31 a-b y 36 a-b).

El *pretratamiento de AcPb(0.1 mM) con tratamiento de DMN* tuvo frecuencias totales de manchas/ mosca estadísticamente significativas de 5.27 en BE (Fig. 26 y Tabla 6) y 3.33 en E (Fig. 27 y Tabla 7). El tamaño promedio de clon fue de 1.95 para BE (Tabla 6) y 1.86 para E (Tabla 7). El tipo de mancha más frecuente fue pequeñas, en ambas cruzas (Figs. 31 a-b y 36 a-b).

El *pretratamiento de AcPb(1.0 mM) con tratamiento de DMN* generó frecuencias totales de manchas/ mosca estadísticamente significativas de 5.88 en BE (Fig. 26 y Tabla 6) y 3.89 en E (Fig. 27 y Tabla 7). El tamaño promedio de clon fue de 1.99 para BE (Tabla 6) y 1.78 para E (Tabla 7). El tipo de mancha más frecuente fue pequeñas, en ambas cruzas (Figs. 31 a-b y 36 a-b).

#### Pretratamientos con AcPb+FB y tratamiento con DMN

El *pretratamiento de AcPb(0.01 mM) y FB más tratamiento con DMN* presentó frecuencias totales de manchas/ mosca estadísticamente significativas de 4.02 en BE (Fig. 26 y Tabla 6) y 8.00 en E (Fig. 27 y Tabla 7). El tamaño promedio de clon fue de 1.92 para BE (Tabla 6) y 2.05 para E (Tabla 7). El tipo de mancha más abundante fue pequeñas en ambas cruzas (Figs. 32 a-b y 37 a-b).

El *pretratamiento de AcPb(0.1 mM) y FB más tratamiento con DMN* arrojó frecuencias totales de manchas/ mosca estadísticamente significativas de 3.95 en BE (Fig. 26 y Tabla 6) y 4.55 en E (Fig. 27 y Tabla 7). El tamaño promedio de clon fue de 1.93 para BE (Tabla 6) y 2.05 para E (Tabla 7). El tipo de mancha más abundante fue pequeñas en ambas cruzas (Figs. 32 a-b y 37 a-b).

El *pretratamiento de AcPb(1 mM) y FB más tratamiento con DMN* dió frecuencias totales de manchas/ mosca estadísticamente significativas de 4.97 en BE (Fig. 26 y Tabla 6) y 5.04 en E (Fig. 27 y Tabla 7). El tamaño promedio de clon fue de 1.97 para BE (Tabla 6) y 2.01 para E (Tabla 7). El tipo de mancha más abundante fue pequeñas en ambas cruzas (Figs. 32 a-b y 37 a-b).

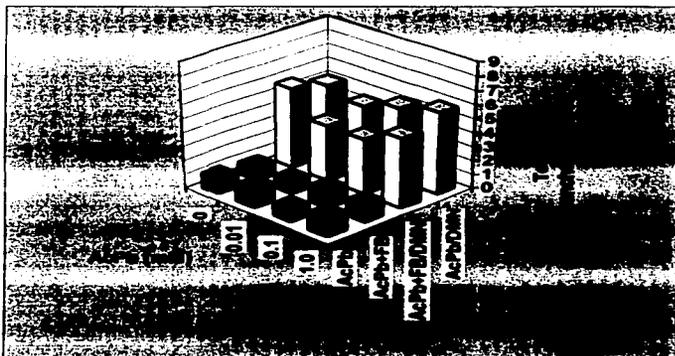
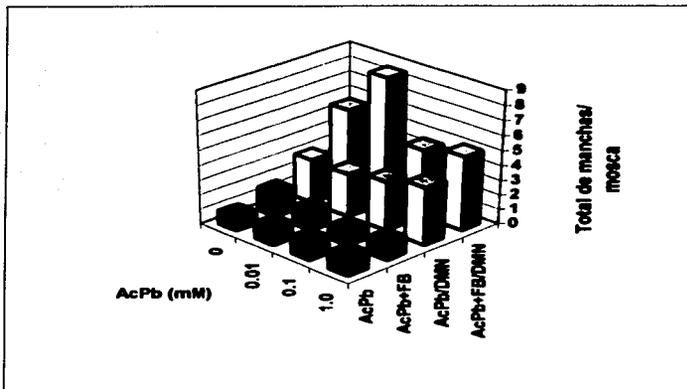


Fig. 26. Cruza BE. Frecuencias totales de manchas/ mosca por tratamiento.



**Fig. 27. Cruza E. Frecuencias totales de manchas/ mosca por tratamiento.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 6. Cruza BE. Resultados SMART (frecuencias totales de manchas/ mosca) con testigo negativo (H<sub>2</sub>O).**

Tratamiento	No. Ind. (n)	Manchas pequeñas (1-2 células m=2)	Manchas grandes (>2 células m=5)	Manchas gemelas m=5	Manchas totales m=2	Mean clone size class
H <sub>2</sub> O	62	0.96 (60)	0.09 (6)	0.02 (1)	1.08 (67)	1.56
DMN (0.076mM)	63	3.77 (238)+	0.92 (58)+	0.46 (29)+	5.15 (325)+	1.86
FB (12mM)	64	0.67 (43)-	0.18 (12)- *	0.03 (2)- *	0.89 (57) -	1.87
FB (12mM) / DMN(0.076mM)	59	4.00 (236)+	1.27 (75)+	0.49 (29)+	5.76 (340)+	2.0
AcPb (0.01mM)	61	0.95 (58)-	0.18 (11)- *	0.14 (9)+	1.27 (78) -	1.92
AcPb (0.1mM)	60	0.67 (44)-	0.14 (9) -	0.05 (3)- *	0.85 (56) -	1.72
AcPb (1mM)	62	1.06 (66)-	0.18 (11)- *	0.03 (2)- *	1.27 (79) -	1.65
AcPb (0.01mM)+ FB (12mM)	59	0.72 (43)-	0.10 (6)-	0.05 (3)- *	0.88 (52) -	1.70
AcPb (0.1mM)+ FB (12mM)	60	0.98 (59)-	0.13 (8)-	0.07 (4)- *	1.18 (71) -	1.69
AcPb (1mM)+ FB (12mM)	59	0.89 (53)-	0.25 (15)+	0.03 (2)- *	1.18 (70) -	1.77
AcPb (0.01mM) / DMN (0.076mM)	60	3.03 (182)+	1.16 (70)+	0.33 (20)+	4.53 (272)+	2.08
AcPb (0.1mM) / DMN (0.076mM)	59	3.80 (224)+	1.07 (63)+	0.41 (24)+	5.27 (311)+	1.95
AcPb (1mM) / DMN (0.076mM)	60	4.22 (253)+	1.27 (76)+	0.40 (24)+	5.88 (353)+	1.99
AcPb (0.01mM)+FB (12mM) / DMN(0.076mM)	60	2.85 (171)+	0.73 (44)+	0.43 (26)+	4.02 (241)+	1.92
AcPb (0.1mM)+FB (12mM) / DMN (0.076mM)	60	2.71 (163)+	0.78 (47)+	0.45 (27)+	3.95 (237)+	1.93
AcPb (1mM)+FB (12mM) / DMN (0.076mM)	58	3.48 (202)+	0.98 (57)+	0.50 (29)+	4.97 (288)+	1.97

Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Wurgler (1988).

+ = positivo; - = negativo; w = débil positivo; i = indicioso. m = factor de multiplicación.

Niveles de probabilidad: alfa = beta = 0.05. Pruebas estadísticas de una cola.

\* La prueba SMART arrojó resultados ( i ) para estas frecuencias pero la prueba de U (Mann-Whitney) dio valores negativos.

Los datos sombreados se analizan en detalle en la sección de Discusión.

**Tabla 7. Cruza E. Resultados SMART (frecuencias totales de manchas/ mosca) con testigo negativo (H<sub>2</sub>O).**

Tratamiento	No. Ind. (n)	Manchas pequeñas (1-2 células m=2)	Manchas grandes (>2 células m=5)	Manchas gemelas m=5	Manchas totales m=2	Mean clone size class
H <sub>2</sub> O	56	0.73 (41)	0.12 (7)	0.07 (4)	0.92 (52)	1.82
DMN (0.076mM)	36	2.19 (79)+	0.53 (19)+	0.25 (9)+	2.97 (107)+	1.99
FB (12mM)	45	1.48 (67)+	0.04 (2)-	0.06 (3)-	1.60 (72)+	1.25
FB (12mM) / DMN(0.076mM)	50	3.68 (184)+	1.18 (59)+	0.68 (34)+	5.54 (277)+	2.00
AcPb (0.01mM)	56	0.98 (55)+	0.11 (6)-	0.02 (1)-	1.11 (62)-	1.50
AcPb (0.1mM)	49	0.96 (47)+	0.18 (9)-	0.04 (2)-	1.18 (58)-	1.91
AcPb (1mM)	55	1.02 (56)+	0.13 (7)-	0.04 (2)-	1.18 (65)- *	1.60
AcPb (0.01mM)+ FB (12mM)	39	1.15 (45)+	0.13 (5)-	0.00 (0)-	1.28 (50)+	1.76
AcPb (0.1mM)+ FB (12mM)	38	0.81 (31)-	0.10 (4)-	0.02 (1)-	0.94 (36)-	1.55
AcPb (1mM)+ FB (12mM)	45	0.86 (39)-	0.24 (11)- *	0.04 (2)-	1.15 (52)-	1.84
AcPb (0.01mM) / DMN (0.076mM)	54	2.09 (113)+	0.62 (34)+	0.20 (11)+	2.92 (158)+	1.99
AcPb (0.1mM) / DMN (0.076mM)	49	2.45 (120)+	0.69 (34)+	0.18 (9)- *	3.33 (163)+	1.86
AcPb (1mM) / DMN (0.076mM)	59	2.96 (175)+	0.66 (39)+	0.27 (16)+	3.89 (230)+	1.78
AcPb (0.01mM)+FB (12mM) / DMN(0.076mM)	44	4.81 (226)+	2.36 (111)+	0.83 (39)+	8.00 (376)+	2.05
AcPb (0.1mM)+FB (12mM) / DMN (0.076mM)	40	3.05 (122)+	1.17 (47)+	0.32 (13)+	4.55 (182)+	1.96
AcPb (1mM)+FB (12mM) / DMN(0.076mM)	49	3.55 (174)+	1.06 (52)+	0.43 (21)+	5.04 (247)+	2.01

Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Wurgler (1988).

+ = positivo; - = negativo; w = débil positivo; i = indeciso. m = factor de multiplicación.

Niveles de probabilidad: alfa = beta = 0.05. Pruebas estadísticas de una cola.

\* La prueba SMART arrojó resultados ( 1 ) para estas frecuencias pero la prueba de U (Mann-Whitney) arrojó valores negativos para estos parámetros. Los datos sombreados se analizan en detalle en la sección de Discusión.

### 15.3. Cruza BE. Gráficas de tipos de manchas (pequeñas, grandes, gemelas) y de tamaño de clon *mwh*

Los tipos de manchas siempre se presentaron en el siguiente orden: pequeñas, grandes y gemelas. El tamaño promedio de clon (*mean clone size*) fue de entre 1.56 y 2.08. Los tratamientos que presentaron las frecuencias totales de manchas/ mosca estadísticamente significativas fueron: DMN, FB/DMN (Figs. 28 a, b), todos los tratamientos de AcPb/DMN (Figs. 31 a, b) y todos los tratamientos tipo AcPb+FB/DMN (Figs. 32 a, b). Ni el tratamiento con FB (Figs. 28 a, b), AcPb (0.01, 0.1, 1.0 mM) (Figs. 29 a, b) o AcPb (0.01, 0.1, 1.0 mM)+FB (Figs. 30 a y b) fueron estadísticamente significativos.

Las manchas grandes y las manchas gemelas siempre estuvieron presentes en los tratamientos con DMN: DMN, FB/DMN (Figs. 28 a, b), AcPb/DMN (Figs. 31 a, b) y todos los tratamientos tipo AcPb+FB/DMN (Figs. 32 a, b).

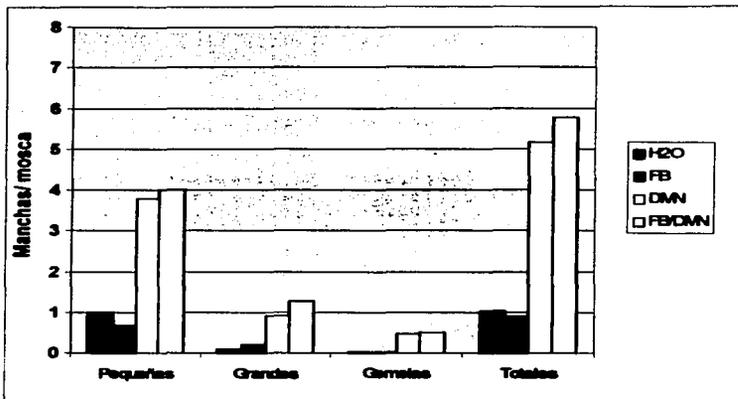


Fig. 28 a. Cruza BE. Tipos de manchas en H<sub>2</sub>O, FB, DMN y FB/DMN.

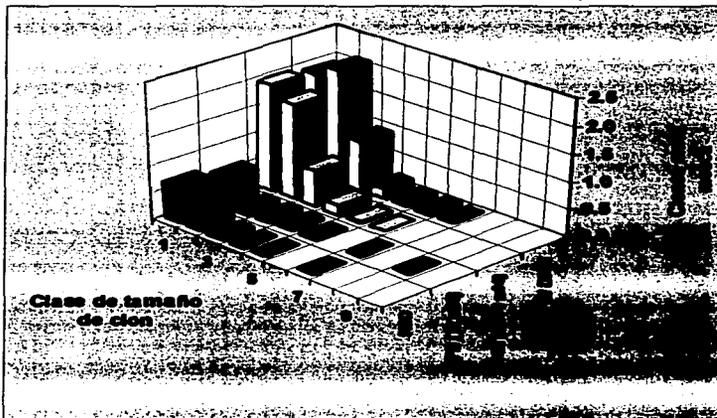


Fig. 28 b. Cruza BE. Tamaño de clon *mm* en H<sub>2</sub>O, FB, DMN y FB/DMN.

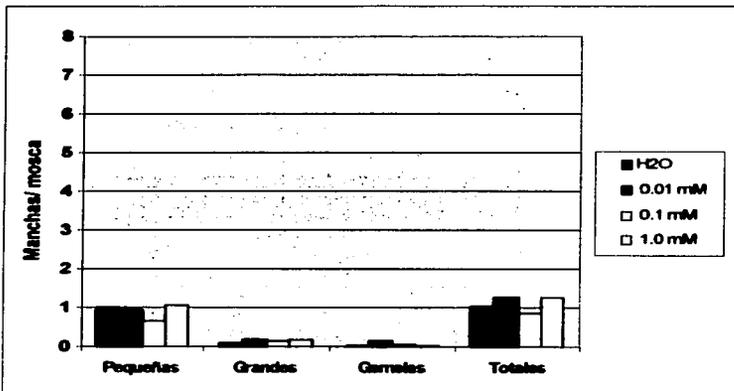


Fig. 29 a. Cruza BE. Tipos de manchas en tratamientos con AcPb.

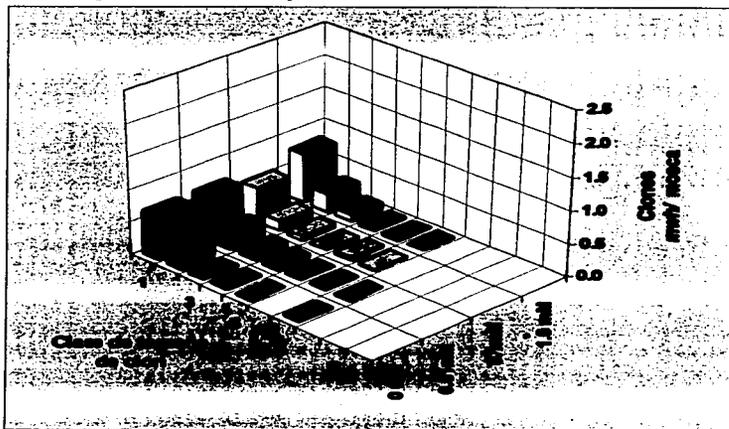


Fig. 29 b. Cruza BE. Tamaño de clon mm<sup>2</sup>/mosca en tratamientos con AcPb.

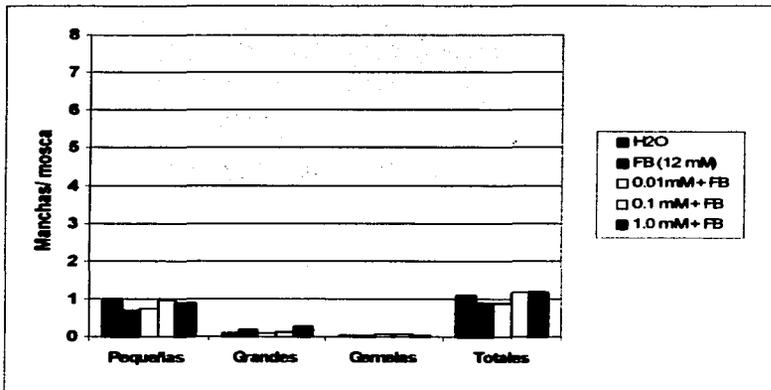


Fig. 30 a. Cruza BE. Tipos de manchas en tratamientos con AcPb + FB (12 mM).

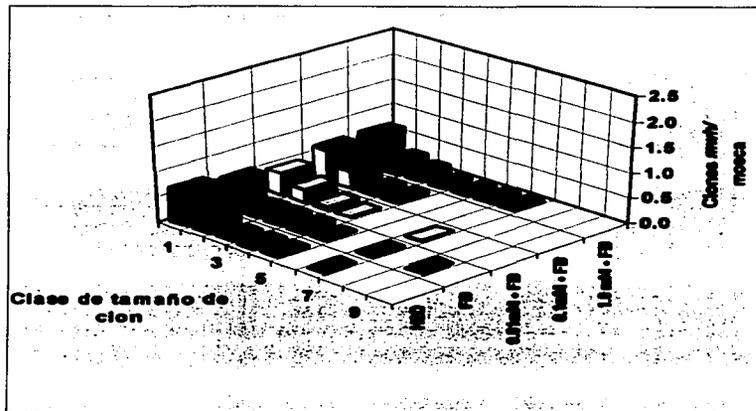


Fig. 30 b. Cruza BE. Tamaño de clon *mm* en tratamientos con AcPb+FB (12mM).

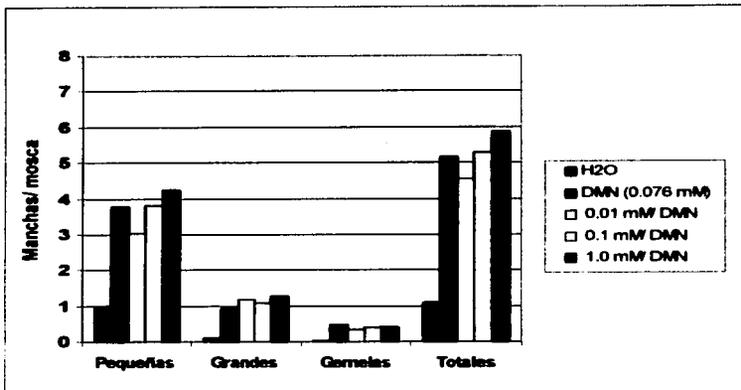


Fig. 31 a. Cruza BE. Tipos de manchas en tratamientos con AcPb/ DMN (0.076 mM).

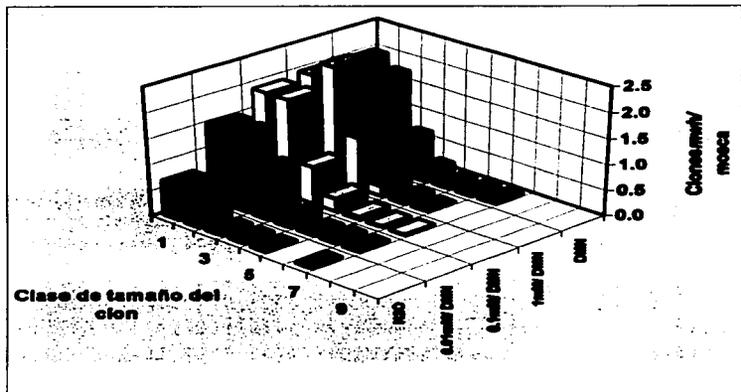


Fig. 31 b. Cruza BE. Tamaño de clon mm en tratamientos con AcPb/ DMN (0.076 mM).

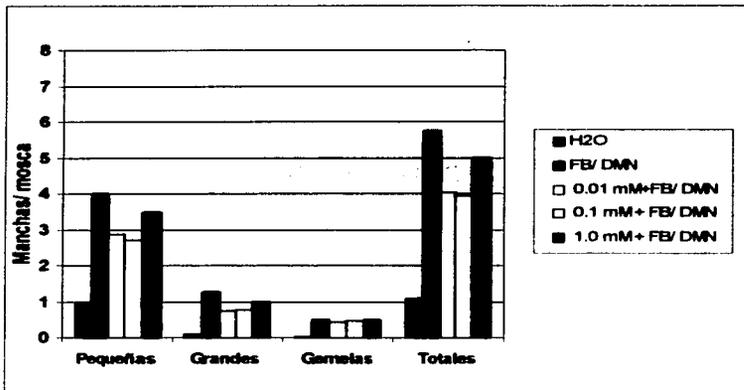


Fig. 32a. Cruza BE. Tipos de manchas en tratamientos con AcPb+FB (12 mM)/DMN (0.076 mM).

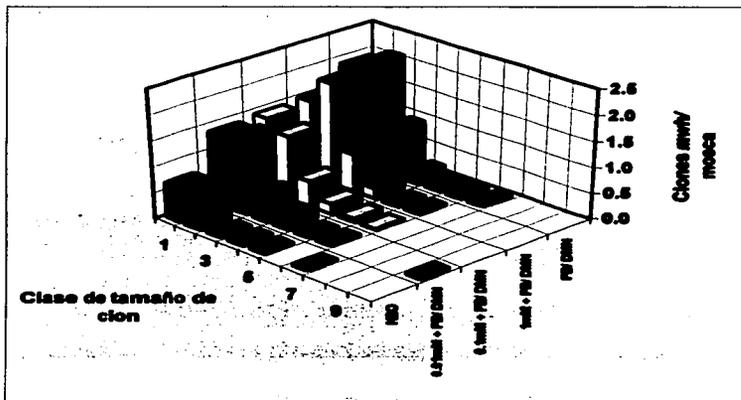


Fig. 32b. Cruza BE. Tamaño clon avu/m en tratamientos con AcPb+FB(12 mM)/DMN (0.076 mM).

#### **Cruza E. 15.4. Gráficas de tipos de manchas ( pequeñas, grandes, gemelas) y de tamaño de clon *mwh***

Los tipos de manchas siempre se presentaron en el orden: pequeñas, grandes y gemelas. El tamaño promedio de clon (*mean clone size*) fue de 1.25 a 2.05. Los tratamientos que mostraron las frecuencias totales de manchas / mosca estadísticamente significativas fueron FB/DMN (Figs. 33 a, b), todos los tratamientos de AcPb/DMN (Figs. 36 a, b) y todos los tratamientos tipo AcPb+FB/DMN (Figs. 37 a, b). Los tratamientos con AcPb (Figs. 34 a, b) no fueron estadísticamente significativos pero las manchas pequeñas sí fueron estadísticamente significativas. El tratamiento con FB (Figs. 33 a, b) presentó frecuencias de manchas totales/ mosca y manchas pequeñas estadísticamente significativas. El tamaño promedio de clon fue 1.25. Los tratamientos con AcPb/DMN (Figs. 36 a, b) fueron estadísticamente significativos.

Los tratamientos de más efecto genotóxico tuvieron siempre la combinación FB/ DMN. Las frecuencias totales de manchas/ mosca en los tratamientos con AcPb/DMN se contraponen a las de los tratamientos de AcPb+FB (Figs. 35 a, b) que bajan dramáticamente excepto para AcPb (0.01 mM)+FB.

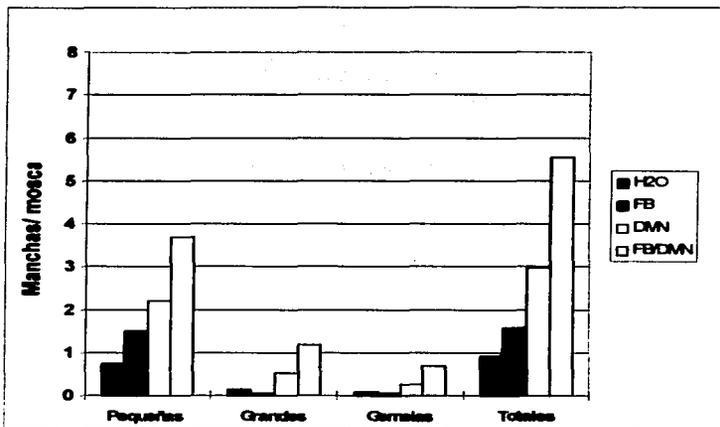


Fig. 33 a. Cruza E. Tipos de manchas en H<sub>2</sub>O, FB, DMN y FB/ DMN.

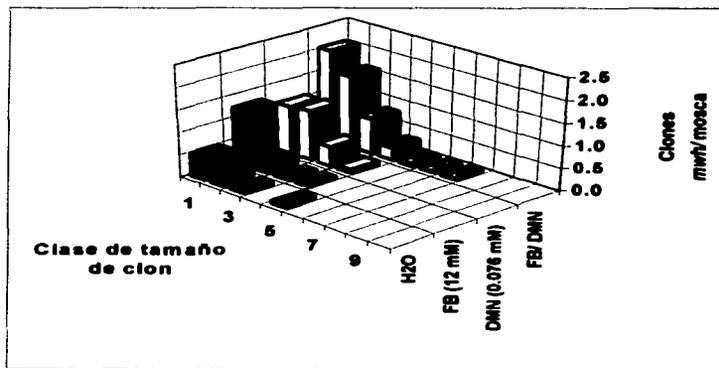


Fig. 33 b. Cruza E. Tamaño de clon mwt en H<sub>2</sub>O, FB, DMN y FB/ DMN.

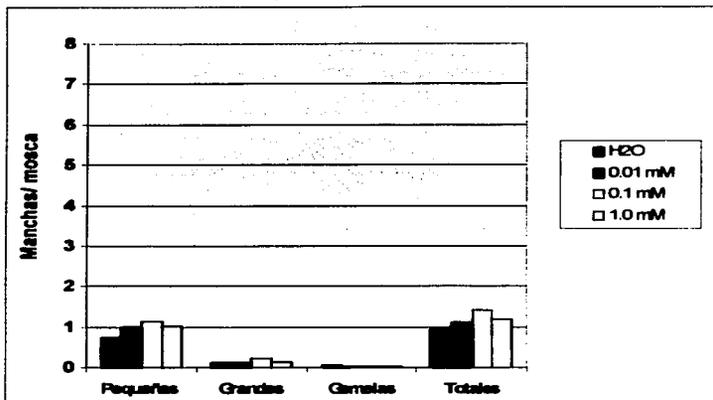


Fig. 34 a. Cruza E. Tipos de manchas en tratamientos con AcPb.

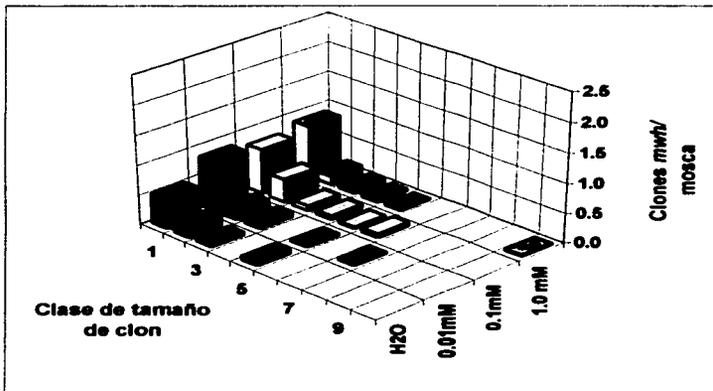


Fig. 34 b. Cruza E. Tamaño de clon mwh en tratamientos con AcPb.

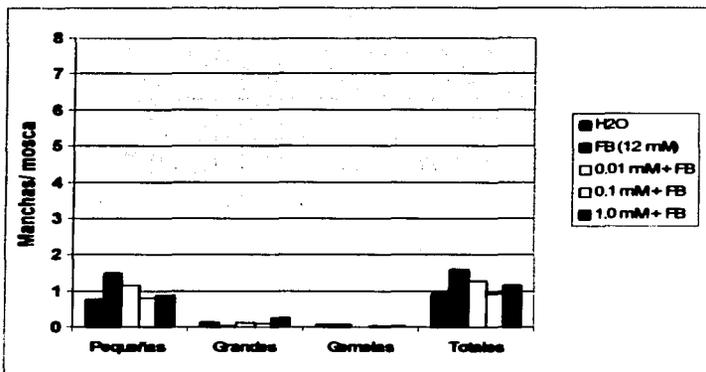


Fig. 35 a. Cruza E. Tipos de manchas en tratamientos con AcPb + FB (12 mM).

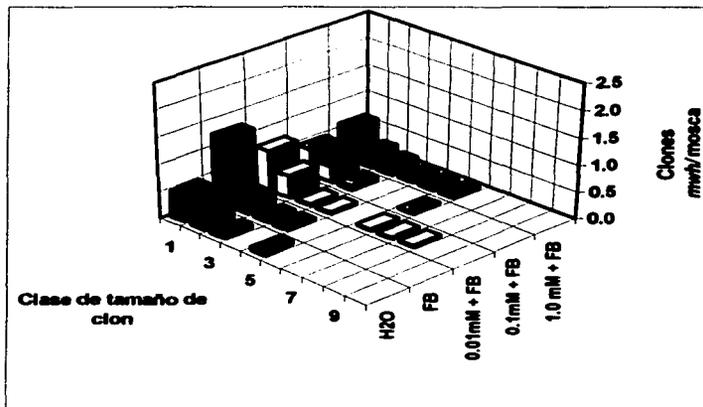


Fig. 35 b. Cruza E. Tamaño de clon mm<sup>3</sup> en tratamientos con AcPb+FB (12 mM).

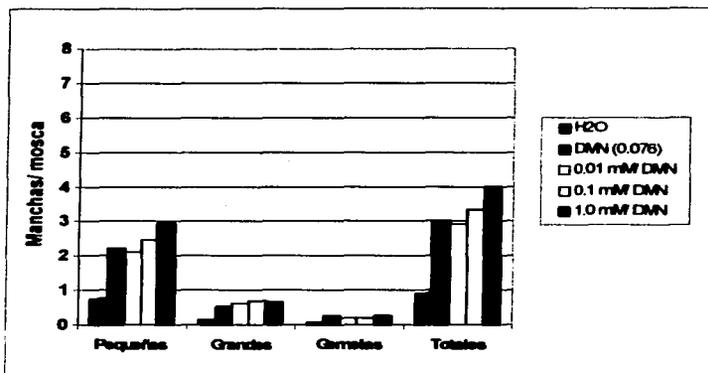


Fig. 36 a. Cruza E. Tipos de manchas en tratamientos con AcPb / DMN (0.076 mM).

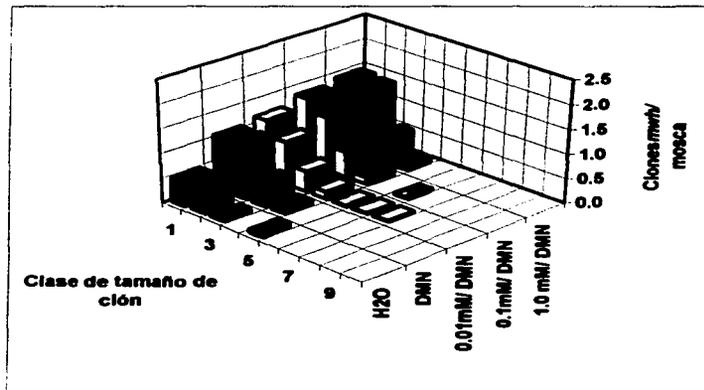


Fig. 36 b. Cruza E. Tamaño de clón *mm/h* en tratamientos con AcPb/ DMN (0.076 mM).

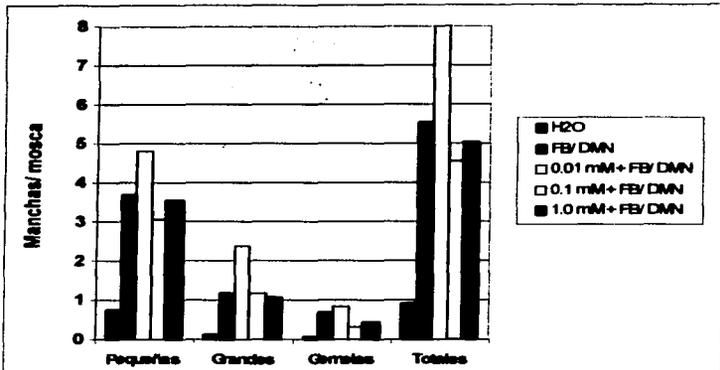


Fig. 37 a. Cruza E. Tipos de manchas en tratamientos con AcPb + FB (12 mM)/ DMN (0.076 mM).

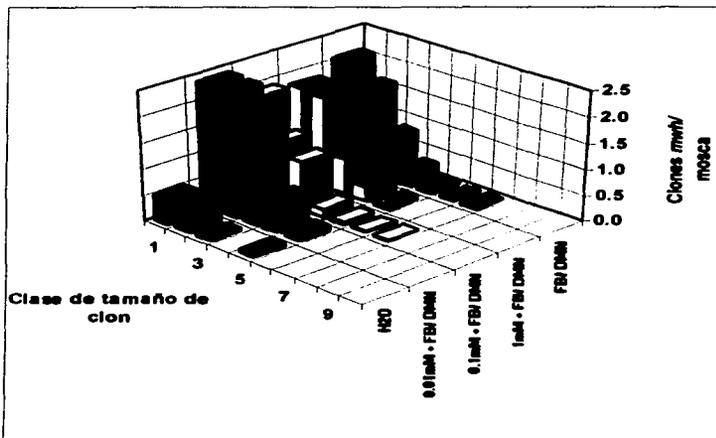


Fig. 37 b. Cruza E. Tamaño de clon mm/h en tratamientos con AcPb+FB (12 mM)/ DMN (0.076 mM).

**15.5. Frecuencias totales de manchas/ mosca en SMART con tratamientos experimentales como testigo**

El diseño experimental del presente trabajo es grande y complejo, por ello, después de correr el programa estadístico SMART con el testigo H<sub>2</sub>O y observar las frecuencias estadísticamente significativas (Tablas 6 y 7), se corrió el programa SMART con los tratamientos experimentales como testigos para encontrar las diferencias estadísticamente significativas entre unos y otros y distinguir su acción separada, sobre todo en los tratamientos con 2 ó 3 compuestos (Tabla 8).

**Tabla 8. Cruzas de BE y E. Frecuencias totales de manchas/ mosca en SMART con H<sub>2</sub>O y todos los tratamientos experimentales como testigo.**

1	2	4	5	6	7	8	9	10	14	15	16			
1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-			
2	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/w	w/-	w/-	-/-
4	+/+	■	+/+	-/-	-/w	-/-	-/w	-/-	■	FB	-/-	-/-	-/-	-/-
5	-/-	-/-	■	-/-	■	-/-	FB	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
6	-/-	-/-	-/-	-/-	-/w	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
7	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	FB	■	-/■	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
8	■	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	■	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
9	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	FB	-/-	FB	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
10	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	FB	-/-	FB	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
14	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
15	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	w/-	w/-	-/-
16	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	w/w	-/-	w/-	w/-	-/-
14	+/+	■	+/+	■	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	■	■	■	■	■
15	+/+	■	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/w	-/w	-/-	-/-	-/-
16	+/+	■	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	■	-/w	-/w	-/-	w/-

■ H<sub>2</sub>O; 2 (DMN 0.076 mM); ■ (FB 12 mM); ■ (FB/ DMN); ■ (AcPb 0.01, 0.1 y 1.0 mM); 8, 9, 10 (AcPb 0.01, 0.1 y 1.0 + FB); ■ (AcPb 0.01, 0.1 y 1.0/ DMN); ■ (AcPb 0.01, 0.1 y 1.0 + FB/ DMN).

• Los tratamientos 1 al 4 arrojaron algunos resultados inducidos que fueron procesados con la prueba de U (Mann-Whitney). Los tratamientos 5 al 16 arrojaron los resultados observados y no fueron procesados con la prueba de U (Mann-Whitney).

## 16. DISCUSION

### Testigo negativo (H<sub>2</sub>O)

El testigo H<sub>2</sub>O arrojó frecuencias totales de manchas/ mosca para las cruza BE y E dentro de lo reportado en la bibliografía especializada para un disolvente no genotóxico (Frei y Würgler, 1995).

### Tratamiento con DMN

El tratamiento con DMN fue genotóxico en ambas cruza. Esto era de esperarse pues la DMN es un agente alquilante indirecto que necesita ser activado por las enzimas Cit P450 (Magec, 1980; Baars *et al.*, 1980; Robertson *et al.*, 1983; Hakura *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1989; Knasmuller *et al.*, 1990; Vogel, 1991; González *et al.*, 1991; Rodríguez-Arnáiz *et al.*, 1993; 1996).

La frecuencia en la cruz BE es más alta que en la cruz E porque tiene síntesis constitutiva de los Cit P450 y la E síntesis regulada (Hällström *et al.*, 1982, 1984; Vogel, 1980; Graf *et al.*, 1984; Waters y Nix, 1988; Sundseth *et al.*, 1990; Fuchs *et al.*, 1994; Meyer y Zanger, 1997; Saner *et al.*, 1996; Maitra *et al.*, 1996; Dombrowski *et al.*, 1998; Maitra *et al.*, 2000), de tal manera que activa más moléculas de DMN que metilan el ADN.

El análisis de las frecuencias (Tablas 6 y 7) y gráficas de tipos de manchas y tamaño de clon (Figs. 28 a, b-Figs. 33 a, b) para BE y E respectivamente muestran el efecto clastogénico y recombinogénico de esta nitrosamina (Magec, 1980; Vogel, 1991).

### Pretratamiento con FB

El pretratamiento con FB (12 mM), un poderoso inductor de la síntesis de los Cit P450 (DePierre y Ernster, 1980; Beckman, 1984; Dunkov *et al.*, 1996, 1997; Amichot *et al.*, 1998; Zelko y Negishi, 2000; Becker *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001), más en larvas que en moscas adultas de *Drosophila* (Hällström *et al.*, 1983) no presentó efecto genotóxico en la cruz BE pero sí en la cruz E con casi el doble de la frecuencia del tratamiento testigo. Esta expresión diferencial inducida por FB que se manifiesta en las cepas susceptibles más que en las cepas resistentes de *Drosophila* está en concordancia con Vogel, (1980), Hällström *et al.* (1982), Zijistra *et al.* (1984); Fuchs *et al.* (1994); Maitra *et al.* (1996) y Amichot *et al.* (1998).

Por otro lado, Graf y Singer (1992) utilizando la prueba de SMART en el ala, dieron un pretratamiento de 24 h de FB (10 y 20 mM) a larvas de 48 h de edad de la cruz E que resultó indeciso (i) en el programa estadístico SMART. La diferencia de los resultados puede deberse al número de organismos estudiados: 20 moscas (40 alas) en ese estudio y 45 moscas (90 alas) en este. No se recuperaron 55 organismos porque la sobrevivencia bajó notoriamente en la cruz E (Tabla 7) y esto puede haber sucedido en respuesta al pretratamiento larvario con el inductor FB lo que concuerda con Fuchs *et al.* (1993). Su hipótesis es que los Cit P450 inducidos degradan la ecdisona (hormona de la pupación) lo que se traduce en alta mortalidad. Siguiendo esta idea, la cruz BE en este estudio presentó tasas altas de sobrevivencia porque metabolizó el FB antes de la posible inducción de síntesis de otros tipos de Cit P450.

La capacidad en la inducción de la expresión génica de las enzimas Cit P450 mediada por FB puede ser inhibida, incluso, por compuestos normalmente presentes en la célula como el AMPc intracelular y la proteinasina-A (Sidhu y Omiecinski, 1995), citocinas proinflamatorias (Pan *et al.*, 2000), el TNF (Van Ess *et al.*, 2002) e incluso el (-) - N-3-Benzil-fenobarbital (enantiómero del

fenobarbital) que es un inhibidor selectivo potente de los genes que codifican para ciertos Cit P450 (Suzuki *et al.*, 2002).

Sin embargo, tomando en cuenta que la principal diferencia bioquímica conocida entre las cruza de la prueba SMART es el nivel de los Cit P450 que metabolizan entre otros sustratos, el FB, y la evidencia experimental con la que se cuenta, la explicación posible es que la cruz E tiene niveles regulados de los Cit P450 y requiere de una concentración mínima del compuesto a metabolizar para que haya más síntesis de estas enzimas (Parke *et al.*, 1991). Mientras esto sucede, el FB tiene efecto genotóxico (El-Masri *et al.*, 1998; Hamadeh *et al.*, 2002 b; Williams *et al.*, 1998; Shane *et al.*, 2000 a; Deutsch *et al.*, 2001; Shibutani *et al.*, 2002; Watson y Goodman, 2002) en la concentración estudiada (12 mM), causando daño al ADN en tanto es biotransformado (Tredger y Stoll, 2002), lo que explica la diferencia con la cruz BE que tiene niveles altos de los Cit P450 que metabolizan rápidamente el FB evitando que acción genotóxica. Por tanto, de acuerdo con la prueba SMART, FB no es un promutágeno que requiera activación metabólica ya que la cruz de BE hubiera mostrada frecuencias estadísticamente significativas; los resultados sugieren que es un mutágeno directo. Además, el análisis de las frecuencias de manchas (Tablas 6 y 7) y las gráficas de tipos de mancha y tamaño de clon (Figs. 28a, b-Figs. 33a, b) para BE y E respectivamente permite ver que el efecto del FB es clastogénico, en concordancia con (Deutsch *et al.*, 2001), pues la frecuencia de manchas pequeñas es estadísticamente significativa en E, pero no en BE, revelando un efecto no al final sino al principio del tratamiento que evita que haya más divisiones celulares y, en consecuencia, manchas grandes. El FB tampoco parece tener efecto recombinogénico pues no hay frecuencias de manchas gemelas estadísticamente significativas en ninguna de las cruza.

Por otra parte, que el FB muestre efecto genotóxico en la prueba SMART se suma a la lista de los aún pocos experimentos sobre su genotoxicidad (Graf y Singer, 1992; Shane *et al.*, 2000 a; Deutsch *et al.*, 2001; Watson y Goodman, 2002) y tiene relevancia para los estudios del metabolismo xenobiótico sobre resistencia a insecticidas, cáncer y la eliminación, biotransformación y acción genotóxica de fármacos y otros compuestos donde se le utiliza como inductor pues habrá que tomar en cuenta que suma su acción a la de las sustancias estudiadas para no llegar a conclusiones falsas.

### **Pretratamiento con FB y tratamiento con DMN**

El pretratamiento de FB más tratamiento con DMN arrojó frecuencias estadísticamente significativas prácticamente iguales en ambas cruza, sobre todo en E si se comparan las frecuencias totales de manchas/mosca de esta cruz para los tratamientos FB y DMN administrados por separado, lo que evidencia un efecto sinérgico (Tablas 6, 7 y 8). Esto concuerda con Klauinig *et al.* (1988) y Weghorst *et al.* (1989) que ya habían demostrado que la mezcla FB-DMN tiene sinergia en ratones, con Knasmuller *et al.* (1990) que observaron que alimentar a *Drosophila melanogaster* con FB potencia el efecto de las nitrosaminas y con Vogel, (1980) y Hallström, (1982) que demostraron un mayor efecto genotóxico de ambos compuestos en cepas susceptibles (con niveles regulados de los Cit P450 como las larvas de la cruz E) que en cepas resistentes (con altos niveles de los Cit P450 como las larvas de la cruz BE) de *Drosophila*.

Lo anterior señala otro posible uso de las cruza de la prueba SMART en estudios del metabolismo xenobiótico: para Amichot *et al.* (1998) la disponibilidad de cepas mutantes resistentes de *Drosophila* (como la cruz de BE) permitirá estudios fundamentales del complejo enzimático Cit P450 en insectos; la familia *Cyp6* de *Drosophila* tiene fuertes homología regionales con las familias *Cyp2* y *Cyp3* que están involucradas en el metabolismo de drogas en los vertebrados (Danielson *et al.*, 1997, 1998), por ello, los estudios en este insecto ayudan a

comprender el metabolismo de mamíferos que tienen ciclos de vida largos y a los que no se puede exponer a compuestos químicos en número grande. Finalmente, Sancer *et al.* (1996) han comenzado a estudiar larvas de la cepa resistente Oregon-*flare* de *Drosophila melanogaster* utilizada en la prueba SMART para caracterizar la estructura genética, el patrón de expresión y la capacidad de activar procancerígenos del Cit P450-6A2.

### Pretratamientos con AcPb

Los pretratamientos con AcPb en las concentraciones empleadas (0,01, 0,1, 1,0 mM) arrojaron frecuencias no estadísticamente significativas en ambas cruza. Para E la concentración 1 mM había arrojado un resultado indeciso (i) en el programa estadístico SMART y finalmente negativo al realizar la prueba de U de Mann-Whitney.

Los datos sobre la acción genotóxica del plomo y sus sales, como el AcPb, son controvertidos (Hansen y Stern, 1984; Valverde *et al.*, 2001). Aunque sus efectos tóxicos se han estudiado por muchos años, los resultados sobre sus propiedades genotóxicas (mutagénicas, clastogénicas y cancerígenas) son inconsistentes. Los resultados positivos se encuentran a concentraciones altas y exposiciones prolongadas (Coni *et al.*, 1985; Rodríguez-Arnáiz *et al.*, 1986; Calabrese y Baldwin, 1992; Johnson, 1998; Aboul-Ela, 2002). Al respecto, Morrison y Ashby (1994) señalan la necesidad de considerar cuidadosamente la selección de la concentración y los niveles de exposición en los ensayos de genotoxicidad de corto plazo *in vivo* porque los investigadores no estudian adecuadamente la toxicidad de los compuestos químicos. En su opinión, los datos de genotoxicidad positiva generados sólo a niveles de dosis letal no tienen valor toxicológico.

Por otra parte, las diferencias específicas de las toxicidades de los iones, como el  $Pb^{2+}$ , han sido relacionadas por Stohs y Bagchi (1995) con la solubilidad de sus compuestos, su absorción, el transporte, la reactividad química y los complejos que forman *in vivo*. Por su parte, Graf (1995) ha demostrado que el mejor momento para la inducción de manchas por efecto de agentes genotóxicos en la prueba SMART es el tercer estadio larvario (72 h).

Con todo, un análisis de las frecuencias de manchas (Tablas 6 y 7) y las gráficas de tipos de mancha y tamaño de clon (Figs. 29 a, b-Figs. 34 a, b) para BE y E respectivamente permite observar que la cruz BE presenta frecuencias no estadísticamente significativas para las tres concentraciones empleadas y todos los tipos de manchas pero en la cruz E se observan frecuencias positivas con significancia estadística para las manchas pequeñas a las tres concentraciones estudiadas.

Estos resultados, remiten a la diferencia entre las cruza respecto a las concentraciones de los Cit P450. Aunque se requiere de las pruebas bioquímicas para comprobarlo, sugieren que este complejo metaboliza el AcPb, lo que concuerda con el efecto encontrado en las curvas de  $LC_{50}$  para el AcPb en las líneas Oregon-*flare* y *flare* por Castañeda *et al.* (2001) (Figs. 22 y 23).

Por tanto, la posible explicación es que la cruz BE con niveles altos del complejo Cit P450 elimina la sal y por eso las frecuencias para manchas pequeñas no son estadísticamente significativas. La cruz E tiene síntesis regulada de los Cit P450 y las frecuencias estadísticamente significativas para las tres concentraciones en manchas pequeñas se deben, de hecho, a un efecto genotóxico del AcPb antes de ser metabolizado por estas enzimas xenobióticas. Por tanto, el AcPb es un mutágeno directo con actividad clastogénica para la cruz E de la prueba SMART de *Drosophila* lo que concuerda con Beek y Obe, (1974); De la Rosa, (1984); Roy y Rossman, (1992) y Aboul-Ela, (2002) que también han encontrado este efecto en el AcPb. Así, aunque la frecuencia de manchas totales/ mosca arroja un valor no estadísticamente significativo para este tratamiento, no necesariamente indica ausencia de genotoxicidad.

Por último, el que bajas concentraciones de AcPb muestren genotóxicidad subraya lo dicho por Morrison y Ashby (1994) y Ames y Gold (1999) en el sentido de que es necesario escoger las dosis y los niveles de exposición en los ensayos de genotoxicidad de corto plazo *in vivo*. Trabajar con dosis subletales o tóxicas arroja datos fuera de la realidad. Los resultados de este tratamiento fueron generados dentro de un rango de concentraciones que permitió estudiar a la fracción normal, no susceptible o resistente, de la población cuya respuesta al AcPb es la que interesa conocer para alcanzar conclusiones con importancia toxicológica.

#### **Cotratamientos con AcPb+FB**

**Cruza BE:** los tres cotratamientos con AcPb (0.01, 0.1 y 1.0 mM) + FB (12 mM) presentaron frecuencias no estadísticamente significativas; tanto un compuesto como el otro no mostraron efecto genotóxico al administrarse por separado a larvas de 48 h de vida de la craza BE. El análisis de las frecuencias de manchas (Tabla 6) y las gráficas de tipos de manchas y tamaño de clon (Figs. 30 a, b) muestran el efecto nulo del cotratamiento en esta craza resistente.

Por otro lado, aunque se requieren pruebas bioquímicas, los resultados de este cotratamiento con la prueba SMART sugieren indirectamente que el AcPb a (0.01, 0.1 y 1.0 mM) no inhibe la síntesis del grupo hemo (Harada *et al.*, 1990 y Jover *et al.*, 1996) y por tanto tampoco la de los Cit P450 porque el FB es eficientemente eliminado por estos (Tredger y Stoll, 2002) y aparentemente el AcPb también, según los resultados del tratamiento con AcPb en las cruza de la prueba SMART. Aún más, la interrupción de la síntesis del grupo hemo que provoca el AcPb (Harada *et al.*, 1990; Jover *et al.*, 1996) puede ser revertida por el FB en cotratamiento según han comprobado Hjelle *et al.* (1982) y Nakawaga (1992).

**Cruza E:** el cotratamiento con AcPb (0.01 mM) + FB (12 mM) tuvo efecto genotóxico en contraste con los cotratamientos de AcPb (0.1 y 1.0 mM) + FB (12 mM) que no lo presentaron.

- Para el cotratamiento AcPb (0.01 mM) + FB (12 mM) la explicación a la actividad genotóxica observada es que la concentración de AcPb sumó su efecto genotóxico al del FB que también lo ejerció aquí como en pretratamiento solo. El análisis de las frecuencias de manchas (Tabla 7) y las gráficas de tipos de manchas y tamaño de clon (Figs. 35 a, b) para E muestran que en este cotratamiento hay una frecuencia de manchas pequeñas estadísticamente significativa en consistencia con los tratamiento de AcPb y FB administrados por separado (Figs. 33 a, b-Figs. 34 a, b) comprobándose que presentaron un efecto genotóxico clastogénico.
- En el cotratamiento AcPb (0.1 mM) + FB (12 mM) la frecuencia no es estadísticamente significativa, a pesar de que los pretratamientos de FB y AcPb por separado son genotóxicos en la craza. Aquí, la explicación posible es que a esta concentración el AcPb se anuló y/o inhibió con el FB y ambos compuestos no presentaron actividad genotóxica pues la frecuencia es casi la mitad de aquella del FB administrado por separado.
- En el cotratamiento con AcPb (1.0 mM) + FB (12 mM) la frecuencia tampoco es estadísticamente significativa. De manera consistente, se observa que al aumentar la concentración de AcPb se inhibe la acción genotóxica de ambos compuestos.

Shinohara *et al.* (1997) estudiaron el blanco específico al que se liga el FB para inducir la síntesis de los Cit P450 introduciendo grupos en la posición *para-* o *meta-* del anillo aromático. La ausencia de cualquiera de los sustituyentes en el anillo aromático del FB era necesaria para alcanzar la máxima actividad inductora y la sustitución en la posición *meta-* del anillo aromático tendía a reducir la efectividad como inductor más que la sustitución en la posición *para-*.

Sin embargo, tomando en cuenta que el cotratamiento de AcPb (0.01 mM) + FB (12 mM) es genotóxico, indicando que el FB no pierde su capacidad mutagénica, la explicación a la ausencia de actividad en cotratamiento con AcPb a concentraciones (0.1 mM y 1.0 mM) puede estar en la unión del plomo ( $Pb^{2+}$ ) del AcPb con los átomos de hidrógeno de los dos grupos  $NH$  en el anillo no benéfico del FB (Fig. 6), enlazando dos moléculas de FB por una de plomo ( $Pb^{2+}$ ) lo que genera un fenobarbitato plúmbico que se precipita (Com. Pers. Mtra. Irma Delfin); esto concuerda con Stohs y Bagchi, (1995) respecto a la reactividad química y los complejos que el plomo y sus sales forman *in vivo*.

Además de esto, si el FB conserva su efecto inductor, aumentan los niveles de los Cit P450 que metabolizan y eliminan más moléculas de FB y AcPb y por eso las frecuencias son negativas. En el cotratamiento con AcPb (0.01 mM) la concentración parece ser baja para precipitar el FB (12 mM) y por ello hay actividad genotóxica.

La formación de fenobarbitato plúmbico por precipitación también podría ser la razón por la que las frecuencias de manchas pequeñas en los tres tratamientos con AcPb administrado por separado ya no fueron estadísticamente significativas para las concentraciones (0.1 y 1 mM) en este cotratamiento (Tabla 7).

#### **Pretratamientos con AcPb y tratamiento con DMN**

**Cruza BE:** los pretratamientos con AcPb (0.01, 0.1 y 1.0 mM) y tratamiento con DMN (0.076 mM) arrojaron valores estadísticamente significativos muy parecidos a la frecuencia del tratamiento con DMN por separado. Las concentraciones de AcPb administradas por separado no mostraron actividad genotóxica para esta cruz resistente pues los Cit P450 parecen ser la vía de eliminación de esta sal (Tabla 6). El tratamiento AcPb/DMN con DMN como testigo en el programa SMART no resultó estadísticamente significativo (Tabla 8). Por tanto, este tratamiento experimental parece mostrar exclusivamente el efecto recombinogénico y clastogénico de la DMN como se observa en las gráficas de tipos de manchas y tamaño de clon (Figs. 31 a, b); además, sugiere indirectamente que el AcPb no interrumpió la síntesis del grupo hemo (en contraste a los resultados de Harada *et al.*, 1990 y Jover *et al.*, 1996) pues los Cit P450 activaron eficientemente al agente alquilante y también metabolizaron el AcPb.

**Cruza E:** los pretratamientos de AcPb (0.01, 0.1 y 1.0 mM) y tratamiento con DMN (0.076 mM) presentaron frecuencias estadísticamente significativas muy cercanas a la frecuencia del tratamiento con DMN por separado. Las tres concentraciones de AcPb administradas por separado (0.01, 0.1 y 1.0 mM) no presentaron frecuencias totales de manchas/ mosca estadísticamente significativas (Tabla 7) y los tres tratamientos AcPb/DMN para la prueba SMART con DMN como testigo no fueron estadísticamente significativos (Tabla 8), pero no debe olvidarse que el AcPb mostró un efecto genotóxico en E cuando se administró por separado (que no se refleja en la frecuencia de manchas pequeñas pero no en las totales/ mosca) y que tal vez se suma a las frecuencias de este tratamiento (Figs.36 a, b). Los resultados en esta cruz también sugieren indirectamente que no hubo interrupción del AcPb a la síntesis del grupo hemo pues hubo niveles suficientes de los Cit P450 para activar a la DMN.

Si bien es cierto que la prueba SMART es un ensayo genotóxico de gran sensibilidad que revela eventos genéticos responsables de la pérdida de heterocigosis en los genes marcadores utilizados y es uno de los tres únicos ensayos genotóxicos existentes que valora la capacidad recombinogénica de compuestos puros o mezclas *in vivo*, no es posible señalar cuál de ellos (mutación puntual, delección, no disyunción) es responsable de la pérdida de la condición de heterocigosis.

Sin embargo, la prueba SMART reveló datos que permiten sugerir indirectamente que el AcPb no interrumpe la síntesis de grupo hemo, como se observa en los tratamientos experimentales (AcPb/ DMN) y (AcPb+FB/ DMN).

Bioquímicamente hablando, está comprobado que esta sal orgánica del plomo interrumpe la síntesis del grupo hemo (Harada *et al.*, 1990; Jover *et al.*, 1996), el cual es necesario, entre otras cosas, para la síntesis de los Cit P450 (Beri y Chandra, 1993; Ponka, 1997). El AcPb no tuvo efecto genotóxico en la craza BE y sí en la craza E de la prueba SMART a las concentraciones usadas en este trabajo pero las consecuencias biológicas de que el AcPb no inhiba la síntesis del grupo hemo en ninguna de ellas revela la complejidad de la regulación de estas importantes moléculas. En primer lugar significa que hay síntesis de los Cit P450 para metabolizar compuestos endógenos como esteroides, ácidos grasos, aminos biogénicas, prostaglandinas y vitaminas, así como xenobióticos tales como metabolitos de la dieta, drogas, pesticidas o contaminantes ambientales (González *et al.*, 1991), metabolitos de plantas y cancerígenos (Gandhi *et al.*, 1992), además de conferir resistencia a insecticidas (Cariño *et al.*, 1993). Por otra parte, la hormona de la pupación (ecdisona) sintetizada por las glándulas protorácicas y liberada a la hemolinfa es convertida a su forma activa, 20-hidroxiecdisona, mediante una hidroxilasa dependiente de Cit P450 en la grasa corporal, el midgut y enocitos de la epidermis de *Drosophila* (Blum, 1985). Experimentos con discos imagales de *Drosophila* en cultivo expuestos a 20-hidroxiecdisona demuestran que ( $10^{-4}$  -  $10^{-6}$  M) por 12-24 h son las concentraciones y tiempos efectivos para observar la capacidad de respuesta (*competencia*) de las células imagales pues mientras progresa el último estadio larvario, los discos del ala responden más al estímulo de la hormona para pupar y sufrir metamorfosis (Blum, 1985).

#### Cotratamientos con AcPb+FB y tratamiento con DMN

El cotratamiento de AcPb (0.01, 0.1 y 1.0 mM) + FB (12 mM) más tratamiento con DMN (0.076) fue genotóxico para ambas cruza de la prueba SMART. Para explicar estos datos se hace necesario analizar cada compuesto por separado y finalmente en conjunto.

#### Cruza BE

- El agente alquilante clastogénico DMN fue genotóxico para BE incluso en una frecuencia más alta que la de E por los altos niveles constitutivos de los Cit P450 que lo activan.
- El FB no tuvo efecto genotóxico porque es eliminado eficientemente por los altos niveles de los Cit P450 que lo metabolizan.
- El pretratamiento de AcPb (0.01, 0.1 y 1.0 mM) no presentó actividad genotóxica a ninguna concentración porque la sal es aparentemente eliminada via los Cit P450.

- El pretratamiento de FB con tratamiento de DMN fue genotóxico pero el efecto se debe sólo al agente alquilante activado por los Cit P450 (Tabla 8); el FB no induce más síntesis de estas enzimas en cepas resistentes como la BE y además es metabolizado por estos mediante hidroxilación.
- El cotratamiento AcPb (0.01, 0.1 y 1.0 mM) + FB no fue genotóxico a ninguna de las concentraciones. Esto es congruente con las frecuencias no estadísticamente significativas al administrar los compuestos por separado. Este tratamiento sugiere indirectamente que el AcPb no interrumpe la síntesis del grupo hemo ni la de los Cit P450 que eliminan eficientemente el FB y aparentemente también el AcPb.
- El pretratamiento de AcPb (0.01, 0.1 y 1.0 mM) con tratamiento de DMN fue genotóxico. El efecto se debe sólo a la DMN (Tabla 8). Lo anterior sugiere que no hubo inhibición del AcPb a en ninguna de las concentraciones usadas a la síntesis del grupo hemo de los Cit P450 porque la DMN fue activada y por tanto, siempre que se administran tratamientos con DMN (sola o combinada) la actividad genotóxica se presenta. Por otra parte, la evidencia sugiere que el AcPb es metabolizado y eliminado vía los Cit P450 y por ello no sumo su efecto genotóxico.
- El pretratamiento AcPb (0.01, 0.1 y 1.0 mM) + FB con tratamiento de DMN fue genotóxico a todas las concentraciones pero el efecto se debe sólo al agente alquilante DMN (Tabla 8) porque el FB, y posiblemente también el AcPb, son eliminados por los altos niveles de Cit P450 de la cruz. Por otra parte, este tratamiento experimental sugiere que el AcPb no inhibe el grupo hemo, ni la de los Cit P450 pues la DMN es activada.

#### **Cruza E**

- El tratamiento con DMN fue genotóxico para E pero con una frecuencia menor a la de BE porque sus niveles regulados de Cit P450 no activan tantas moléculas de esta nitrosamina.
- El FB fue genotóxico porque aunque induce la síntesis del sistema Cit P450 en esta cruz susceptible y este lo metaboliza, tiene efecto genotóxico clastogénico en tanto aumenta la concentración de los Cit P450 para metabolizarlo y eliminarlo.
- El pretratamiento de AcPb (0.01, 0.1 y 1.0 mM) generó frecuencias totales no estadísticamente significativas Sin embargo, las frecuencias de manchas pequeñas revelan un efecto genotóxico consistente tipo clastogénico. Esta sal es probablemente metabolizada por los Cit P450; mientras son sintetizados, el AcPb daña el ADN.
- El pretratamiento de FB con tratamiento de DMN fue genotóxico con efecto sinérgico (Tabla 8). El FB tiene efecto genotóxico clastogénico, induce la síntesis de los Cit P450 que activan las moléculas de DMN y es finalmente metabolizado y eliminado por estos.
- El cotratamiento AcPb (0.01, 0.1 y 1.0 mM) + FB presentó actividad genotóxica a la concentración más baja pero no a las dos mayores. Por un lado, el resultado estadísticamente significativo del tratamiento a la concentración menor sugiere indirectamente que el AcPb no interrumpe la síntesis del grupo hemo ni la de los Cit P450 inducidos por el FB que también

resulta metabolizado por estos. Por otra parte, el tratamiento a las concentraciones mayores revela que el AcPb y el FB tienen una interacción química a partir de ciertas proporciones milimolares, que lleva a la formación de un complejo de fenobarbitato plúmbico que se precipita y por ello no se observa efecto genotóxico de los compuestos.

- El pretratamiento de AcPb (0.01, 0.1 y 1.0 mM) con tratamiento de DMN fue genotóxico. El efecto se debe en mayor proporción a la DMN (Tabla 8) pero la sal suma su efecto clastogénico. Los resultados sugieren que no hubo inhibición del AcPb en ninguna de las concentraciones usadas a la síntesis del grupo hemo de los Cit P450 porque la DMN fue activada y por tanto, siempre que se administran tratamientos con DMN (sola o combinada) el efecto genotóxico se observa.
  - El pretratamiento AcPb (0.01, 0.1 y 1.0 mM) + FB con tratamiento de DMN fue genotóxico a todas las concentraciones.
- a) Para el caso de la concentración (0.01 mM) de AcPb las frecuencias estadísticamente significativas se deben al efecto sinérgico entre el FB y la DMN (Tabla 8). El primero induce la síntesis de los Cit P450 que a su vez activan la nitrosamina. El FB también suma su actividad genotóxica porque el AcPb no se precipita con él a esta concentración y la sal también actúa como agente clastogénico. Eso explica la frecuencia observada (8.0) para este tratamiento específico (Tabla 7).
  - b) Para las concentraciones (0.1 y 1.0 mM) los resultados se deben a la acción de la DMN que fue activada por los Cit P450 que el FB pudo inducir. Sin embargo, tanto el FB como el AcPb ya no tuvieron efecto genotóxico porque se anularon precipitándose, y por eso las frecuencias son casi la mitad de la concentración más baja.

## 17. CONCLUSIONES

1. La DMN (0.076 mM) es genotóxica. Su efecto es mayor en la craza BE porque tiene niveles constitutivos de los Cit P450, que la activan, y menor en E por los niveles regulados de este sistema en la craza; lo anterior muestra las consecuencias del polimorfismo enzimático y el doble papel (eliminación/ activación) del metabolismo xenobiótico, en *Drosophila melanogaster*.

2. El FB (12 mM) es genotóxico. En la craza BE no induce más la síntesis del sistema Cit P450 pues ya hay niveles constitutivos del complejo y no presenta actividad porque es eliminado por éste. En la craza E, el FB induce la síntesis de los Cit P450 y también tiene efecto genotóxico tipo clastogénico. Por las razones anteriores, el tratamiento con FB/DMN no es sinérgico en BE y sí en E.

Las cruzas de la prueba SMART de *Drosophila melanogaster* son excelentes modelos para estudiar el metabolismo xenobiótico y los inductores de enzimas de Fase I como los Cit P450.

3. El AcPb (0.01, 0.1 y 1.0 mM) es genotóxico. Las frecuencias totales de manchas/ mosca no reflejan efecto genotóxico en ambas cruzas pero las frecuencias de manchas pequeñas señalan un efecto clastogénico en la craza E; en BE no son estadísticamente significativas. Es probable que la vía de eliminación de la sal sea el sistema Cit P450. Lo anterior explica la frecuencia del tratamiento AcPb+FB/ DMN en la craza E a la concentración más baja de AcPb.

4. El AcPb y el FB revelaron una interacción química, notoria en la craza E pero no en BE, inhibiéndose y/ o anulándose (excepto en la concentración más baja) según aumenta el AcPb.

5. Los resultados obtenidos para los tratamientos de AcPb (0.01, 0.1, 1.0 mM) sugieren indirectamente que la sal no inhibe la síntesis del grupo hemo ni la de los Cit P450, lo que se observa por la activación del promutágeno DMN en todos los tratamientos AcPb/DMN y AcPb+FB/DMN.

## 18. BIBLIOGRAFÍA

- Aboul-Ela, E.I. (2002). The protective effect of calcium against genotoxicity of lead acetate administration on bone marrow and spermatocyte cells of mice in vivo. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. **516**, 1-9.
- Adams, M.D., Celniker, S.E. y Holt, R.A. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. **287**, 2185-2195.
- Akins, J.M., Schroeder, J.A., Brower, D. L. y Aphosian, H. V. (1992). Evaluation of *Drosophila melanogaster* as an alternative animal for studying the neurotoxicity of heavy metals. *Biometals*. **5**, 111-120.
- Alvares, A., Leigh, S., Cohn, J. y Kappas, A. (1972). Lead and methyl mercury: effects of acute exposure on cytochrome P450 and the mixed function oxidase system in the liver. *The Journal of Experimental Medicine*. **135**, 1406-1409.
- Amacher, D. E. y Paillet, S.C. (1982). Induction of trifluorothymidine-resistant mutants by metal ions in L5178/TK +- cells. *Mutat. Bires.* **78**, 279-299.
- Ames, B. N. y Gold, L. S. (1999). Contaminación, cáncer y alimentación. *Mundo Científico*. **207**, 30-37. Diciembre.
- Amichot, M., Brun, A., Cuany, A., De Souza, G., Le Mouél, T., Bride, J.M., Babault, M., Salaün, J. P., Rahmani, R. y Bergé, B. (1998). Induction of cytochrome P450 activities in *Drosophila melanogaster* strains susceptible or resistant to insecticides. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **121**, 311-319.
- Andersen, J.F., Utermohlen, J.G y Feyereisen, R. (1993). Expression of house fly CYP6A1 and NADPH cytochrome P450 reductase in *Escherichia coli* and reconstitution of an insecticide metabolizing P450 system. *Dep. Entomology and Center for Insect Science*. **24**, 411-428.
- Baader, M., Gnerre, C., Stegeman, J.J. y Meyer, U.A. (2002). Transcriptional activation of cytochrome P450 CYP2C45 by drugs is mediated by the chicken xenobiotic receptor (CXR) interacting with Phenobarbital response enhancer unit. (2002). *J. Biol. Chem.*, **277**, 15647-15653.
- Baars, A. J., Blijleven, W. G., Mohn, G. R., Natarajan, A. T. y Breimer, D. D. (1980). Preliminary studies on the ability of *Drosophila* microsomal preparations to activate mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.*, **72**, 257-264.
- Bauchinger, M., Schmid, E., Einbro, H.J. y Dresp, J. (1976). Chromosome aberrations in lymphocytes after occupational exposure to lead and cadmium. *Mutat. Res.*, **40**, 57-62.
- Bauchinger, M., Dresp, J., Schmidt, E., Englert, N. y Krause, Chr. (1977). Chromosome analyses of children after ecological lead exposure. *Mutat. Res.*, **56**, 75-80.

- Beck, B. (1992). An Update on exposure and effects of lead. *Fundamental and Applied Toxicology*. **18**, 1-16.
- Becker, W., Kleinsmith, L. y Hardin, J. (2000). The world of the cell. 4<sup>th</sup>. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company. USA. Pp: 878.
- Beckman, H. (1984). Farmacología terapéutica clínica. ED. Interamericana, México. pp 78-86.
- Beck, B. y Obe, G. (1974). Effect of lead acetate on human leukocyte chromosomes *in vivo*. *Experientia*. **30**, 1006-1007.
- Bellinger, D., Leviton, A., Rabinowitz, M., Alfred, E., Needleman, H. y Schoenbaum, S. (1991). Weight gain and maturity in fetuses to low levels of lead. *Environ. Res.*, **54**, 151-158.
- Beri, R. y Chandra, R. (1993). Chemistry and biology of heme. *Drug Metab. Rev.*, **25**, 49-152.
- Bernards, A. y Hariharan, I. K. (2001). Of flies and men-studying human disease in *Drosophila*. *Current Opinion in Genetics & Development*. **11**, 274-278.
- Bishop, J.M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell*. **64**, 235-248.
- Blum, M. S. ed. (1985). Fundamentals of insect physiology. Wiley-Interscience Publications. ED. John Wiley & Sons. New York, USA. Pp: 595.
- Boucher, J.L., Delaforge, M., Salaun, J. P., Pinot, F., Durst, F., Pflieger, P. y Mioskowski, C. (1996). *In vitro* hydroxylation and epoxidation of some isomeric lauric acid analogs by rat liver microsomes. Identification of metabolites and effects of clofibrates or phenobarbital pretreatment. *Drug Metabolism and Disposition*. **24**, 462-468.
- Brown, S.E.S., Guzelian, C.P., Schuetz, E., Quattrochi, L.C., Kleinman, H.K. y Guzelian, P. S. (1995). Critical role of extracellular matrix on induction by phenobarbital of cytochrome P450 2B1/2 in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Laboratory investigation*. **73**, 818-827.
- Burger, J. Effects of lead on sibling recognition in young herring gulls. (1998). *Toxicological Sciences*. **43**, 155-160.
- Burke, J. D. (1971). Biología celular. Nueva editorial Interamericana, S. A. de C.V. 1ª ed. pp:298.
- Bursell, E. (1974). Introducción a la fisiología de los insectos. ED. Alhambra, España. 1ª ed. pp: 350.
- Cable, E. E., Gildemeister, O. S., Pepe, J. A., Donohue, S. E., Lambrecht, R. W. y Bomkovsky, H. L. (1996). Hepatic 5-aminolevulinic acid synthase mRNA stability is modulated by inhibitors of heme biosynthesis and by metalloporphyrins. *European Journal of Biochemistry*. **240**, 112-117.
- Calabrese, E.J. y Baldwin, L.A. (1992). Lead-induced cell proliferation and organ-specific tumorigenicity. *Drug. Metab. Rev.*, **24**, 409-416.

Calderón-Segura, M. E., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R. y Espinosa-Ramírez, M. (1998). In vivo and in vitro promutagen activation by *Vicia faba* of thiocarbamate herbicides molinate and butylate to products inducing sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. *Mut. Res.*, **438**, 81-88.

Carriño, F.A., Koener, J.F., Plapp, F.W. y Feyereisen, R. (1992). Expression of cytochrome P450 gene CYP6A1 in the house fly, *Musca domestica*. *American Chemical Society*. 30-40.

Castañeda, P.L., Muñoz, G.L.E., Durán, D.A., Heres, P.M.E. y Dueñas, G.I.E. (2001). LD<sub>50</sub> in *Drosophila melanogaster* fed on lead nitrate and lead acetate. *Drosoph. Inf. Serv.*, **84**, 44-47.

Clark, A. M. (1982). The use of larval stages of *Drosophila* in screening for some naturally occurring mutagens. *Mutat. Res.*, **2**, 89-97.

Coni, P., Pichiri-Coni, G., Gurto, M., Simbula, G., Giacomini, L., Sarma, D.S., Ledda-Cooper, W.C., Wong, O. y Kheifets, L. (1985). Mortality among employees of lead battery plants and lead producing plants, 1947-1980. *Scand. J. Work. Environ. Health.*, **11**, 331-345.

Coreos, L. (1992). Phenobarbital and dexamethasone induce expresión of cytochrome P450 genes from subfamilies IIB, IIC, and IIIA in mouse liver. *Drug Metabolism and Disposition*. **20**, 797-801.

Corey, G. y Galvao, L.A. (1989). Plomo. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. O. M. S., Metepec, Edo. de México. pp103.

Danielson, P. B., MacIntyre, R. J. y Fogleman, J. C. (1997). Molecular cloning of a family of xenobiotic-inducible drosophilid cytochrome p450s: evidence for involvement in host-plant allelochemical resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **94**, 10797-10802.

Danielson, P. B., Fister, J. L., McMahonill, M. M., Smith, M. K. y Fogleman, J. C. (1998). Induction by alkaloids and Phenobarbital of Family 4 cytochrome P450s in *Drosophila*: evidence for involvement in host plant utilization. *Molecular & General Genetics*. **259**, 54-59.

Dees, J.H., Yasukochi, Y., Okita, R.T., Parkhill, L.K., Coe, L.D., Key, B.A., Patrizi, V.W. y Masters, B.S.S. (1980). Immunohistochemical localization of NADPH- dependent cytochrome c (P450) reductase in liver, lung and kidney of phenobarbital- versus saline-pretreated rats: correlation with ultrastructural and biochemical observations. En: Coon, M.J. Microsomes, drug oxidations and chemical carcinogenesis. Academic Press. Inc. New York. Vol I y II.

Degawa, M., Arai, H., Miura, S. y Hashimoto, Y. (1993). Preferential inhibitions of hepatic P450Ia2 expression and induction by lead nitrate in the rat. *Carcinogenesis*. **14**, 1091-1094.

Delgado, R.A., y Graf, U. (1994). Latinamerican workshop on genetic toxicology. I. *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, **312**, 193-194.

Delgado, R.A., Villalobos-Pietrini, R., Gómez-Arroyo, S. y Graf, U. (1995). Genotoxic effect of environmental important polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro derivates in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, **341**, 235-247.

De la Rosa, M.E. (1984). Efecto de los metales pesados en las células germinales de *D. melanogaster* (Cd, Cr, Pb y Zn). Tesis doctoral. Facultad de Ciencias, UNAM.

De Matteis, F. Y Marks, G. C. (1996). Cytochrome P450 and its interactions with the heme biosynthetic pathway. *Can J Physiol Pharmacol.*, **74**, 1-8.

Demerec, M. (1965). *Biology of Drosophila*. Hafner Pub. Co. USA, pp.633.

DePierre, J. W. y Ernster, L. (1980). Topology of drug-metabolizing enzymes in the membrane of the endoplasmic reticulum. En: Coon, M.J. *et al.* Microsomes, drug oxidations and chemical carcinogenesis. Academic Press, Inc. New York. Vol I y II.

Deutsch, W. A., Kukreja, A., Shane, B. y Hegde, V. (2001). Phenobarbital, oxazepam and Wyeth 14,643 cause DNA damage as measured by the Comet assay. *Mutagenesis.* **6**, 439-442.

Díaz Zagoya, J. C. y Hicks, J. J. (1988). *Bioquímica e Inmunología*. Vol I. 1ª. Ed. Facultad de Medicina, UNAM. pp: 793.

Diez-Fernandez, C., Sanz, N., Alvarez, A. M., Wolf, A. y Cascales, M. (1998). The effect of non-genotoxic carcinogens, phenobarbital and clofibrate, on the relationship between reactive oxygen species, antioxidant enzyme expression and apoptosis. *Carcinogenesis.* **19**, 1715-1722.

Dombrowski, S. M., Krishnan, R., Witte, M., Maitra, S., Diesing, C., Waters, L. C. y Ganguly, R. (1998). Constitutive and barbital-induced expression of the *Cyp6a2* allele of a high producer strain of CYP6A2 in the genetic background of a low strain. *Gene.* **221**, 69-77.

Donato, M. T., Viitala, P., Rodríguez-Antona, C., Lindfors, A., Catell, J. V., Raunio, H., Gómez-Lechón, M. J. y Pelkonen, O. (2000). CYP2A5/CYP2A6 expression in mouse and human hepatocytes treated with various *in vivo* inducers. *Drug metabolism and Disposition.* **28**, 1321-1326.

Draper, A. J. y Hammock, B. D. (1999). Inhibition of soluble and microsomal epoxide hydrolase by zinc and other metals. *Toxicological Sciences.* **52**, 26-32.

Dueñas, I.E., Heres, M.E., Castañeda, P.L., y Graf U. (2001). Easy rising of *Drosophila melanogaster* consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. *Technique note. Drosoph. Inf. Serv.*, **84**, 166.

Dueñas-García, I. E. (2002). Efecto mutagénico y recombinogénico de la p-fenilendiamina y la o-fenilendiamina, mediante la prueba de mutación somática en alas de *Drosophila melanogaster* cruza E y AB. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. pp 79.

- Dunkov, B. C., Rodríguez-Araiz, R., Pittendrigh, B., Ffrench-Constant, R. H. Y Feyereisen, R. (1996). Cytochrome P450 gene clusters in *Drosophila melanogaster*. *Molecular & General Genetics*. **251**, 290-297.
- Dunkov, B. C., Guзов, V. M., Mocelin, G., Shotkoski, F., Brun, A., Amichot, M., Ffrench-Constant, R. H., Feyereisen, R. (1997). The *Drosophila* cytochrome P450 gene Cyp6a2: structure, localization, heterologous expression, and induction by Phenobarbital. *DNA and Cell Biology*. **16**, 1345-1356.
- El-Masri, H. A. Y Portier, C. J. (1998). Physiologically based pharmacokinetics model of primidone and its metabolites phenobarbital and phenylethylmalonamide in humans, rats, and mice. *Drug Metabolism and Disposition*. **26**, 585-594.
- Engler, P. y Strob. U. (1988). Immunoglobulin gene rearrangement. In Kucherlapati, R. ad Smith, G.R. (eds) *Genetic Recombination*. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp.667-700.
- Ferm, V.H. (1969). The syneratogenic effect of lead and cadmium. *Experientia*. **25**, 56-57.
- Fernández, M., Gauthier, L. y Jaylet, A. (1989). Use of newt larvae for in vivo genotoxicity testing of water: results on 19 compounds evaluated by the micronucleus test. *Mutagenesis*. **4**, 17-26.
- Ferrante, E.D. (1979). Trace metals: exposure and health effects. Commission of the European Communities. Pergamon Press, Luxembourg, pp 158-161.
- Finnberg, N., Stenius, U. y Högberg, J. (2000). Xenobiotics modulate the p53 response to DNA damage in preneoplastic enzyme-altered foci in rat liver; effects of diethylnitrosamine and Phenobarbital. *Toxicological Sciences*. **54**, 95-103.
- Flagg, R.O. (1988). Carolina *Drosophila* Manual. Carolina Biological Supply Company. Burlington, NC/Gladstone, OR. USA.
- Fontaine, S. M., Hoyer, P. B., Halpert, J. R. y Sipes, I. G. (2001). Role of induction of specific hepatic cytochrome P450 isoforms in epoxidation of 4-vinylcyclohexene. *Drug Metabolism and Disposition*. **29**, 1236-1242.
- Foye, W. O. (1991). Principios de química farmacéutica. ED. Reverté, S.A. Barcelona, España. pp 95-133.
- Fracasso, M. E., Perbellini, L., Soldá, S., Talamini, G. y Franceschetti, P. (2002). Lead induced DNA strand breaks in lymphocytes of exposed workers: role of reactive oxygen species and protein kinase C. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. **51S**, 159-169.
- Frank, M.R., y Fogleman, J.C. (1992). Involvement of cytochrome P450 in host-plant utilization by Sonoran desert *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**, 11998-12002.

Frei, H. (1994). Análisis estadístico de datos provenientes de las pruebas de mutación y recombinación somáticas (SMART). *Rev. Int. Contam. Amb.*, **10**, 9-14.

Frei, H. y Würigler, F.E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.*, **203**, 297-308.

Frei, H. y Würigler, F.E. (1995). Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutat. Res.*, **334**, 247-258.

Frei, H., Graf, U. y Würigler, F. E. (1998). Induced loss of heterozygosity in somatic cells of *Drosophila melanogaster* is a sensitive indicator of genotoxicity. *Toxicology Letters*. **95**, 43.

Frei, H., Lüthy, J., Brauchli, J., Zweifel, U., Würigler, F.E. y Schlatter, Ch. (1992). Structure/activity relationships of the genotoxic potencies of sixteen pyrrolizidine alkaloids assayed for the induction of somatic mutation and recombination in wing cells of *Drosophila melanogaster*. *Chem.- Biol. Interactions*. **83**, 1-22.

Frenkel, G.D. y Middleton, Ch. (1987). Effects of lead acetate on DNA and RNA synthesis by intact HeLa cells, isolated nuclei and purified polymerases. *Biochemical Pharmacology*. **36**, 265-268.

Frölich, A. y Würigler, F.E. (1989). New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing spot. *Mutat. Res.*, **216**, 179-187.

Fuchs, S.Y., Spiegelman, V.S. y Belitsky, G.A. (1993). The effect of the cytochrome P450 system inducers on the development of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biochemical Toxicology*. **8**, 83-88.

Fuchs, S.Y., Spiegelman, V.S. y Belitsky, G.A. (1994). Inducibility of various cytochrome P450 isozymes by phenobarbital and some other xenobiotics in *Drosophila melanogaster*. *Biochemical Pharmacology*. **47**, 1867-1873.

Fuentes-Aguilar, L. y Soto-Mora, C. (1993). Influence of lead on pregnant women in metropolitan Mexico City. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **50**, 533-539.

García-Arenas, G., Claudio, L., Perez-Severiano, F. y Rios, C. (1999). Lead acetate exposure inhibits nitric oxide synthase activity in capillary and synaptosomal fractions of mouse brain. *Toxicological Sciences*. **50**, 244-248.

Gandhi, R. Varak, E. y Goldberg, M.L. (1992). Molecular analysis of a cytochrome P450 gene of family 4 on the *Drosophila* X chromosome. *ADN and Cell Biology*. **11**, 397-404.

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

García-Bellido, A. y Dapena, J. (1974). Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen.*, **128**, 117-130.

Gerber, G.B., Leonard, A. y Jacquet, P. (1980). Toxicity, mutagenicity and teratogenicity of lead. *Mutat. Res.*, **76**, 115-141.

Glende, C., Klein, M., Schmitt H., Erdinger L y Boche, G. (2002). Transformation of mutagenic aromatic amines into non-mutagenic species by alkyl substituents. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. **515**, 15-38.

Goldberg, A., Meredith, P.A., Miller, S., Moore, M.R. y Thompson, G.G. (1977). Haem biosynthesis and hepatic drug metabolism in lead poisoned rats. Proceedings of the B.P.S. 13th-15th July, 1977.

Gómez- Arroyo, S. y Villalobos-Pietrini, R. (1995). Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in *Vicia faba* as genetic monitors of environmental pollutants. Biomarkers and Biomarkers as indicators of Environmental Change, Edited by F. M. Butterworth et al. Plenum Press, New York, 1995. Pp: 95-113.

Gómez-Arroyo, S., Calderón-Segura, M. E. Y Villalobos-Pietrini, R. (1995). Sister chromatid exchange in human lymphocytes induced by propoxur following plant activation by *Vicia faba*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **26**, 324-330.

Gomez, M.I., Swann, P.F. y Magee, P.N. (1977). The absorption and metabolism in rats of small oral doses of dimethylnitrosamine. Implication of the possible hazard of dimethylnitrosamine in human food. *Biochem. J.* **164**, 497-500.

Gonzalez, F., Crespi, Ch., y Gelboin, H. (1991). cADN-expressed human cytochrome P450's: a new age of molecular toxicology and human risk assessment. *Mutat. Res.*, **247**, 113-127.

Gonzalez, F. J y Gelboin, H. V. (1992). Human cytochromes P450: Evolution and cDNA-directed expression. *Ann. Rev. Biochem.*, **98**, 81-85.

Gonzalez, F. J. y Kimura, S. (2001). Understanding the role of xenobiotic-metabolism in chemical carcinogenesis using gene knockout mice. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. **477**, 79-87.

Goto, Y., Matsuda, T., Ito, K., Huh, N.H., Thomale, J., Rajewsky, M.F., Hayatsu, H. y Negishi, T. (1999). Mutagenicities of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in *Drosophila* and their relationship to the levels of O-alkyl adducts in DNA. *Mutat. Res.*, **425**, 125-134.

Goyer, R.A. (1990). Lead toxicity: from over to subclinical to subtle health effects. *Environ. Health. Perspect.*, **86**, 177-181.

Graf, U. (1986). Temperature effect on *mwh* expression in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Drosoph. Inf. Serv.*, **63**, 65.

- Graf, U. (1995). Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Experientia*. **51**, 168-173.
- Graf, U. y Singer, D. (1992). Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, **8**, 15-27.
- Graf, U. y van Schaik, N. (1992). Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, **271**, 59-67.
- Graf, U., Würigler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B. y Kale, P.G. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutag.*, **6**, 153-188.
- Graf, U., Delgado-Rodríguez, A., Villalobos-Pietrini., R. y Gomez-Arroyo, S. (1994). Taller Latinoamericano de Genética Toxicológica I. *Drosophila melanogaster*. Informe de la Reunión. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, **10**, 1-4.
- Graf, U., Spanó, M.A., Guzmán-Rincón, 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. Manuscript for the African Newsletter on Occupational Health and Safety.
- Graf, U., Abraham, S. K., Guzmán-Rincón, J. y Würigler, F. E. (1998). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. **402**, 203-209.
- Guzman-Rincón, J. y Graf, U. (1995). *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. En Butterworth, F.M., Corkum, L.D. y Guzman-Rincon, J. (eds). *Biomonitor and biomarkers as indicators of Environmental Change: A handbook*. Plenum Press, New York, NY, pp.169-181.
- Guzmán-Rincón, J., Ramírez-Victoria, P., y Benítez, L. (2001). Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster* used for biomonitoring of Environmental Pollutants. In Butterworth, F.M, Gonatiflaka, A. y Gonsebatt, M.E. (eds). *Biomonitor and biomarkers as indicators of environmental change. A handbook. Vol 2*. Kluwer Academic / Plenum Press Publishers. New York, NY. Pp: 221-237.
- Hakura, A., Suzuki, S. y Satoh, T. (1999). Advantage of the use of human liver S9 in the Ames test. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. **438**, 29-36.
- Hällström, I., Magnusson, J. y Ramel, C. (1982). Relation between the somatic toxicity of dimethylnitrosamine and a genetically determined variation in the level and induction of the cytochrome P450 in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, **92**, 161-168.
- Hällström, I., Blanck, A. y Atuma, S. (1983). Comparison of cytochrome P450-dependent metabolism in different developmental stages of *Drosophila melanogaster*. *Chemico-Biological Interactions*. **46**, 39-54.

Hällström, I., Blanck, A. y Atuma, S. (1984). Genetic variation in cytochrome P450 and xenobiotic metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Biochemical Pharmacology*. **33**,13-20.

Halpert, J. R. y Neal, R.A. (1980). Mechanism of the inactivation of rat liver cytochrome P450 by parathion. . En Coon, M. J. *Microsomes, drug oxidations and chemical carcinogenesis*. Academic Press, Inc. New York. Vol I.

Halpert, J. R. (1995). Structural basis of selective cytochrome P450 inhibition. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. **35**, 29-53.

Hamadeh, H. H., Bushel, P. R., Jayadev, S., Martin, K., DiSorbo O., Sieber, S., Bennett, L., Tennant, R., Stoll, R., Barrett, J. C., Blanchard, K., Paules, R. S. y Afshari, C. (2002 a). Gene expression analysis reveals chemical-specific profiles. *Toxicological Sciences*. **67**, 219-231.

Hamadeh, H. H., Bushel, P. R., Jayadev, S., DiSorbo O., Sieber, S., Bennett, L., Li, L., Tennant, R., Stoll, R., Barrett, J. C., Blanchard, K., Paules, R. S. y Afshari, C. (2002 b). Prediction of compound signature using high density gene expression profiling. *Toxicological Sciences*. **67**, 232-240.

Handschin, Ch., Podvinec, M., Stockli, J., Hoffmann, K. y Meyer, U. A. (2001). Conservation of signaling pathways of xenobiotic-sensing orphan nuclear receptors, chicken xenobiotic receptor, constitutive androstane receptor and pregnane C receptor, from birds to humans. *Molecular Endocrinology*. **15**, 1571-1585.

Hansen, K. y Stern, R.M. (1984). A survey of metal-induced mutagenicity *in vitro* and *in vivo*. *J. Am. College Toxicol.*, **3**, 381-430.

Happle, R. (1999). Loss of heterozygosity in the human skin. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **41**, 143-161.

Harada, K., Ohmori, S., Nagano, M y Miura, H. (1990). Effects of lead on drug metabolizing enzymes, cytochrome P450 and hemoxygenase in rats. *Sangyo Igaku*. **32**, 33-40.

Hartwig , A. (1995). Current aspects in metal genotoxicity. *Biometals*. **8**, 3-11.

Haugen, D. A. (1981). Biphenyl metabolism by rat liver microsomes: regioselective effects of inducers, inhibitors and solvents. *Drug Metabolism and Disposition*. **9**, 212-218.

Hemminki K. (1997). DNA adducts studies in human populations. *Mutat. Res.* **379**, S159.

Heres-Pulido, M.E. (2001). Efecto de los nitratos de plomo y de calcio sobre la acción mutagénica y recombinogénica del metilmetanosulfonato en *Drosophila melanogaster*. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. pp 174.

Hernández-Avila, M., Romieu, Y., Rios, C., Rivero, A. y Palazuolos, E. (1991). Lead-glazed ceramics as major determinants of blood lead levels in mexican women. *Environ. Health. Perspect.*, **94**, 117-120.

- Hjelle, J. J., Poklis, A. y Fisher, V. W. (1982). The effect of inorganic lead on hepatic biochemical and ultrastructural changes produced by phenobarbital. *Toxicological Letters*. **10**, 101-108.
- Hobbs, A. A., Mattschoss, L. A., May, B. K., Williams, K. E. y Elliott, W. H. (1986). The cDNA and protein sequence of a phenobarbital-induced chicken cytochrome P450. *J. Biol. Chem.*, **261**, 9444-9449.
- Hooker, A.M., Home R., Moreley, A.A y Sykes P.J. (2002). Dose-dependent increase or decrease of somatic intrachromosomal recombination produced by etoposide. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. **500**, 117-124.
- Horn, T.L., O'Brien, T., Schook, L.B. y Rutherford, M.S. (2000 a). Acute hepatotoxicant exposure induces TNFR-mediated hepatic injury and cytokine/apoptotic gene expression. *Toxicological Sciences*. **54**, 262-273.
- Horn, T.L., Bhattacharjee, A., Schook, L.B. y Rutherford, M.S. (2000 b). Altered hepatic mRNA expression of apoptotic genes during dimethylnitrosamine exposure. *Toxicological Sciences*. **57**, 240-249.
- IARC. Seven<sup>th</sup> Annual report on carcinogens. (1994). National Toxicology Program. National Institute of Environmental Health Sciences. Research Triangle Park, NC.
- Ishibe, T., Nihira, H., Hirahara, S. y Otomaru, Y. (1970). Enzyme studies of the kidney and serum of rats during carcinogenesis by lead acetate and dimethylnitrosamine. *Invest. Urol.*, **8**, 66-77.
- Jacquet, P., Leonard, A. y Gerber, G. B. (1977). Cytogenetic investigations on mice treated with lead. *J. Toxicol. Environ. Health.*, **2**, 619-624.
- Johnson, F.M. (1998). The genetic effect of environmental lead. *Mutat. Res.*, **410**, 123-140.
- Jover, R., Lindberg, R. L. y Meyer, U. A. (1996). Role of heme in cytochrome P450 transcription and function in mice treated with lead acetate. *Mol. Pharmacol.*, **50**, 474-481.
- Jover, R., Hoffmann, F., Scheffler-Koch, V. y Lindberg, R. L. (2000). Limited heme synthesis in porphobilinogen deaminase-deficient mice impairs transcriptional activation of specific cytochrome P450 genes by phenobarbital. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 7128-7137.
- Kasprzak, K.S., Hoover, K.L. y Poirier, L.A. (1985). Effects of dietary calcium acetate on lead subacetate carcinogenicity in kidneys of male Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis*. **6**, 279-282.
- Katz, A. J. y Foley, T. A. (1993). Effect of temperature on frequencies of spots in *Drosophila* wing spot assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **22**, 54-58.
- Kawai, K. (1998). Enhancement of the ADN damaging activity of N-Nitrosodimethylamine by di-(2-ethylhexyl)phthalate in somatic cells *in vivo* of *Drosophila melanogaster*. *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 579-582.

Kaya, B., Creus, A., Velázquez, A., Yaniko, A. y Marcos, R. (2000). Induction of an adaptive response in *Drosophila* imagal disc cells exposed *in vivo* to low doses of alkylating agents. *Mutagenesis*, **15**, 337-340.

Kemper, B. (1998). Regulation of cytochrome P450 gene expression by phenobarbital. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.*, **61**, 23-64.

Kénnya Silva, C., Reguly, M.L., Graf, U. y Rodrigues de Andrade, H. H. (2002). Comparison of camptothecin derivatives presently in clinical trials: genotoxic potency and mitotic recombination. *Mutagenesis*, **2**, 141-147.

Kim, J., Min, G. y Kemper, B. (2001). Chromatin assembly enhances binding to the CYP2B1 phenobarbital-responsive unit (PBRU) of nuclear factor-1, which binds simultaneously with constitutive androstane receptor (CAR)/retinoid C receptor (RXR) and enhances CAR/RXR-mediated activation of the PBRU. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 7559-7567.

Klaunig, J. E., Weghorst, C. M. y Pereira, M. A. (1988). Effect of phenobarbital on diethylnitrosamine and dimethylnitrosamine induced hepatocellular tumors in male B6C3F1 mice. *Cancer Lett.*, **42**, 133-139.

Knasmuller, S., Szakmary, A. y Kehrer, M. (1990). Use of differential ADN-repair host mediated assays to investigate the biotransformation of xenobiotics in *Drosophila melanogaster*. *Chemico-Biological Interactions*, **75**, 17-29.

Kobayashi, N. y Okamoto, T. (1974). Effects of lead oxide on the induction of lung tumors in Fryan hamster. *J. Natl. Cancer Ins.*, **25**, 1605-1610.

Kocarel, T. A. y Reddy, A. B. (1996). Regulation of cytochrome P450 expression by inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase in primary cultured rat hepatocytes and rat liver. *Drug Metabolism and Disposition*, **24**, 1197-1204.

Koller, L.D., Kerkvliet, N.I. y Exon, J.H. (1986). Neoplasia induced in male rats fed on lead acetate, ethyl urea and sodium nitrate. *Toxicol. Pathol.*, **13**, 50-57.

Lee, M., Ishizaki, H., Brady, J. F. Y Yang, C. S. (1989). Substrate specificity and alkyl group selectivity in the metabolism of N-nitrosodialkylamines. *Cancer Res.*, **15**, 1470-1474.

Le Goff, G., Bride, J., Cuany, A., Bergé, J. y Amichot, M. (2001). The sibling species *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans* differ in the expression profile of glutathione S-transferases. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **129**, 837-841.

Levin, W., Botelho, L.H., Thomás, P.E. y Ryan, E.E. (1980). Characterization of three forms of rat hepatic cytochrome P450: evidence for separate gene products. En Coon, M.J. Microsomes, drug oxidations and chemical carcinogenesis. Academic Press, Inc. New York. Vol I y II.

Lewis, D. F. V., Watson, E. Y Lake, B. G. (1998). Evolution of the cytochrome P450 superfamily: sequence alignments and pharmacogenetics. *Reviews in Mutat. Res.*, **410**, 245-270.

Lijinsky, W. (1999). N-Nitroso compounds in the diet. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. **443**, 129-138.

Lindsley, D.L y Zimm, G. (1990). The genome of *Drosophila melanogaster*, Part 4: Genes L-Z, balancers, Transposable Elements. *Drosoph. Inf. Serv.*, **68**, 382p

Lohman, P. H. M., Gentile, J. M., Gentile, G. Y Ferguson, L. R. (2001). Antimutagenesis / anticarcinogenesis 2001: screening methods and biomarkers. *Mutat. Res.*, **496**, 1-4.

Magee, P. (1980). Metabolism of nitrosamines: An overview. En Coon, M.J. Microsomes, drug oxidations and chemical carcinogenesis. Academic Press, Inc. New York. Vol I y II. Pp: 450.

Maitra, S., Dombrowski, S. M., Waters, L. C. y Ganguly, R. (1996). Three second chromosome-linked clustered Cyp6 genes show differential constitutive and barbital-induced expression in DDT-resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*. *Gene*. **180**, 165-171.

Maitra, S., Dombrowski, S. M., Basu, M., Raustol, O., Waters, L. C. y Ganguly, R. (2000). Factors on the third chromosome affect the level of *Cyp6a2* and *Cyp6a8* expression in *Drosophila melanogaster*. *Gene*. **248**, 147-156.

Margison, G.P., Margison, J.M. y Montesano, R. (1979). Persistence of methylated base in ribonucleic acid of syrian golden hamster liver after administration of dimethylnitrosamine. *Biochem. J.*, **177**, 967-973.

Marks, G. S., McCluskey, S. A., Mackie, J. E., Riddick, D. S. y James, C. A. (1988). Disruption of hepatic heme biosynthesis after interaction of xenobiotics with cytochrome P450. *The FASEB Journal*. **2**, 2774-2783.

Marshall, C..J. (1991). Tumor suppressor genes. *Cell*. **64**, 313-326.

Meyer, U. A. y Zanger, U. M. (1997). Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol.*, **37**, 269-296.

Mitchell, I. y Combes, R. (1984). Mutation test with the fruit fly *Drosophila melanogaster*. En: Mutagenicity testing: a practical approach. Editado por S. Venint, J. M. y Parry, I. R. L. Press. U.K. p 149-155.

Morrison, V. y Ashby, J. (1994). Reconciliation of five negative and four positive reports of the activity of dimethylnitrosamine in the mouse bone marrow micronucleus assay. *Mutagenesis*. **6**, 361-365.

Myers, M. J., Farrell, D. E., Howard, K. D. y Kawalek, J. C. (2001). Identification of multiple constitutive and inducible hepatic cytochromes P450 enzymes in marker weight swine. *Drug Metabolism and Disposition*. **29**, 908-915.

Müller, J. y Haberzettl, R. (1980). Mutagenicity of DNOC in *Drosophila melanogaster*. *Archives of Toxicology*. **4**, 59-61.

- Murillo-Romero, S. (1997). Efecto de la capacidad de inducción de la activación metabólica del etanol y del ciclohexanol frente al daño producido por la N, N-Dimetilnitrosamina en *Drosophila melanogaster*. Tesis profesional. Biología. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Nakagawa, K. (1992). Modification by phenobarbital of decreased glutathione content and glutathione S-transferase activity in livers of lead-treated mice. *Toxicol. Lett.*, **62**, 63-71.
- Nakamoto, T., Oda, Y., Imaoka, S., Funae, Y. y Fujimori, M. (1997). Effect of phenobarbital on the pharmacokinetics of lidocaine, monoethylglycinexylidide and 3-hydroxylidocaine in the rat: correlation with P450 isoform levels. *Drug Metabolism and Disposition*. **25**, 296-300.
- Nakamura, T., Sakata R., Ueno, T., Sata, M. y Ueno H. (2000). Inhibition of transforming growth factor prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology*. **32**, 247-255.
- Nims, R. W., Prough, R. A., Jones, C. R., Stockus, D. L., Dragnev, K, H., Thomas, P. E. Y Lubet, R. A. (1997). *In vivo* induction and *in vitro* inhibition of hepatic cytochrome P450 activity by the benzodiazepine anticonvulsants clonazepam and diazepam. *Drug Metabolism and Disposition*. **25**, 750-756.
- Nishi, Y., Miyanaga, K., Sato, S. y Inui, N. (1990). DNA damage induced in mouse peritoneal exudate cells after *in vivo* administration of chemical and physical agents as determined by alkaline elution. *Mutagenesis*. **5**, 55-61.
- Omura, T. y Sato, R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2378.
- O.M.S. (1990). Guías de calidad del aire para Europa. Serie europea No. 23, Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. O.M.S., Metepac, Edo. de México, p. 28.
- OPS. (1979). Organización Panamericana de la Salud. Criterios de Salud Ambiental 3. Plomo. O.P.S., México, 78.
- O'Riordan, M.L y Evans, H. J. (1974). Absence of significant chromosome damage in males occupationally exposed to lead. *Nature*. **3247**, 50-53.
- Pan, J., Xiang, Q. Y Ball, S. (2000). Use of a novel real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction method to study the effects of cytokines on cytochrome P450 mRNA expression in mouse liver. *Drug Metabolism and Disposition*. **28**, 709-713.
- Parke, V.D., Ionides, C. y Lewis, D.F.V. (1991). The role of the cytochromes P450 in the detoxication and activation of drugs and other chemicals. *Pharmac. Manufact. Assoc. Can. Key. Lect.* **69**, 537-548.
- Parry, J.M. (1988). Studies upon the genetic effects of environmental chemicals : the coordinated research programme of the European Economic Community. *Mutagenesis*. **3**, 105-136.

- Pegg, A. E. (2000). Repair of O<sup>6</sup>-alkylguanine by alkyltransferases. *Reviews in Mutat. Res.*, **462**, 83-100.
- Podvinec, M., Kaufmann, M. R., Handschin, Ch. Y Meyer, U. A. (2002). NUBIScan, an *in Silico* approach for prediction of nuclear receptor response elements. *Molecular Endocrinology*, **16**, 1269-1279.
- Ponka, P. (1997). Tissue-specific refutation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. *Blood*, **89**, 1-25.
- Ramos, P. (1993). Manual de Laboratorio de Genética para *Drosophila melanogaster*. 1a. ed. ED. McGraw-Hill Interamericana de México. pp 131.
- Rasmuson, A. (1985). Mutagenic effects of some water soluble metal compounds in a somatic eye-color test system in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, **157**, 157-162.
- Richard, A.M. (1998). Structure-based methods for predicting mtagenicity and carcinogenicity : are we there yet ? *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. **400**, 493-507.
- Robertson, I.G., Serabjit-Singh, C., Croft, J.E y Philpot, R.M. (1983). The relationship between increases in the hepatic content of cytochrome P450, form 5, and the metabolism of aromatic amines to mutagenic products following treatment of rabbits with phenobarbital. *Mol. Pharmacol.*, **24**, 156-162.
- Rockstein, M. ed. (1978). Biochemistry of insects. Academic Press. New York. USA. Pp: 649.
- Rodríguez-Arnaiz, R. y Téllez, O. G. (2002). Structure-activity relationships of several anisidine and dibenzanthracene isomers in the w/w+ somatic assay of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, **514**, 193-200.
- Rodríguez-Arnaiz, R., Ramos Morales, P. y Conchoso Cobos, M.I. (1986). Lead acetate and lead nitrate induced sex-linked recessive lethal mutations in mature sperm of *Drosophila melanogaster*. *Contam. Ambient.* **2**, 57-61.
- Rodríguez-Arnaiz, R., Vogel, E. W. y Szakmary, A. (1993). Strong intra-species variability in the metabolic conversion of six procarcinogens to somatic cell recombinagens in *Drosophila*. *Mutagenesis*. **8**, 543-551.
- Rodríguez-Arnaiz, R., Orozco-Soto, P., Gaytán-Oyarzún, J.C. y Graf, U. (1996). Analysis of mitotic recombination induced by several mono- and bifunctional alkylating agents in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.*, **351**, 133-145.
- Ronis, M. J. J., Aronson, J., Gao, G. G., Hogue, W., Skinner, R. A., Badger, T. M. y Lumpkin, Jr. Ch. K. (2001). Skeletal effects of developmental lead exposure in rats. *Toxicological Sciences*. **62**, 321-329.

Roy, y Rossman, T.G. (1992). Mutagenesis and comutagenesis by lead compounds. *Mutat. Res.*, **298**, 97-103.

Ruiz de Mena, I., Fernández-Moreno, M. A., Bornstein, B., Kaguni, L. S. y Garesse, R. (1999). Structure regulated expression of the  $\delta$ -aminolevulinic synthase gene from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* **274**, 37321-37328.

Ryan, G. Y. Ades, I. Z. (1993). Coordinate elevations of liver delta-aminolevulinic synthase and cytochrome P450 RNA by phenobarbital in chicken embryos: the effects of heme. *Int J Biochem.*, **21**, 1025-1031.

Russell, P. (1998). Genetics. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Fifth Edition. USA. 805 pp.

Russell, R. J., Dumancic, M.M., Foster, G.G., Weller, G.L, Healy, M.J. y Oakeshott, J.G. (1990). Ecological and evolutionary genetics of *Drosophila*. Chapter 16. Edited by J.S.F. Baker. Plenum Press, New York. pp 293-314.

Sakai, K., Suzuki, M., Yamane., Takahashi, A. y Ide, G. (1990). Promotion effect of basic lead acetate administration on the tumorigenesis of lung in N-nitrosodimethylamine-treated mice. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **44**, 707-714.

Sakai, H., Park, S. y Kikkawa, Y. (1992). Differential oxidase activity of hepatic and pulmonary microsomal cytochrome P450 isozymes after treatment with cytochrome P450 inducers. *J. Biol. Chem.*, **187**, 1262-1269.

Samiec, P. S. y Goodman, J. I. (1999). Evaluation of methylated ADN binding protein-1 in mouse liver. *Toxicological Sciences.* **49**, 255-262.

Sánchez Lamar, A., Fonseca López, G., Capiro Trujillo, N. y Fernández Fuentes, D. (2000). Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba. *Rev. Cubana Farm.*, **34**, 34-43.

Saner, C., Weibel, B., Würgler, F.E. y Sengstag, Ch. (1996). Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ. Mol. Mutagen.*, **27**,46-58.

Savolainen, E.R., Brocks, D., Ala-Kokko, L. y Kivirikko, K.I. (1988). Serum concentrations of the N-terminal propeptide of type III procollagen and two type IV collagen fragments and gene expression of the respective collagen types in liver in rats with dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis. *Biochem. J.*, **249**, 753-757.

Seaton, M., Kyerematen, G. A., Morgan, M., Jeszenka, E. V. y Vesell, E. S. (1991). Nicotine metabolism in stump-tailed macaques. *Macaca arctoides*. *Drug Metabolism and Disposition.* **19**, 946-954.

- Sengstag, C. (1994). The role of mitotic recombination in carcinogenesis. *Crit. Rev. Toxicol.* **24**, 323-353.
- Sharpe, C.R., Collet, J-P., Belzile, E., Hanley, J.A. y Boivin, J-F. (2002). The effects of tricyclic antidepressants on breast cancer risk. *British Journal of Cancer*. **86**, 92-97.
- Shane, B. S., Smith-Dunn, D. L., de Boer, J. G., Glickman, B. W. y Cunningham, M. L. (2000 a). Subchronic administration of phenobarbital alters the mutation spectrum of *lacI* in the livers of *Big Blue* transgenic mice. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. **448**, 69-80.
- Shaw, P. M., Adesnik, M., Weiss, M. C. y Corcos, L. (1993). The phenobarbital-induced transcriptional activation of cytochrome P450 genes is blocked by the glucocorticoid-progesterone antagonist RU 486. *Mol. Pharm.*, **44**, 775-783.
- Shibutani, M., Takahashi, N., Kobayashi, T., Uneyama, Ch, Masutomi, N., Nishikawa, A. y Hirose, M. (2002). Molecular profiling of genes up-regulated during promotion by Phenobarbital treatment in a medium-term rat liver bioassay. *Carcinogenesis*. **23**, 1047-1055.
- Shinohara, T., Taura, K., Imamura, T., Yamada, H. Y Oguri, K. (1997). Induction of rat hepatic cytochrome P4502B subfamily by azidophenobarbital, as a possible photoaffinity probe for the putative Phenobarbital receptor. *Drug Metabolism and Disposition*. **25**, 1442-1446.
- Sidhu, J. S. y Omiecinski, C. J. (1995). Camp-associated inhibition of Phenobarbital-inducible cytochrome P450 gene expression in primary rat hepatocyte cultures. *J. Biol.Chem.*, **270**, 12762-12773.
- Sirover, M.A y Loeb, L.A. (1976). Infidelity of ADN synthesis *in vitro*: screening for potential metal mutagens or carcinogens. *Science*. **194**, 1434-1436.
- Sokol, R.Z. y Berman, N. (1991). The effects of age of exposure on lead-induced testicular toxicity. *Toxicology*. **69**, 269-278.
- Spanó, M.A., Frei, H., Würzler, F. E. y Graf, U. (2001). Recombinogenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis*. **16**, 385-394.
- Srivastava, G., Bawden, M. J., Hansen, A. J. y May, B. K. (1989). Heme may not be a positive regulator of cytochrome P450 expression. *European Journal of Biochemistry*. **178**, 689-692.
- Stern, C. (1936). Somatic crossing-over and segregation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **21**, 625-730.
- Stohs, S.J. y Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.*, **18**, 321-336.
- Sueyoshi, T. y Negishi, M. (2001). Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors. *Annu. Rev. Pharmacol.*, **41**, 123-143.

- Sundseth, S.S., Nix, C.E. y Waters, L.C. (1990). Isolation of insecticide resistance-related forms of cytochrome P450 from *Drosophila melanogaster*. *Biochem J.*, **265**, 213-217.
- Suzuki, H., Kneller, M. B., Haining, R. L., Trager, W. F. y Rettig, A. E. (2002). (+)-N-3-Benzyl-Nirvanol and (-)-N-3-Benzyl-Phenobarbital: New potent and selective *in vitro* inhibitors of CYP2C19. *Drug Metabolism and Disposition*. **30**, 2325-2329.
- Tang, B. K., Kalow, W. y Grevy, A. A. (1979). Metabolic fate of Phenobarbital in man. N-glucoside formation. *Drug Metabolism and Disposition*. **7**, 315-318.
- Tijet, N., Helvig, C. y Feyereisen, R. (2001). The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene*. **262**, 189-198.
- Tredger, J. M. y Stoll, S. (2002). Cytochromes P450: their impact on drug treatment. *Hospital pharmacist*. **9**, 167-173.
- Tully, D. B., Collins, B. J., Overstreet, J. D., Smith, C. S., Dinse, G. E., Mumtaz, M. M. y Chapin, R. E. (2000). Effects of arsenic, cadmium, chromium, and lead on gene expression regulated by a battery of 13 different promoters in recombinant HepG2 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **168**, 79-90.
- Ueda, A., Hamadeh, H. K., Webb, H. K., Yamamoto, Y., Sueyoshi, T., Afshari, C. A., Lehmann, J. M. y Negishi, M. (2002). Diverse roles of the nuclear orphan receptor CAR in regulating hepatic genes in response to Phenobarbital. *Mol. Pharm.*, **61**, 1-6.
- Ukawa-Ishikawa S., Sawada Atsuko., Kasuya, K. y Mochizuki, M. (1997). Mutagenicity of isomeric alkanediazotates, precursors for ultimate alkylating species of carcinogenic N-nitroso compounds. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. **412**, 99-107.
- Valverde, M., Trejo, C. y Rojas, E. (2001). Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction? (2001). *Mutagenesis*. **16**, 265-270.
- Van Ess, P. J., Mattson, M. P. Y Blouin, R. A. (2002). Enhanced induction of cytochrome P450 enzymes and CAR binding in TNF (p 55/ p75) double receptor knockout mice following Phenobarbital treatment. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **300**, 824-830.
- Van Schaik, N. y Graf, U. (1991). Genotoxicity evaluation of five tricyclic antidepressants in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res.* **260**, 99-104.
- Van Schaik, N. y Graf, U. (1993). Structure-activity relationships of tricyclic antidepressants and related compounds in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res.* **286**, 155-163.
- Villalobos-Pietrini, R. (1994). Términos genéticos en español. *Rev. Int. Contam. Ambient*. **10**, 31.

- Vogel, E. W. (1980). Genetical relationship between resistance to insecticides and procarcinogens in two *Drosophila* populations. *Arch Toxicol.*, **43**, 201-211.
- Vogel, E. W. (1987). Evaluation of potential mammalian genotoxins using *Drosophila*: the need for a change in test strategy. *Mutagenesis*. **2**, 161-171.
- Vogel, E.W. (1991). Genotoxic Chemicals. An introduction into basic principles of Genetic Toxicology. Apuntes del Primer Taller Latinoamericano en Toxicología Genética en *Drosophila melanogaster*. Tlaxcala, México. Sin publicar.
- Vogel, E.W y Nivard M.J.M. (1999). A novel method for the parallel monitoring of mitotic recombination and clastogenicity in somatic cells in vivo. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. **43**, 141-153.
- Von Domarus, A., Farreras, V. y Rozman. (1997) Tratado de Medicina Interna. 25ª. Edición. Ediciones Doyma, Barcelona, España. pp 2600.
- Wang, X., Suzuki T., Itoh, T., Honma, M., Nishikawa, A., Furukawa, A., Takahashi, M., Hayashi, M., Kato, T. y Sofuni, T. (1998). Specific mutational spectrum of dimethylnitrosamine in the lacI transgene of *Big Blue* C57BL/6 mice. *Mutagenesis*. **13**, 625-630.
- Waters, L.C. y Nix, C. E. y Epler, J. L. (1983). Studies on the relationship between dimethylnitrosamine-demethylase activity and dimethylnitrosamine-dependent mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. *Chemico-Biological Interactions*. **46**, 55-66.
- Waters, L.C., Simms, S. I. y Nix, C. E. (1984). Natural variation in the expression of cytochrome P450 and dimethylnitrosamine demethylase in *Drosophila*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **123**, 907-913.
- Waters, L.C. y Nix, C. E. (1988). Regulation of insecticide resistance-related cytochrome P450 expression in *Drosophila melanogaster*. *Pesticide biochemistry and physiology*. **30**, 214-227.
- Watson, R. E. y Goodman, J. I. (2002). Epigenetics and DNA methylation come of age in toxicology. *Toxicological Sciences*. **67**, 11-16.
- Watson, R. E. y Goodman, J. I. (2002). Effects of Phenobarbital on DNA methylation in GC-rich regions of hepatic DNA from mice that exhibit different levels of susceptibility to liver tumorigenesis. *Toxicological Sciences*. **68**, 51-58.
- Weghorst, C. M., Pereira, M. A. y Klaunig, J. E. (1989). Strain differences in hepatic tumor promotion by phenobarbital in diethylnitrosamine and dimethylnitrosamine initiated infant male mice. *Carcinogenesis*. **10**, 1409-1412.
- Weisel, C., Demak, M., Marcus, S. y Goldstein, B.D. (1991). Soft plastic bread packing: lead content and reuse by families. *Am. J. Public. Health.*, **81**,736-758.

Williams, G. M., Iatropoulos, M. J., Wang, C. X., Jeffrey, A. M., Thompson, S., Pittman, B., Palasch, M. y Gebhardt, R. (1998). Nonlinearities in 2-acetylaminofluorene exposure responses for genotoxic and epigenetic effects leading to initiation of carcinogenesis in rat liver. *Toxicological Sciences*, **45**, 152-161.

Wilson, T. G. (2001). Resistance of *Drosophila* to toxins. *Annual Review of Entomology*, **46**, 545-571.

Windholz, M., Budavari, S., Streumtsos, L.Y. y Noetherferting, M. (1995). "The Merck Index" An encyclopedia of chemicals and drugs. 9<sup>th</sup> edition. Ed. Merck and Co., Inc. Rahway, N.J., U.S.A.

Wolf, C. (1990). Metabolic factors in cancer susceptibility. *Cancer surveys*, **9**, 437-474.

Würgler, F.E., Sobels, F.H. y Vogel, E.W. (1984). *Drosophila* as an assay system for detecting genetic changes. En: "Handbook of Mutagenicity Test Procedures". 2nd. edition. Editado por B. J. Kilbery., M. Legator., W. Nichols. y C. Ramel. Elsevier Science Publishers, B. V.

Yamada, H., Matsuki, Y., Yamaguchi, T. y Oguri, K. (1999). Effect of a ligand selective for peripheral benzodiazepine receptors on the expresión of rat hepatic P450 cytochromes: assessment of the effect *in vivo* and in a hepatocyte culture system. *Drug Metabolism and Disposition*, **27**, 1242-1247.

Yamada, H., Matsunaga, H., Tsuji, K., Matsumoto, S., Yamamoto, M., Ishii, Y., Omiecinski, C. J. y Oguri, K. (2000). Sequence analyses of CYP2B genes and catalytic profiles for P450s in QdJ:Spague-Dawley rats that lack response to the phenobarbital-mediated induction of CYP2B2. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **295**, 986-993.

Yoshinari, K., Sueyoshi, T., Moore, R. y Negishi, M. (2001). Nuclear receptor CAR as a regulatory factor for the sexually dimorphic induction of CYP2B1 gene by Phenobarbital in rat livers. *Mol. Pharm.*, **59**, 278-284.

Zelikoff, J.T., Hartwig, A., X.W. Costa. y Rossman, T.G. (1988). Genetic toxicology of lead compounds. *Carcinogenesis*, **9**, 1727-1732.

Zelko, I. Y Negishi, M. (2000). Phenobarbital-elicited activation of nuclear receptor CAR in induction of cytochrome P450 genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **277**, 1090-2104.

Zijlstra, J.A, Vogel, E.W. y Breimer, D.D. (1984). Strain differences and inducibility of microsomal oxidative enzymes in *Drosophila melanogaster* flies. *Chem. Biol. Interactions*, **48**, 317-338.

Zimmerman, F., Schwaier, R. y Laer U. (1996). Mitotic recombination induced in *Saccharomyces cerevisiae* with nitrous acid, diethylsulfate and carcinogenic, alkylating nitrosamides. *Z. Vererbungsl.*, **98**, 230-246.