

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

34

"Evaluación del Efecto Genotóxico del Tamoxifen y el 4-NQO en la cruce estándar de *Drosophila melanogaster*, mediante la prueba SMART en el ala."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

MARTHA LAURA CONTRERAS SOUSA

DIRECTORA DE TESIS:

M. en C. MA. EUGENIA HERES Y PULIDO



2003

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACION DISCONTINUA



DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Evaluación del Efecto Genotóxico del Tamoxifen y el 4-NQO en la cruce estándar de Drosophila melanogaster, mediante la prueba SMART en el ala"

realizado por Martha Laura Contreras Sousa

con número de cuenta 9657595-4 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

M. en C. María Eugenia Isabel Heres y Pulido

Propietario

Dr. Rafael Villalobos Pietrini

Propietario

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Suplente

Dra. Judith Guzmán Rincón

Suplente

Dra. Rosario Rodríguez-Arnaiz

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

M. en C. ~~Juan Manuel Rodríguez Chávez~~

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
 FACULTAD DE CIENCIAS

3

DEDICATORIAS

A Dios, por Su amor incondicional. Gracias Señor, por todo lo que me has dado.

A mis papás, Adolfo y Martha, por todo el amor y apoyo que siempre me han dado. Por el sacrificio que hicieron para darme la mejor educación. Por enseñarme a luchar para conseguir mis metas y por impulsarme a seguir adelante en los momentos difíciles. Gracias por creer en mí y por compartir y disfrutar mis sueños. Los quiero mucho!!

A Larry, mi esposo y mejor amigo. Por tu amor y apoyo incondicional en todo momento. Por tu paciencia y sacrificio para que pudiera terminar este proyecto. Gracias por creer y confiar en mí y por recordarme día con día lo maravilloso que es el estar contigo. TE AMO MUCHO!!

A mi Miles, que aunque estás muy pequeño para entender todo esto, te doy gracias por el tiempo que involuntariamente cediste para que pudiera trabajar en este proyecto. Te quiero mucho preciosos!!

A mis hermanos, Claudia y Adolfo. Gracias por escuchar y disfrutar mis "lauraventuras" durante la carrera (bueno, toda la vida). Por todas esas noches de insomnio y pláticas que tuvimos. Por todos los momentos que pasamos juntos comiendo, jugando, flojeando y hasta peleando. Gracias por toda su ayuda y apoyo para terminar la escuela y esta tesis. Son los mejores hermanos que pude tener. Los quiero mucho!!

A mis cuñados, Rosita y Chucho por todo su cariño y apoyo durante todo este tiempo.

A mis abuelitas, Lilo y Cachis. Gracias por todo su amor y cariño. Gracias por escucharme en todo momento y por todas las cosas que me han enseñado. Las quiero mucho!!

A mis abuelitos, Jesús y Pedro, que aunque ya no están aquí, les doy las gracias por todo el amor que me dieron.

A mis tíos, Luce, Paty y Enrique. Gracias por todo su amor y apoyo en estos 27 años.

A mi primo Enrique, por compartir mi "locura científica" y por toda la ayuda que me diste a lo largo de la carrera.

A Paquito, gracias por todo tu amor. Te quiero mucho!

AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. María Eugenia Heres y Pulido. Muchísimas gracias por confiar en mí. Por todo el apoyo y ayuda que me has dado a pesar de la distancia. Por la paciencia que me has tenido durante estos 3 años. Por todos tus comentarios positivos y el tiempo que has dedicado para que este trabajo sea excelente. Pero sobre todo, muchísimas gracias por tu amistad.

A la M. en C. Laura Castañeda Partida. Muchísimas gracias por las imágenes que aportaste para mejorar este trabajo y por tus comentarios siempre constructivos. Gracias por compartir tus conocimientos y alegría de vivir conmigo.

A los doctores del jurado:

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Dra. Rosario Rodríguez-Arnaiz

Dr. Rafael Villalobos Pietrini

Dra. Judith Guzmán Rincón

Muchísimas gracias por todo el tiempo que dedicaron para revisar este trabajo y por las excelentes observaciones que hicieron para enriquecerlo. Mil gracias!!

Gracias a todos los que de una u otra forma me ayudaron y apoyaron durante estos 27 años.

ÍNDICE

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
<i>Drosophila melanogaster</i>	5
<i>SMART (Somatic Mutation and Recombination Test)</i> Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas	8
ANTECEDENTES	11
Tamoxifen	11
Metabolismo del Tamoxifen	11
Tamoxifen y el Cáncer de Endometrio	14
4-óxido 1-nitroquinolina	17
JUSTIFICACIÓN	18
OBJETIVOS	18
HIPÓTESIS	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Reactivos	19
Marcadores para <i>SMART</i> en el ala	19
Sistema de cruzas	19
Fijación de los individuos y elaboración de las preparaciones	20
Criterios de lectura	21
Evaluación estadística de los datos	22
RESULTADOS	24
DISCUSIÓN	30
Tamoxifen	30
4-NQO	31
CONCLUSIONES	33
REFERENCIAS	34

RESUMEN

Se valoraron los efectos genotóxicos del tamoxifen (TAM) y del 4-nitroquinolina 1-óxido (4-NQO) utilizando el bioensayo de mutación y recombinación somáticos (SMART) en el ala de la craza estándar de *Drosophila melanogaster*. El TAM es un anti-estrógeno que se utiliza para el tratamiento y la prevención del cáncer mamario en humanos, pero causa carcinomas en el hígado de roedores y en el endometrio de humanos. El 4-NQO es un cancerígeno que produce aductos en el ADN similares a los encontrados en los hepatocitos de ratas y en el endometrio de humanos tratados con TAM. Como *Drosophila* carece de receptor de estrógeno (RE), el TAM no puede ejercer ningún efecto por vías epigenéticas relacionadas con él. Se realizaron experimentos crónicos donde se expusieron larvas de 72 horas a concentraciones del TAM (0.66, 1.66, 3.33 mM) por arriba y por debajo de la dosis terapéutica (2.5 mM) y del 4-NQO (2.5 y 5 mM). Como control positivo se empleó la N-nitrosodimetilamina (DMN) en dos concentraciones (1 y 2mM). Se analizaron alas de individuos con fenotipo silvestre y con fenotipo serratia. Las concentraciones 1.66 y 3.33 mM del TAM son genotóxicas, pero la respuesta a la dosis no es clara. Los eventos genotóxicos causados por el TAM posiblemente se deben a la formación de aductos TAM-ADN. El análisis de la tendencia hacia eventos mutagénicos y/o recombinagénicos mostró al TAM como un agente mutagénico y al 4-NQO con una importante actividad recombinagénica y mutagénica. Se concluye que la genotoxicidad en el TAM y en el 4-NQO es diferente.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los seres vivos estamos expuestos a una gran cantidad de compuestos y agentes químicos que pueden tener efectos tóxicos, genotóxicos o cancerígenos y que se encuentran en el medio ambiente, en los alimentos y/o en los medicamentos (Guzmán Rincón *et al.*, 1998).

Las mutaciones son los cambios que se presentan en la secuencia del ADN que codifica un gen y la mayoría de éstas se reconocen debido a que el fenotipo del organismo se modifica como resultado del cambio en la función, pérdida o aumento de la producción de una proteína o de sus isoformas. Las mutaciones pueden ser germinales o somáticas, las primeras son aquéllas que se producen en las células sexuales (las cuales dan lugar a los gametos), por lo que la mutación es transmitida a la siguiente generación (McClellan, 1999a), en tanto que las segundas se presentan en las células somáticas (que dan lugar a todos los demás tejidos) y no se transmiten a la siguiente generación. Si la mutación ocurre en las células germinales, todas las células del producto de la fertilización van a expresar la mutación, que al manifestarse en etapas tempranas del crecimiento, podría afectar el desarrollo del organismo. Si se presenta en células somáticas puede ocasionar disfunciones o procesos malignos como el cáncer (Dean, 1981).

De acuerdo con la teoría genética de la mutación, los tumores cancerosos son resultado de una serie de mutaciones somáticas que tienen lugar cuando uno o varios proto-oncogenes, genes supresores de tumores y/o genes que reparan el ADN sufren una mutación. Todas las células hijas que deriven de ésta contendrán la(s) mutación(es) y el fenotipo podrá manifestarse como el crecimiento incontrolado de células mutantes que darán lugar a la formación de tumores (McClellan, 1999b). El mecanismo de recombinación que varios agentes químicos inducen en el ADN de células somáticas, representa uno de los pasos para el origen de algunos tipos de cánceres humanos (Graf *et al.*, 1994).

Gracias a los primeros estudios de mutagénesis, la utilización de metodologías experimentales con organismos específicos como modelos biológicos se ha diversificado e incluye sistemas de estudio *in vivo* e *in vitro* para organismos de diferente complejidad evolutiva. Estos sistemas de estudio pueden ser utilizados como pre-monitores para la selección y el desarrollo de agentes químicos seguros, para el estudio de los mecanismos de acción de un compuesto y para la identificación de sus posibles efectos cancerígenos (Zijlstra, 1987).

El empleo de los diferentes sistemas biológicos para pruebas genotóxicas se ha realizado tomando en cuenta el riesgo potencial que representa la exposición a agentes químicos para el humano, por lo que se han buscado organismos que tengan un metabolismo similar y en este sentido *Drosophila melanogaster* cumple con diferentes ventajas para ser utilizada en dichos estudios (Rodríguez-Arnaiz y Ramos, 1992).

Drosophila melanogaster

Por varias décadas, *Drosophila melanogaster* ha jugado un papel esencial para el desarrollo de la genética, especialmente en el estudio de los procesos que originan las mutaciones. La gran cantidad de mutantes que han sido aislados y estudiados han contribuido al conocimiento genético y molecular de los genes de la mosca de la fruta, los cuales han sido mapeados y secuenciados totalmente (Adams *et al.*, 2000).

Las características que tiene *Drosophila melanogaster* y que le permiten ser un modelo óptimo para el desarrollo de sistemas que detectan la actividad genotóxica de agentes químicos son las siguientes: es un organismo eucarioto holometábolo con un ciclo que lleva aproximadamente 10 días a una temperatura de 25° C para la emergencia de los imagos o adultos (Figura 1). El ciclo se inicia con la ovoposición y el desarrollo embrionario posterior a la fertilización del óvulo se realiza en las membranas del huevo. A las 24 horas los huevos se transforman en larvas que pasan por tres estadios (estadio 1 = 1 día; estadio 2 = 1 día; y estadio 3 = 2 días), donde la ingestión del alimento es constante para luego transformarse en pupas. La pupación se realiza en el pupario, el cual es una cubierta quitinosa que se va endureciendo paulatinamente. La organogénesis se lleva al cabo en este estadio que es el más largo de la metamorfosis (4 días). El imago emerge rompiendo el extremo anterior del pupario (Mitchell y Combes, 1984; Rodríguez-Arnaiz y Ramos, 1992).

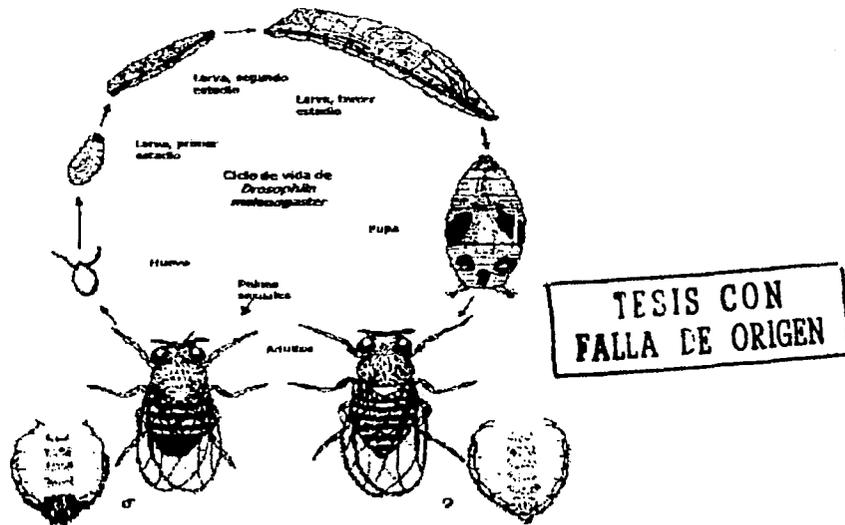


Fig. 1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

Este organismo es fácil de mantener en espacios reducidos, deja un gran número de descendientes y los medios de cultivo no son costosos, por lo que permiten la alimentación de una cantidad considerable de individuos (Graf, *et al.*, 1996).

Este díptero presenta dimorfismo sexual (Figura 2). La hembra suele ser más grande que el macho, el extremo del abdomen de la hembra es alargado y el del macho es redondeado. El abdomen de la hembra tiene 7 segmentos, mientras que el del macho tiene 5, además de que éstos tienen un peine sexual conformado por 10 cerdas gruesas que se encuentran en la superficie distal del segmento tarsal basal de las patas anteriores (Rodríguez-Arnaiz y Ramos, 1992).

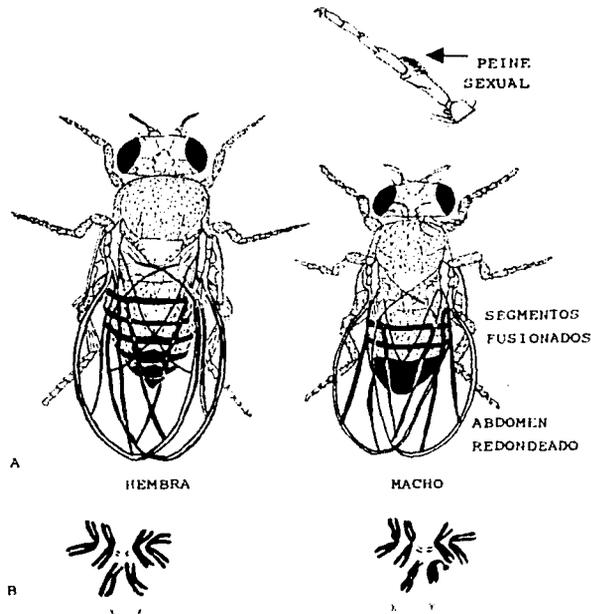


Fig. 2. A. Características morfológicas de la hembra y el macho de *Drosophila melanogaster*. B. Cromosomas metafásicos (tomado de Rodríguez-Arnaiz y Ramos, 1992)

Debido a que es uno de los eucariotas mejor conocidos desde el punto de vista genético, se cuenta con alrededor de 11,500 cepas específicas con marcadores genéticos adecuados, los cuales permiten detectar *in vivo* diversos tipos de

mutaciones génicas y cromosómicas en las células germinales y en las somáticas. En este insecto es fácil determinar algunos caracteres morfológicos que están genéticamente controlados; por otra parte es capaz de activar promutágenos y procarcinógenos *in vivo* gracias a la actividad de una familia de enzimas involucradas en la desintoxicación celular (Rodríguez-Arnaiz y Ramos, 1992; Graf, *et al.*, 1996).

Se ha demostrado que *Drosophila* tiene enzimas de desintoxicación similares a las contenidas en la fracción S9 del hígado de mamíferos (Clark, 1982; Hällström *et al.*, 1982) además de que se encuentran presentes en mayor proporción durante su fase larvaria. Estas enzimas son dependientes de la familia de citocromos P450 (Mitchell y Combes, 1984) y participan de manera importante en la reducción-activación de promutágenos y principalmente en el metabolismo de xenobióticos (agentes químicos externos) que contienen átomos de nitrógeno como las aminas metiladas, nitrosaminas, hidrazinas y aminas aromáticas (Zijlstra, 1987). La línea *Oregon flare* fue construida por Frölich y Würgler en 1989. Esta línea contiene los cromosomas 1 y 2 de la línea *Oregon R(R)* que es resistente al DDT. Su cromosoma 2 porta la mutación dominante *Rst(2)DDT* localizada en la región 43E (2-65) que provoca la sobre expresión constitutiva de una proteína inductora de los genes *CYP6A8* y *CYP6A9* del cromosoma 1 y *CYP6A2* del cromosoma 2. Además las células somáticas de *Drosophila* ofrecen la posibilidad de desarrollar ensayos rápidos y flexibles en duración de tiempo para detectar un amplio espectro de agentes tóxicos (Graf *et al.*, 1989).

SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas

Estas pruebas de mutación y recombinación somáticas son ensayos genotóxicos que se desarrollaron en *Drosophila melanogaster* y son capaces de detectar mutaciones causadas por eventos puntuales, deleciones, no-disyunción y recombinación mitótica (Figura 3) (Rodríguez-Arnaiz y Ramos, 1992; Graf *et al.*, 1994, 1996;). Tanto las mutaciones como la recombinación somática son el resultado de los eventos que ocurren en las células durante la morfogénesis de *Drosophila* y es muy importante el hecho de que sólo se requiere de una generación para su evaluación.

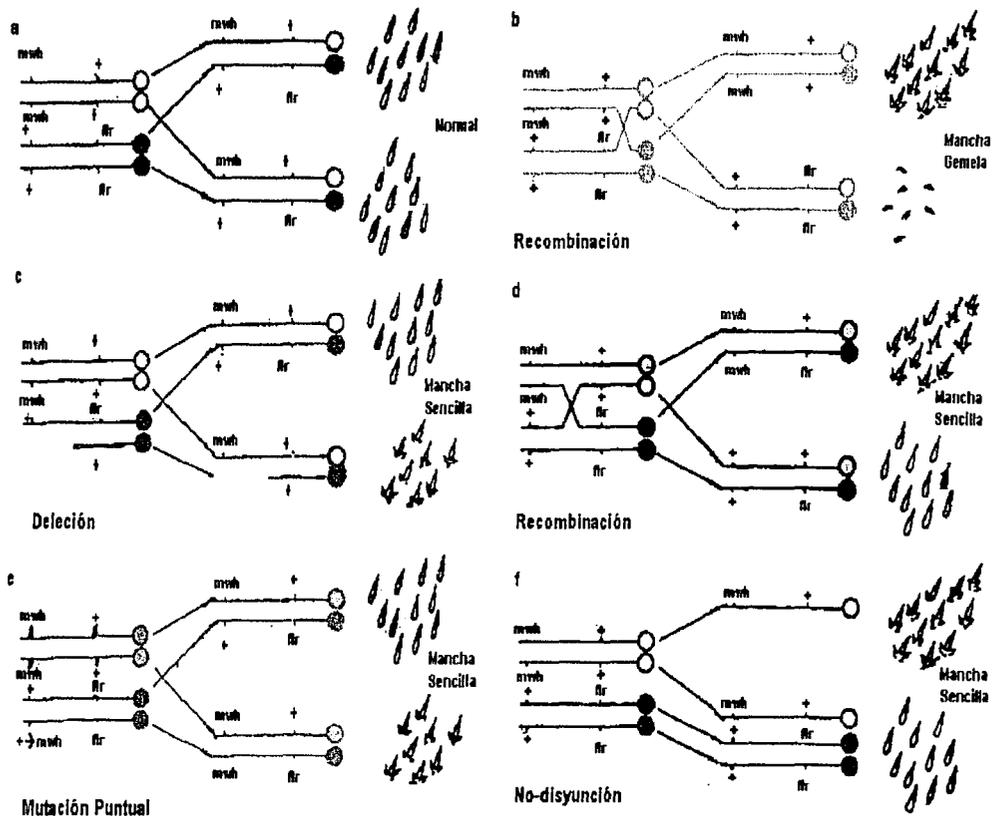


Fig. 3. Eventos genéticos que llevan a la pérdida de heterocigosis y a la formación de manchas (tomado de Graf *et al.*, 1984).

SMART se basa en métodos para producción de larvas de edad específica con genotipos que permiten que el cambio mutacional inducido en una célula se manifieste fenotípicamente en todas sus células hijas en una etapa posterior. Debido a que esta prueba se basa en el principio de pérdida de heterocigosidad, al utilizar marcadores genéticos adecuados, estos se van a expresar de manera homocigota recesiva y van a formar clones (manchas) en la superficie externa de la mosca, permitiendo así visualizar fácilmente el cambio genético inducido.

Dos sistemas de prueba han sido ampliamente estudiados: la prueba de manchas en las alas y la prueba de manchas en los ojos. Ambas pruebas se basan en el hecho de que durante el desarrollo embrionario temprano, grupos de células epiteliales forman los llamados discos imagales que originarán dichas estructuras (Figura 4). En los dos discos imagales que formarán el par de alas las células proliferan mitóticamente durante el desarrollo larvario a ritmos de crecimiento específico, de 50 a 100 células al comienzo de la etapa larvaria, alcanzan una talla aproximada de 24 mil células en la etapa de pupa y se diferencian durante esta etapa, dando origen a esas estructuras. Por lo que al ocurrir una alteración genética en una de las células de los discos imagales, esta alteración estará presente en todas las células descendientes y formará un clon de células mutantes. Si las alteraciones causan un daño visible en el fenotipo, el clon de células mutantes puede detectarse como una mancha en el ala. Debido a esto, la aparición de manchas y su tamaño dependerá del estadio larvario en el que se induzca la alteración con el agente químico, por lo que a menor edad de la larva, se obtendrá menor número de manchas, pero de mayor tamaño y viceversa (Rodríguez-Arnaiz y Ramos, 1992; Graf *et al.*, 1994, 1996; Graf, 1995; Guzmán Rincón *et al.*, 1998).

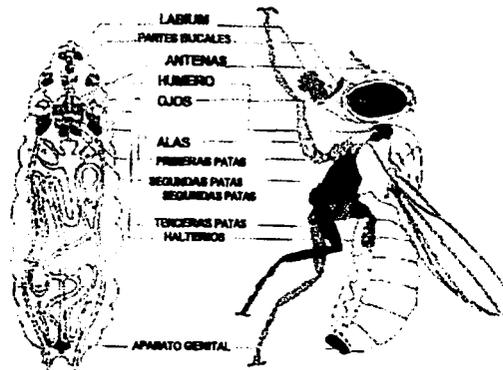


Fig. 4. Distribución de los discos imagales en la larva de *Drosophila melanogaster*.

La prueba de manchas en las alas se basa en la utilización de marcadores que modifican el fenotipo de los tricomas del ala y hace uso de larvas transheterocigotas para los marcadores *mwh* (*multiple wing hair*) que producen tricomas múltiples en cada célula y *flr* (*flare*) que produce tricomas en forma de flama o roseta (Graf *et al.*, 1984).

Otro de los aspectos importantes de *SMART* es que puede detectar xenobióticos, los cuales requieren de una activación metabólica. *SMART* ha sido utilizada para estudiar la genotoxicidad de varios tipos de bebidas para el consumo humano (té, café, vino, brandy) y, agentes contaminantes del aire (Delgado-Rodríguez *et al.*, 1999), así como en más de 400 agentes químicos (Graf, 1995; Frei *et al.*, 1998).

La prueba de *SMART* representa una forma eficiente, rápida y económica de determinar la actividad genotóxica de agentes químicos simples y de mezclas complejas, ya que es sensible a estos y como ya se ha mencionado, es capaz de detectar mutación y recombinación somática *in vivo* (Graf *et al.*, 1996).

ANTECEDENTES

Tamoxifen (TAM)

Desde hace más de 100 años se empezó a relacionar el efecto de los estrógenos con el cáncer de mama, por lo que científicos ingleses del programa de fertilidad de ICI Pharmaceutical Division (ahora Zeneca) comenzaron a investigar al respecto. A finales de los años 30 del siglo XX descubrieron potentes drogas estrogénicas de larga actividad llamadas trifeniletilenos. A mediados de los años 60, Harper y Walpole (mencionado en Jordan, 1999a) descubrieron que el isómero *trans* de un trifeniletileno (ICI (International Chemical Index) 46,474) era un compuesto con gran actividad antiestrogénica en ratas y en primates, mientras que su isómero geométrico *cis* (ICI 46,699) tenía una actividad estrogénica. Debido a las investigaciones previas realizadas por Walpole sobre el cáncer de mama y a este descubrimiento, él sugirió utilizar al ICI 46,474 (conocido actualmente como Tamoxifen) para el tratamiento contra el cáncer de mama (Jordan, 1999a). En 1971 se realizaron varios estudios clínicos utilizando al tamoxifen (TAM) para el tratamiento de cáncer de mama y se empezaron a hacer los primeros estudios en laboratorio como agente preventivo de éste (Jordan, 1999a).

En 1973, Nolvadex (marca comercial del TAM) fue aprobado por el "*Committee on the Safety of Medicines in the United Kingdom*" para el tratamiento del cáncer de mama y en 1978 por la "*Food and Drugs Administration*" (FDA) en los Estados Unidos (Barakat, 1999). En 1985, fue aprobado por la FDA como una terapia adjunta a la quimioterapia en mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama con células positivas al estrógeno. En 1989, la FDA permitió su empleo en mujeres premenopáusicas con cánceres avanzados con receptores de estrógeno positivos. En 1990, este medicamento fue reconocido como terapia adjunta en pacientes pre y postmenopáusicas con cáncer de mama con ganglios negativos y receptores de estrógeno positivos. En 1993, la FDA lo aprobó para el tratamiento de cáncer de mama en hombres. El 30 de diciembre de 1997, la FDA certificó su uso para el tratamiento de cánceres avanzados en mujeres postmenopáusicas. Finalmente en 1998, fue aprobado para la reducción del riesgo de cáncer de mama en mujeres pre y postmenopáusicas de alto riesgo (Jordan, 1999a).

Metabolismo del TAM

Tamoxifen (citrato de tamoxifen) (Figura 5) es una droga antiestrogénica no esteroide que se ingiere oralmente en forma de pastilla en dosis de 20 a 40 mg/ día. Éste se une al receptor de estrógenos nuclear bloqueando la unión del estrógeno con

su receptor, por lo que reduce y detiene el crecimiento de las células cancerígenas positivas al estrógeno en el tejido mamario (Oncology Group, 1998; Barakat *et al.*, 2001), pero también puede actuar como estrógeno en otros tejidos (CancerWeb, 1998).

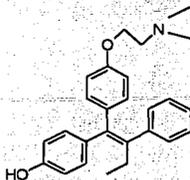


Fig. 5. Fórmula estructural del citrato de tamoxifen (Tamoxifen)

La primera ruta metabólica del TAM descrita fue la hidroxilación de éste que da lugar al 4-hidroxiTAM, el cual ha mostrado tener una alta afinidad para unirse al receptor del estrógeno y ser un potente antiestrógeno con propiedades antitumorales. Originalmente se pensaba que el 4-hidroxiTAM era el principal metabolito del TAM presente en los pacientes, pero Hugh Adam (mencionado en Jordan, 1999a) demostró que la forma *N*-desmetilTAM es el principal metabolito encontrado en los humanos. Tanto los metabolitos menores, metabolito-Y, metabolito-Z, como 4-hidroxi-*N*-desmetilTAM contribuyen en la acción antitumoral del TAM debido a que todos son antiestrógenos que inhiben la unión del estradiol con el receptor de estrógeno (Figura 6) (Jordan, 1999a).

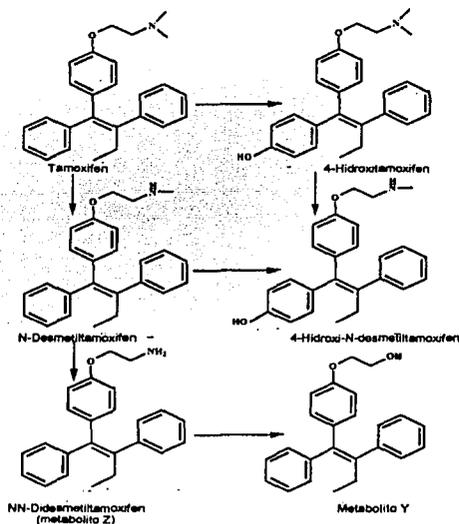


Fig. 6. Metabolitos del TAM encontrados en humanos (tomado de Jordan, 1999a).

A pesar del gran éxito que el TAM ha tenido durante los últimos 30 años para el tratamiento y la prevención del cáncer de mama, en la década pasada se empezaron a asociar los efectos del TAM con el incremento en la aparición de cataratas (Breast Health, 1998); cambios en la retina y desprendimiento de ésta, así como el incremento en el riesgo de desarrollar embolias y trombosis ((Cancer Center, 1994; Oncology Group, 1998). También se empezaron a registrar las interacciones del TAM con el aparato reproductivo femenino, por lo que se empezó a asociar con pequeños cambios en los niveles de gonadotropinas, amenorrea, oligomenorrea, promoción del crecimiento de miomas en el útero (Breast Health, 1998), hiperestimulación en los ovarios en mujeres premenopáusicas, lo que ocasionalmente lleva a la producción de quistes; formación de pólipos, crecimiento (Jordan, 1999a) y desarrollo de cáncer de endometrio (Cancer Center, 1994; Barakat, 1999 y Barakat *et al.*, 2001). Además, estudios realizados en animales muestran un posible efecto en el desarrollo sexual, por lo que se piensa que las mujeres con madres que tomaron TAM durante el embarazo, presentan un mayor riesgo en desarrollar cáncer de vagina o cérvix y pueden tener dificultades para procrear (Oncology Group, 1998).

Estudios realizados en mujeres y en animales muestran que el TAM puede inducir la formación de tumores secundarios en otros órganos del cuerpo, como en el hígado (causando toxicidades severas, hepatitis y necrosis) y, en el tracto gastrointestinal (cáncer de colon y carcinomas gástricos) (Cancer Center, 1994; Oncology Group, 1998), pero en ningún caso se ha reportado que incremente la cantidad de cánceres de tipo primario (Wilking *et al.*, 1997), así como hasta ahora no hay evidencia epidemiológica que muestre un aumento de tumores en el hígado de mujeres que están tomando dicho compuesto (White, 1999).

Estudios realizados con diferentes cepas de ratas mostraron que la exposición constante al TAM incrementó la incidencia de tumores hepáticos y aparentemente esto no ocurre a través del mecanismo basado en el receptor de estrógenos, ya que la frecuencia de tumores fue la misma en machos y hembras (White, 1999). Se ha reportado que la inhibición química del citocromo CYP2B, impide la formación de aductos en el ADN causados por el TAM (Stiborová *et al.*, 2002). Los resultados sugieren que las células humanas tienen de forma significativa una menor capacidad para la activación del TAM que las células de roedores (Wogan, 1997).

Una de las vías propuestas para la activación metabólica del TAM incluye la oxidación del 4-hidroxiTAM. Beland y colaboradores (1999) compararon los aductos-ADN formados por el 4-hidroxiTAM y el TAM en ratas y demostraron que el TAM forma dos tipos de aductos en el hígado, en tanto que el 4-hidroxiTAM no lo hace por lo que sugieren que existe otra ruta metabólica principal para la activación del TAM.

TAM induce la formación de aductos en el ADN de ratones (Cai y Wei, 1995) y es un fuerte hepatocarcinógeno en ratas (Busch, 1997). Su mayor metabolito genotóxico es el alfa-C-hidroxiTAM que se forma a partir de la hidroxilación del carbono alfa del grupo etil del TAM (Osborne *et al.*, 1997). Los citocromos P450 hidroxilan al carbono alfa del TAM y en la posición alfa-etil el TAM se une covalentemente con el grupo amino exocíclico de la desoxiguanosina del ADN (N²G Alquilación). El grupo amino de la desoxiamina es un sitio menor de alquilación del ADN por N⁶A alquilación (Wilking *et al.*, 1997; Glatt *et al.*, 1998; Carmichael *et al.*, 1999; Beland *et al.*, 1999). En humanos, este metabolito tiene una gran afinidad para unirse al receptor de estrógenos, unión que es catalizada por los citocromos P450 que se expresan de forma constitutiva.

Estudios realizados con líneas celulares de linfoblastos humanos, las cuales expresan una actividad monooxigenasa elevada asociada con 5 diferentes isoenzimas de los citocromos P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1 o CYP3A4), y con células MCL-5 de humanos, las cuales expresan en cantidades elevadas diversas isoformas de CYP450 (CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4) y de epoxi-hidrolasas, muestran que para que el TAM sea genotóxico, éste requiere ser activado metabólicamente por las monooxigenasas las que generan diversos metabolitos epóxicos (Styles *et al.*, 1994; White, 1999). El TAM y/o sus metabolitos inducen la formación de aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas en ensayos *in vitro* (Styles *et al.*, 1997) e incrementa la formación de micronúcleos proporcionalmente a la dosis administrada (Crofton *et al.*, 1993).

TAM y el Cáncer de Endometrio

Estudios realizados en mujeres con cáncer de endometrio avanzado y recurrente que fueron tratadas con TAM mostraron una toxicidad mínima (Quinn y Campbell, 1989). En 1989 se reportó por primera vez un incremento significativo en el número de carcinomas en el endometrio en mujeres tratadas con TAM como terapia adjunta (Wilking *et al.*, 1997; O'Regan *et al.*, 1998; Peters-Engl *et al.*, 1999). También se observa que el uso de TAM en mujeres con alto riesgo de cáncer de mama incrementa significativamente el riesgo de cáncer de endometrio con una tasa de probabilidades de 1.52-2.3 veces que incrementa con el tiempo de uso (una tasa de probabilidades de 4.06 veces en mujeres tratadas por 5 o más años comparado con mujeres que no lo toman). Además, la terapia de reemplazo con estrógenos, asociada con el empleo de TAM, también eleva significativamente el riesgo de cáncer de endometrio (Bernstein *et al.*, 1999; Van Leeuwen *et al.*, 1994). Otros estudios muestran que 54% de las mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama y en tratamiento con TAM presentan un endometrio ensanchado y frecuentemente con irregularidades múltiples, sugiriendo la presencia de quistes (Bertelli *et al.*, 1998). Varios estudios realizados en mujeres que están tomando TAM indican de manera contundente que el TAM intensifica el

riesgo de cáncer de endometrio, predominantemente en mujeres de 50 años o más (White, 1999).

TAM tiene un comportamiento de carcinogenicidad inusual. En ratas, induce la formación de adenomas y carcinomas hepatocelulares, mientras que en ratones, cricetos y seres humanos no los produce, aunque en el caso de las mujeres aumenta la probabilidad de tener cáncer de endometrio (Shibutani *et al.*, 2000a). También se ha observado que produce aductos en el ADN del hígado de ratas (Wilking *et al.*, 1997; Glatt *et al.*, 1998; Beland *et al.*, 1999; Carmichael *et al.*, 1999).

En mujeres tratadas con TAM como terapia adjunta, se observa que el riesgo de cáncer de endometrio aumenta de 2 a 3 veces (Jordan, 1999b), pero la gran mayoría de los cánceres de endometrio descritos han ocurrido en mujeres postmenopáusicas y los estudios que se han realizado para determinar la relación que existe entre el TAM y este tipo de cáncer apuntan hacia la estimulación de un crecimiento incontrolado del endometrio, *preexistente* al tratamiento con TAM. Esto se apoya en el hecho de que no se habían reportado aductos de ADN en ninguna de las muestras estudiadas o si se reportaban, no había ninguna evidencia de que éstos se formaran como consecuencia del uso del TAM (Carmichael *et al.*, 1999). En el estudio efectuado por Shibutani *et al.*, (2000a), se demuestra la presencia de aductos inducidos por el TAM en el ADN del endometrio en el 50% de las mujeres tratadas, sugiriendo que el mecanismo genotóxico del TAM es el responsable de la carcinogenicidad del endometrio. Afortunadamente, el cáncer de endometrio encontrado en mujeres tratadas con TAM ocasiona síntomas en una etapa temprana, por lo que se puede detectar y tratar a tiempo.

Según Barakat *et al.* (2001), el riesgo anual que presentan las mujeres (principalmente postmenopáusicas) de desarrollar un cáncer de endometrio o de vagina (Oncology Group, 1998) al ser tratadas con TAM es del 2%. Aunque algunos estudios muestran que aparentemente la dosis no juega un papel importante (Jordan, 1999a), hay otros estudios que muestran que el riesgo de desarrollar un cáncer de endometrio aumenta 6.4 veces con dosis diarias de 40 mg de TAM (Barakat *et al.*, 2001). Otras investigaciones advierten que dosis diarias de 0.25 mg de TAM producen un mayor crecimiento en el endometrio que dosis de 0.5 mg, por lo que se sugiere que el uso de concentraciones superiores a los 0.25 mg no promueven el desarrollo de cáncer de endometrio (O'Regan *et al.*, 1998). De cualquier forma, el mayor riesgo se presenta cuando se toma TAM por más de 5 años (Bergman *et al.*, 2000.; Barakat *et al.*, 2001).

Estudios realizados en ratas, a las que se les administró TAM por tres meses, muestran una constante producción de aductos en el ADN de hepatocitos que pueden provocar carcinomas en el hígado cuando el roedor se expone a la acción inductora de

los citocromos P450 por el fenobarbital. Estos resultados son importantes ya que pueden tener importancia para las mujeres que toman TAM profiláctico por largos periodos de tiempo y que están expuestas a inductores de esta familia de enzimas (Carthew *et al.*, 1995)

En 1998, Hukkanen *et al.* demostraron que el endometrio humano tiene el potencial para producir enzimas de los citocromos P450 que forman intermediarios a partir del TAM. En el estudio realizado por Shibutani *et al.* (2000b), se evidencia que hay múltiples factores involucrados en el desarrollo del cáncer de endometrio, como la producción y la eliminación del daño en el ADN. Los resultados obtenidos por estos autores señalan que los aductos de TAM en el ADN del endometrio de mujeres en tratamiento son eliminados pobre o moderadamente por el sistema de escisión de nucleótidos.

Notley *et al.* (2002) proponen que el TAM y su metabolito 4-hidroxiTAM incrementan el cáncer de endometrio de 3 a 6 veces. El mecanismo que lo produce no es claro (Philips, 2001), pero Smith y White (1998) proponen 2 hipótesis: 1) El TAM tiene un efecto agonista parcial en el receptor de estrógeno nuclear que estimula el desarrollo de tumores en el endometrio o, 2) el cáncer encontrado en el endometrio es causado por aductos TAM-ADN

El díptero *Drosophila melanogaster* no tiene receptor de estrógeno, aunque cuenta con un receptor nuclear esteroide, que es un heterodímero que incluye el receptor de la ecdisona y el receptor ultraespiráculo, homólogo al receptor retinoide X. Al utilizar embriones de *Drosophila* transgénicos para el receptor de estrógeno en un sistema reportero con la proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés Green Fluorescent Protein), Thackray *et al.* (2000) demuestran que el TAM puede ejercer su efecto antagónico al estrógeno en las células de los discos imagales del ojo, probando así que algunos co-reguladores y factores de transcripción basal en *Drosophila* son homólogos a muchas proteínas de señalamiento de mamíferos. Sin embargo, sin el receptor de estrógeno, TAM no puede ejercer ningún efecto antagonista o agonista relacionado con él. Por consiguiente, con líneas de *Drosophila* no transgénicas para el receptor de estrógeno, ninguna vía epigenética relacionada con el estradiol o con este receptor puede influir en ensayos *in vivo* o *in vitro* (Wade *et al.*, 2001). Lo anterior nos permite asumir que cualquier evento genotóxico causado por el TAM y que se demuestre a través de SMART en *D. melanogaster* sería consecuencia de la formación de aductos TAM-ADN.

4-óxido 1-nitroquinolina (4-NQO)

El 4-óxido 1-nitroquinolina (4-NQO) (Figura 7) es un carcinógeno y fuerte mutágeno que causa daños en el ADN similares a los que produce la luz UV (dímeros de pirimidina), que son reparados por la escisión de nucleótidos en células humanas normales. Su metabolismo produce el carcinógeno 4-hidroxi aminoquinolina-1-óxido que introduce grupos quinolina en el ADN. Estos aductos se unen principalmente en N²G (50-80%), en el carbono 8 de G y en N⁶A (Friedberg *et al.*, 1995) los cuales son similares a los que origina el TAM (Jones *et al.*, 1989). El metabolismo xenobiótico produce el cancerígeno 4-acetoxi aminoquinolina 1-óxido que reacciona con el ADN y forma 3 aductos de purina: 3-(desoxiguanosina-N2-il)-4-aminopurina 1-óxido (50-80%), N-(desoxiguanosina-C8-il)-4-aminoquinolina 1-óxido y 3-(desoxiadenosina-N6-il)-4-aminoquinolina 1-óxido (Mirzayans *et al.*, 1999). Este carcinógeno ha probado ser genotóxico en la cruce estándar de *Drosophila melanogaster* utilizando la prueba SMART (Graf *et al.*, 1989; Hayatsu *et al.*, 1992; Negishi *et al.*, 1994; Batiste-Alentorn *et al.*, 1995; Kaya *et al.*, 2002).

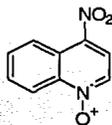


Fig. 7. Fórmula estructural del 4-óxido 1-nitroquinolina (4-NQO)

La *N*-nitrosodimetilamina (DMN) (Figura 8) es un promutágeno que se puede utilizar como testigo positivo para confirmar la presencia de los citocromos P450 de forma regulada, en la cruce estándar de SMART en el ala. La DMN es un agente indirecto, por lo que requiere ser activado metabólicamente y presenta una actividad clastogénica resultado de su reacción con átomos de nitrógeno en el ADN.

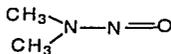


Fig. 8. Fórmula estructural de la *N*-nitrosodimetilamina (DMN).

JUSTIFICACIÓN

La presente investigación forma parte de un proyecto realizado en el Laboratorio de Genética Toxicológica de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM, en donde se valoró la genotoxicidad del TAM y del 4-NQO en las cruzas estándar y de bioactivación elevada de *Drosophila melanogaster* con la prueba SMART en el ala.

Debido al uso amplio de este medicamento en la población humana se consideró importante investigar acerca de su posible genotoxicidad para contribuir de esa manera en la determinación del o de los mecanismos que favorecen el riesgo de cáncer de endometrio en humanos. De forma similar en la que se determinó la genotoxicidad de los antidepresivos tricíclicos en *Drosophila* (Van Schaik y Graf, 1991, 1993) que posteriormente, por estudios epidemiológicos, se correlacionaron positivamente con el cáncer mamario (Sharpe *et al.*, 2002), los resultados obtenidos en este ensayo podrían ayudar a aclarar la controversia sobre la carcinogenicidad del TAM.

OBJETIVOS

- Evaluar el efecto genotóxico del TAM y del 4-NQO en la craza estándar de *Drosophila melanogaster*, mediante la prueba SMART en el ala.
- Inferir con este ensayo *in vivo* que si hay daño en el ADN es independiente del receptor de estrógeno y que sería consecuencia de la formación de aductos TAM-ADN.
- En caso de genotoxicidad positiva del TAM, compararla con la del 4-NQO que es un carcinógeno que produce aductos con el ADN semejantes a los reportados con el TAM.

HIPÓTESIS

- Si el TAM no tiene efecto genotóxico entonces no habrá diferencia en la proporción de manchas que aparecen en el testigo negativo y en los tratamientos experimentales (H₀).
- Si el TAM tiene efecto genotóxico entonces habrá al menos una diferencia en la proporción de manchas entre el testigo negativo y los tratamientos experimentales (H_a).

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Citrato de TAM (TAM), CAS-54965-24-1, 4-óxido 1- nitroquinolina (4-NQO), CAS 56-57-5 de SIGMA, St. Louis, MO, EUA, (donados por Hansjoerg Frei del Institute of Toxicology, Swiss Federal Institute of Technology, ETH, Zurich). *N*-nitrosodimetilamina (DMN) CAS 62-75-9 y tween-80 CAS 9005-65-6 de SIGMA (St. Louis, MO, EUA). Etanol, Merck-Darmstadt, Alemania. Medio Carolina Instantáneo pH 5.6 para *Drosophila* spp., (Fórmula 4-24, Carolina Biological Supply Co. Burlington, EUA). El TAM y el 4-NQO fueron disueltos en una mezcla 1:1 de tween 80 3% : etanol 3%, mientras que el DMN fue disuelto en agua destilada.

Marcadores para la prueba de manchas en las alas

El marcador *mwh*, (*multiple wing hairs*) se localiza en el brazo izquierdo del cromosoma 3 a 0.03 unidades de mapa. Es una mutación autosómica recesiva, en condición homocigota es viable, produce tricomas múltiples en la célula en lugar de un solo tricoma por célula que es el carácter silvestre.

El marcador *flare*³ (*flr*³) se encuentra en el brazo izquierdo del cromosoma 3 a 38.8 unidades de mapa. Es una mutación recesiva que produce tricomas malformados que tienen forma de flama. Los tres alelos mutantes de *flr* son letales en condición homocigota recesiva (Graf, *et al.*, 1996). Debido a lo anterior, para mantener las líneas heterocigotas de este carácter, se tiene una inversión múltiple TM3 en ese cromosoma. Aún cuando el carácter en estado homocigótico es letal, un grupo de células somáticas del ala en las larvas puede expresar la homocigosis y sobrevivir.

El marcador *Bd*⁶ o *Serratia* que porta la inversión múltiple TM3, está localizado en el brazo derecho del cromosoma 3 a 92.5 unidades de mapa es una mutación dominante que produce alas con muescas en la punta, lo cual permite identificar la presencia del marcador *flr*³.

Sistema de Cruzas

Se utilizaron dos líneas de *Drosophila melanogaster* para realizar la cruce estándar. Para ello se colectaron hembras vírgenes *flr*³/TM3, *Bd*⁶ y machos *mwh*/*mwh*. Con esta cruce se obtienen dos tipos de progenie (Figura 9) que se pueden diferenciar fenotípicamente en el estadio adulto por el tipo de alas: alas de tipo silvestre (individuos con marcadores transheterocigóticos *mwh flr*³*/*mwh** *flr*³) y alas con bordes discontinuos de tipo *serratia* (individuos heterocigotos balanceados *mwh flr*³*/*mwh** *flr*³ TM3, *Bd*⁶). La cruce se realizó colocando a las hembras vírgenes *flr*³/TM3,

*Bd*⁶ y machos *mwh* (con relación 2:1 respectivamente) en frascos con hojuelas de papa (Dueñas *et al.*, 2002). La colecta de huevos se realizó en frascos de 250 ml con levadura activada con sacarosa para que las hembras ovopositaran durante 8 horas, manteniendo los frascos a 25° C y a 65% de humedad.

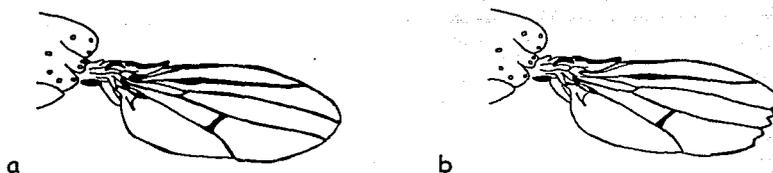


Fig. 9. a) Alas con fenotipo silvestre (MH); b) Alas con fenotipo serratia (BH)

Al pasar 8 horas los progenitores se trasvararon a frascos con Medio Carolina Instantáneo para conservar la cruce. A las 72 horas de haber colectado los huevos, las larvas se separaron de la levadura activada agregando agua corriente a 25° C, con una malla fina de metal. Las larvas se colocaron en tubos de ensayo con 1.5 mg de medio Carolina instantáneo y 2 ml de la solución correspondiente: TAM (0.66, 1.65 y 3.3 mM), DMN (1 y 2 mM) 4-NQO (2.5 y 5 mM). Las concentraciones de TAM utilizadas están por arriba y por debajo de la dosis terapéutica en humanos, la cual es de 20 mg diarios, que corresponde a 2.5 mM. Los testigos concurrentes se trataron solamente con el solvente.

Las larvas completaron su desarrollo en este medio hasta la pupación. Graf y colaboradores (1984) sugieren que la estrategia óptima para el monitoreo de genotoxicidad debe empezar con exposiciones crónicas a las 72 h de edad larvaria hasta la pupación. Para cada tratamiento se hicieron tres a cinco tubos de ensayo en cada uno de los tres experimentos independientes, con un control estricto sobre los factores externos (temperatura, humedad, medio) que pudieran afectar los resultados.

Fijación de los individuos y elaboración de las preparaciones

Una vez que las moscas adultas emergieron, éstas se colocaron en frascos con etanol 70 %. Posteriormente, con ayuda del microscopio estereoscópico se disectaron, de forma independiente, las alas de tipo silvestre y serratia, colocando 5 pares de alas de hembras en la parte superior y 5 pares de alas de machos en la parte inferior de los portaobjetos con la solución de Faure (30 g de goma arábica, 20 ml de glicerol, 50 g hidrato de cloral y 50 ml de agua).

Un número aproximado de 55 individuos o repeticiones por tratamiento fueron analizados (Frei y Würigler, 1995). Se analizaron las superficies dorsal y ventral de las alas de las moscas bajo el microscopio a 400X. Cada mancha se registró tomando en cuenta la sección del ala en la que se encontró (Figura 10), el número de células que la formaban y el tipo de mancha (Graf *et al.*, 1984).

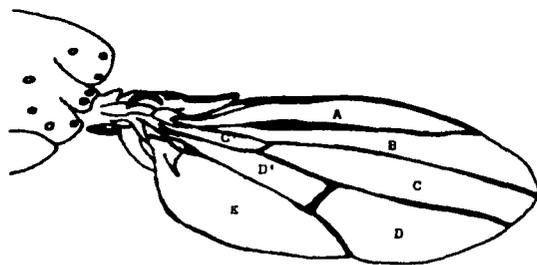


Fig. 10. Secciones del ala de *Drosophila melanogaster*.

Criterios de lectura

Existen tres tipos de manchas que se pueden observar separadamente: manchas simples con fenotipo *mwh*, manchas simples con fenotipo *flr* y manchas gemelas (clon *mwh* adyacente a un clon *flr*) (Figura 11.) Los diferentes tipos de manchas se deben a los diversos mecanismos genotóxicos como eventos mutacionales (mutación puntual, deleciones, tipos específicos de translocación), así como recombinación mitótica entre los dos marcadores y en ocasiones monosomía por no disyunción parcial o total. Las manchas simples son producidas por cualquiera de los eventos descritos mientras que las manchas gemelas se deben exclusivamente a la recombinación somática entre el marcador *flr* y el centrómero del cromosoma 3 (Graf *et al.*, 1984, 1996).

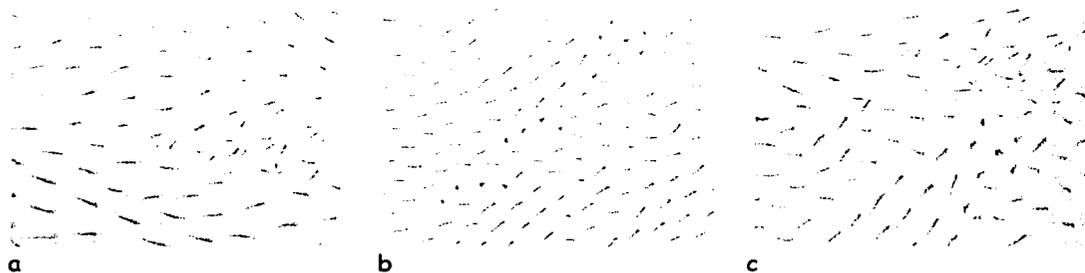


Fig. 11. Tipo de manchas en el ala. a) *mwh*, b) *flr* y c) gemelas.

Con el análisis de los resultados en los dos distintos genotipos $mwh\ flr^{3+}/mwh^+ flr^3$ (transheterocigotos con marcador MH) y $mwh\ flr^{3+}/mwh^+ flr^{3+} TM3, Bc^6$, (heterocigotos con balanceador BH) se puede obtener una determinación cuantitativa relativa de la recombinación somática provocada por las genotoxinas. Tanto los eventos mutacionales como los recombinacionales en individuos MH dan lugar a la formación de manchas simples y gemelas. Mientras que en los individuos balanceados heterocigóticamente (con el cromosoma balanceador $TM3$), no ocurren eventos recombinacionales, por lo que sólo los eventos mutacionales son los que dan lugar a las manchas simples de tipo mwh (Graf, *et al.*, 1996). De ahí que si se sustraen los resultados obtenidos en los individuos con balanceador (BH) de aquéllos con marcador (MH), se puede determinar la proporción recombinagénica *relativa* (Spanó *et al.*, 2001).

Debido a que la mutación mwh tiene una expresividad variable, es posible encontrar en las moscas homocigóticas células que forman 2, 3 o más tricomas. Ya que la temperatura puede inducir la formación de fenocopias en donde se observan 2 tricomas grandes, para evaluar la genotoxicidad sólo se consideran células mwh formadas por tres o más tricomas. Se considera que dos manchas son independientes si éstas están separadas por 3 o más hileras de tricomas normales. Existe una correlación entre el tiempo de inducción de un cambio genético en las células somáticas y el tamaño de las manchas resultantes. Los eventos tempranos producen menos manchas que preferentemente son de tamaño grande, en tanto que los eventos tardíos producen más manchas que en su mayoría son pequeñas (Graf *et al.*, 1984).

Evaluación de los datos

Para el análisis estadístico, las manchas son agrupadas en tres grupos: manchas simples pequeñas de una a 2 células (mwh o flr), manchas simples grandes de 3 o más células (mwh o flr) y manchas gemelas con una área mwh y con una área flr . Las proporción de cada tipo de mancha (simple o gemela) por mosca fueron comparadas (tratamientos contra testigos) utilizando el programa de cómputo SMART, el cual se basa en la prueba de distribución binomial ji cuadrada, con una significancia de $P \leq 0.05$ (Frei y Würigler, 1988). Este análisis permite decidir si los resultados obtenidos tienen un diagnóstico positivo, negativo, débil positivo o sin conclusión con base a las siguientes dos hipótesis:

- La hipótesis nula (H_0) asume que el tratamiento experimental no incrementa de manera significativa la proporción de las mutaciones espontáneas del testigo.
- La hipótesis alterna (H_a) considera *a priori* que un tratamiento determinado incrementa la proporción de mutación por un cierto múltiplo (m) de la proporción obtenida en el testigo. Este factor de multiplicación (m) indica

cuantas veces debe incrementarse el número de eventos de los tratamientos con respecto al testigo para considerar una respuesta positiva (Frei y Würigler, 1988).

Debido a que las manchas pequeñas son más comunes que las manchas grandes y gemelas, es necesario evaluar los datos de forma independiente para evitar la sobreestimación en la inducción de las manchas menos comunes. Por lo que para considerar un incremento significativo en la proporción de las manchas pequeñas y totales se utiliza un factor de multiplicación $m = 2$; para las manchas grandes y gemelas, el factor de multiplicación es $m = 5$ (Frei y Würigler, 1988):

Por lo tanto:

1. Si se acepta la hipótesis nula (H_0) y se rechaza la hipótesis alterna (H_a), entonces el resultado es **negativo**.
2. Si se rechaza H_0 y se acepta H_a , el resultado es **positivo**.
3. Si se acepta H_a cuando H_0 es verdadera (es decir, cuando el resultado está muy cerca del área de rechazo), el resultado es **débil positivo**.
4. Si se acepta H_a o H_0 cuando es falsa o si se rechaza H_a o H_0 cuando es verdadera (este resultado se presenta cuando el tamaño de la muestra es muy pequeño), el resultado es **sin conclusión**.

Cuando ciertos valores de *SMART* son débiles positivos o sin conclusión, se discrimina la variación individual, utilizando *SMART* con la prueba de U no-paramétrica de Mann, Whitney y Wilcoxon de dos colas (la cual evalúa resultados significativos estadísticamente por arriba y por debajo de los valores del testigo) como lo recomiendan Frei y Würigler (1995). Con esta prueba se obtienen resultados estadísticamente significativos o no significativos. Cuando éstos son significativos, nos indican que el agente químico es genotóxico, mientras que los resultados no significativos pueden deberse a que el agente no es genotóxico y/ o no existen datos suficientes para determinar la genotoxicidad.

La proporción en la formación de clones dependiente de la concentración fue determinada en las regresiones lineales para los fenotipos MH y BH. Las diferencias entre las pendientes de las dos regresiones proporcionó una *medida relativa* de la actividad recombinagénica a la genotoxicidad de los agentes químicos (Spanó *et al.*, 2001).

RESULTADOS

En las tablas 1, 2 y 3 se pueden observar las proporción estadísticas de las manchas inducidas (manchas pequeñas y grandes simples, gemelas y totales) por los diferentes agentes en ambos fenotipos: marcador transheterocigoto (MH) y balaceador heterocigoto (BH) obtenidas con la prueba SMART. La evaluación estadística de los resultados se realizó comparando los agentes con sus respectivos testigos.

Tabla 1. Significancia estadística de las manchas inducidas en el ala por el citrato de TAM en ambos fenotipos (marcador transheterocigoto $mwh\ flr^{2+}/mwh'\ flr^{2-}$ (MH) y balaceador heterocigoto $mwh\ flr^{2+}/mwh'\ flr^{2-} TM3, Bd^c$ (BH) de la cruz estándar.

Fenotipos ^a	Concentraciones (mM)	No. de individuos (N)	Diagnóstico estadístico de manchas por individuo (No. de manchas) ^a				Clones totales mwh (n)	Tamaño promedio de los clones mwh (No. cel)	Frecuencia de inducción de clon (10^5 células por división celular)	
			Manchas pequeñas (1-2 células) ^c m = 2	Manchas grandes (>2 células) ^c m = 5	Manchas gemelas m = 5	Total de manchas m = 2			Sin corrección de tamaño ^d (n/NC)	Con corrección de tamaño ^d (2^{1-2})x (n/NC)
MH	(Tween -OH) 0	56	0.89(50)	0.11(6)	0.05(3)	1.05(59)	59	1.56	4.3	
	TAM 0.66	50	0.78(39)*	0.18(9)-	0.02(1)-	0.98(49)-	49	1.78	4.0	-0.3
	1.66	56	1.00(56)*	0.32(18)*	0.04(2)-	1.36(76)*	73	2.00	5.3	1.0
	3.33	73	0.89(65)*	0.22(16)*	0.04(3)-	1.15(84)*	82	1.93	4.6	0.3
BH ^e	(Tween -OH) 0	37	0.43(16)	0.03(1)		0.46(17)	17	1.35	1.9	
	TAM 0.66	60	0.33(20)-	0.02(1)-		0.35(21)-	21	1.38	1.4	-0.4
	1.66	22	0.68(15)*	0.00(0)-		0.68(15)-	15	1.13	2.8	0.9
	3.33	42	0.83(35)*	0.12(5)-		0.95(40)*	40	1.52	3.9	2.0

^a Se aplicó SMART con la prueba de U (Mann-Whitney) para dos colas (* = * = 0.05), por lo tanto (*) son valores significativos estadísticamente que están por arriba del testigo; (o) valores significativos estadísticamente por debajo del testigo; (-) valores no significativos estadísticamente.

^b MH: alas con marcador transheterocigoto; BH: alas con balaceador heterocigoto.

^c Incluyendo las escasas manchas tipo flr^{2-}

^d Proporción de manchas por mosca dividida por el número de células examinadas (48,800); Frecuencia de formación estimada por célula y por división celular en experimentos de exposición crónica (Frei y Würigler, 1995).

^e Sólo las manchas mwh pueden ser observadas en las alas con genotipo $mwh/TM3$ heterocigoto debido a que el cromosoma balaceador $TM3$ no transmite mutaciones flr .

Tabla 2. Significancia estadística de las manchas inducidas en el ala por el 4-NQO en ambos fenotipos (marcador transheterocigoto $mwh\ flr^{2+}/mwh'\ flr^{2-}$ (MH) y balaceador heterocigoto $mwh\ flr^{2+}/mwh'\ flr^{2-} TM3, Bd^c$ (BH) de la cruz estándar.

Fenotipos ^a	Concentraciones (mM)	No. de individuos (N)	Diagnóstico estadístico de manchas por individuo (No. de manchas) ^a				Clones totales mwh (n)	Tamaño promedio de los clones mwh	Frecuencia de inducción de clon (10^5 células por división celular)	
			Manchas pequeñas (1-2 células) ^c m = 2	Manchas grandes (>2 células) ^c m = 5	Manchas gemelas m = 5	Total de manchas m = 2			Sin corrección de tamaño ^d (n/NC)	Con corrección de tamaño ^d (2^{1-2})x (n/NC)
MH	(Tween -OH) 0	56	0.89(50)	0.11(6)	0.05(3)	1.05(59)	59	1.56	4.3	
	4-NQO 2.5	70	1.71(120)*	1.59(111)*	0.50(35)*	3.80(266)*	250	2.69	14.7	10.3
	5	68	1.76(120)*	2.00(136)*	0.84(57)*	4.60(313)*	280	2.90	16.9	12.6
BH ^e	(Tween -OH) 0	37	0.43(16)	0.03(1)		0.46(17)	17	1.35	1.9	
	4-NQO 2.5	18	0.83(15)*	0.39(7)*		1.22(22)*	22	2.18	5.0	3.1
	5	28	1.96(55)*	1.14(32)*		3.11(87)*	86	2.28	12.6	10.7

^a Se aplicó SMART con la prueba de U (Mann-Whitney) para dos colas (* = * = 0.05), por lo tanto (*) son valores significativos estadísticamente que están por arriba del testigo; (-) valores no significativos estadísticamente.

^b MH: alas con marcador transheterocigoto; BH: alas con balaceador heterocigoto.

^c Incluyendo las escasas manchas tipo flr^{2-}

^d Proporción de manchas por mosca dividida por el número de células examinadas (48,800); Proporción de formación estimada por célula y por división celular en experimentos de exposición crónica (Frei y Würigler, 1995).

^e Sólo las manchas mwh pueden ser observadas en las alas con genotipo $mwh/TM3$ heterocigoto debido a que el cromosoma balaceador $TM3$ no transmite mutaciones flr .

Tabla 3. Significancia estadística de las manchas inducidas en el ala por el DMN en ambos fenotipos (marcador transheterocigoto *mwh flr³/mwh⁺ flr³* (MH) y balanceador heterocigoto *mwh flr³/mwh⁺ flr³ TM3, Bd²* (BH) de la cruz estándar:

Fenotipo ^b	Concentraciones (mM)	No. de individuos (N)	Diagnóstico estadístico de manchas por individuo (No. de manchas) ^a				Clones totales <i>mwh</i> (n)	Tamaño promedio de los clones <i>mwh</i>	Frecuencia de inducción de clon (10 ³ células por división celular)	
			Manchas pequeñas (1-2 células) ^c m = 2	Manchas grandes (>2 células) ^c m = 5	Manchas gemelas m = 5	Total de manchas m = 2			Sin corrección de tamaño ^d (n/NC)	Con corrección de tamaño ^d (2 ⁻¹)X (n/NC)
MH	(Aqua) 0	73	0.48(35)	0.10(7)	0.03(2)	0.60(44)	44	1.84	2.5	
	DMN 1	54	6.72(363)+	2.70(146)+	0.59(32)+	10.0(541)+	517	2.11	39.3	36.8
	2	11	9.73(107)+	1.73(19)+	0.55(6)+	12.0(132)+	121	1.72	45.1	42.7
BH ^e	(Aqua) 0	55	0.33(18)	0.05(3)		0.38(21)	21	2.05	1.6	
	DMN 1	32	4.47(143)+	1.00(32)+		5.47(175)+	175	1.81	22.4	20.9
	2	17	8.12(138)+	1.06(18)+		9.18(156)+	153	1.57	36.9	35.4

^a Se aplicó SMART con la prueba de U (Mann-Whitney) para dos colas (* = * = 0.05), por lo tanto (+) son valores significativos estadísticamente que están por arriba del testigo; (-) valores no significativos estadísticamente.

^b MH: alas con marcador transheterocigoto; BH: alas con balanceador heterocigoto.

^c Incluyendo las escasas manchas tipo *flr³*

^d Proporción de manchas por mosca dividida por el número de células examinadas (48,800): Frecuencia de formación estimada por célula y por división celular en experimentos de exposición crónica (Frei y Würzler, 1995).

^e Sólo las manchas *mwh* pueden ser observadas en las alas con genotipo *mwh/TM3* heterocigoto debido a que el cromosoma balanceador *TM3* no transmite mutaciones *flr*.

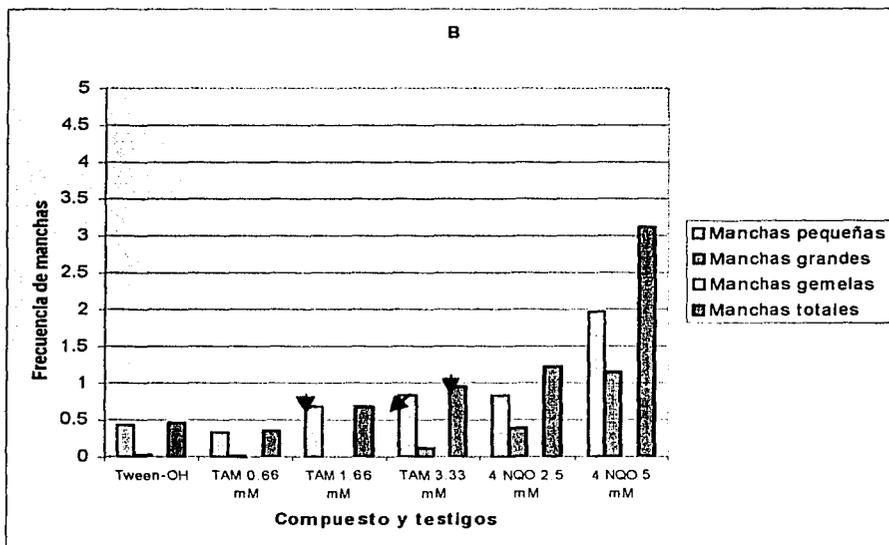
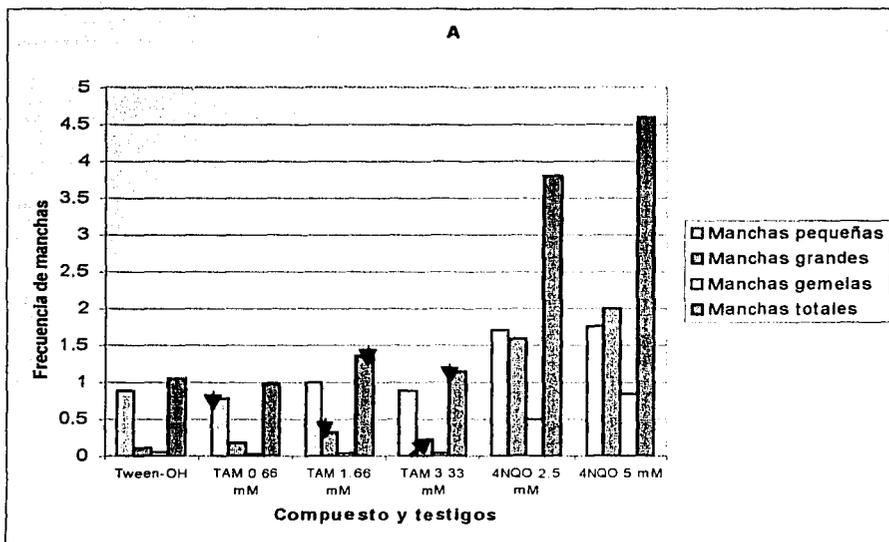
Con base en la frecuencia de clones *mwh*, se calculó la frecuencia de formación de clones por célula y división celular con y sin corrección (Tablas 1, 2 y 3). Estas frecuencias de formación de clones sin corregir se utilizaron para determinar la actividad recombinagénica *relativa* del TAM, 4-NQO y DMN. Se calcularon las regresiones lineales y basándose en sus pendientes, se estimó el porcentaje de recombinación *relativa* de cada agente (Tabla 4) (Spanó *et al.*, 2001).

Table 4. Valores de regresión de la frecuencia de inducción de clones *mwh* por concentración (mM) y porcentaje de eventos recombinagénicos.

Agentes	Marcador Transheterocigoto (MH)			Balanceador Heterocigoto (BH)			% Rec*
	A ₁	B ₁	r ²	A ₂	B ₂	r ²	
TAM	0.009	0.181	0.240	-0.286	0.688	0.941	-2.80
4-NQO	1.333	2.52	0.881	-0.75	2.14	0.994	15.1
DMN	5.15	21.35	0.851	1.066	17.70	0.989	17.1

A₁ y A₂, intersección en el eje y; B₁ y B₂, pendientes; r², coeficiente de determinación
Porcentaje de eventos recombinagénicos = (B₁ - B₂) / B₁ (Spanó *et al.*, 2001).

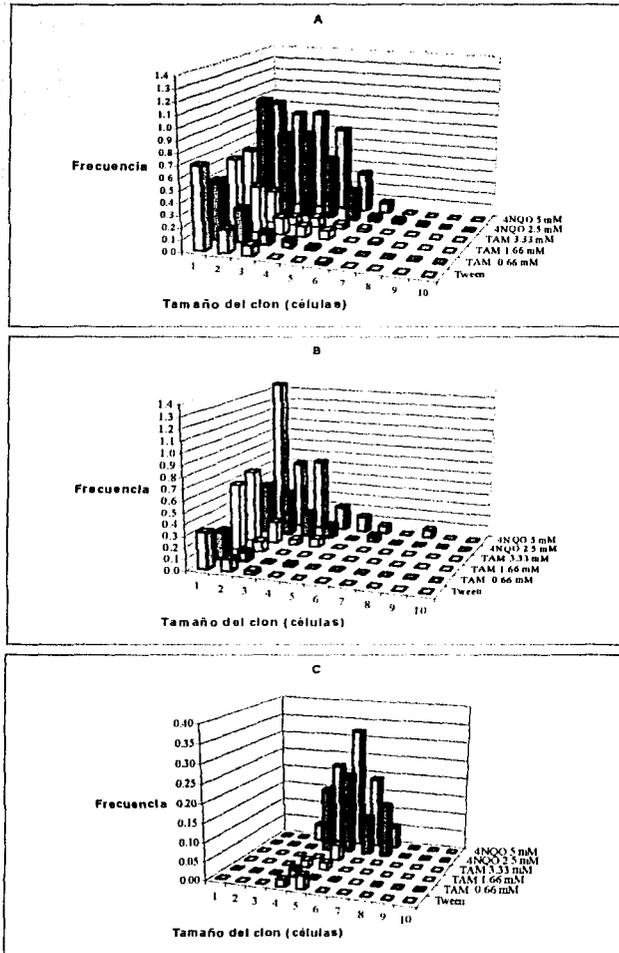
En la figura 12 se muestra la proporción de manchas por individuo obtenida después de tratar de forma crónica a larvas con TAM y 4-NQO. La distribución de clones *mwh* y de manchas gemelas por individuo se muestra en las figuras 13 (TAM y 4-NQO) y 15 (DMN), en tanto que la proporción de manchas por individuo obtenida en los tratamientos con DMN se muestra en la figura 14.



▼ Significancia estadística

Fig. 12. Frecuencias de manchas por individuo después de tratamientos crónicos con diferentes concentraciones de TAM y 4-NQO. A) Fenotipo MH y B) Fenotipo BH.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



El tamaño del clon está representado por clases, donde la clase 1 representa el tamaño más pequeño posible (1 célula), la clase 2 representa 2 células, clase 3: 3-4 células, clase 4: 5-8 células, clase 5: 9-16 células, clase 6: 17-32 células, clase 7: 33-64 células, clase 8: 65-128 células, clase 9: 129-256 células y clase 10: >256 células.

Fig 13. Distribución de clones *mwh* y manchas gemelas por individuo después de tratamientos crónicos con diferentes concentraciones de TAM y 4-NQO Clones *mwh*: A) fenotipo MH y B) fenotipo BH; Manchas gemelas: C) fenotipo MH.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

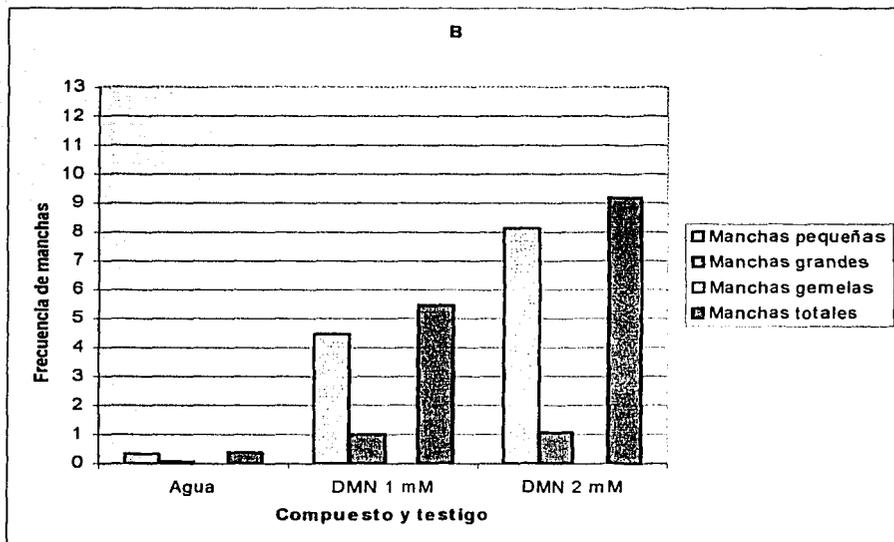
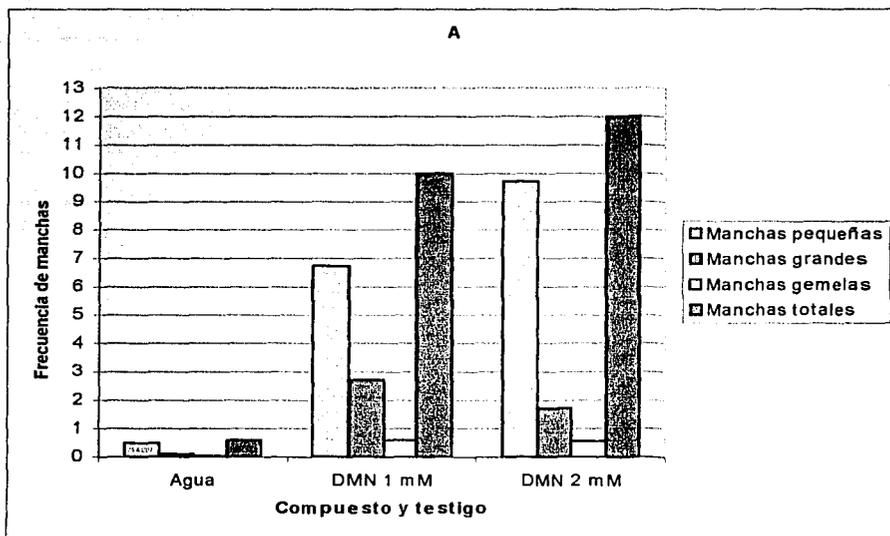
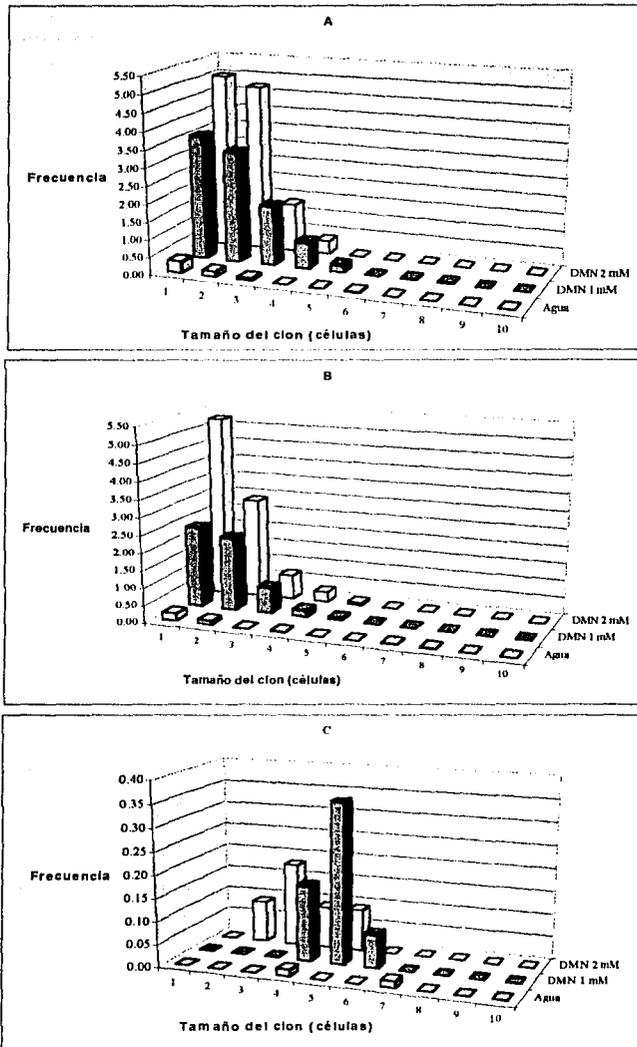


Fig 14. Frecuencias de manchas por individuo después de tratamientos crónicos con diferentes concentraciones de DMN. A) Fenotipo MH y B) Fenotipo BH.



El tamaño del clon está representado por clases, donde la clase 1 representa el tamaño más pequeño posible (1 célula), la clase 2 representa 2 células, clase 3: 3-4 células, clase 4: 5-8 células, clase 5: 9-16 células, clase 6: 17-32 células, clase 7: 33-64 células, clase 8: 65-128 células, clase 9: 129-256 células y clase 10: >256 células.

Fig 15. Distribución de clones *mwh* y manchas gemelas por individuo después de tratamientos crónicos con diferentes concentraciones de DMN. Clones *mwh*: A) fenotipo MH y B) fenotipo BH; Manchas gemelas: C) fenotipo MH.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

Tamoxifen

Las 3 concentraciones de TAM (0.66, 1.66 y 3.33 mM) se compararon con su testigo negativo el disolvente Tween-OH. Como los resultados arrojados por SMART fueron débiles o sin conclusión, se realizó la prueba de U no paramétrica de Mann-Whitney. En la tabla 1 se observa que el TAM dio resultados estadísticamente significativos en las proporciones de manchas grandes y totales por mosca en las dos concentraciones más altas en el fenotipo MH y en la concentración más alta en el fenotipo BH.

Como se puede ver en la Figura 12 (A) y (B), la mayoría de las manchas fueron pequeñas (de 1 a 2 células) para ambos fenotipos lo que nos indica que el cambio genético inducido se llevó al cabo en una etapa tardía del desarrollo. En MH (Figura 12 A), la concentración 0.66 mM tuvo una proporción de manchas pequeñas (0.78) inferior a la del testigo (0.89) lo que se podría explicar considerando que a dosis muy bajas, se han demostrado otros efectos del TAM, como la inhibición del estrés oxidante que provoca la disminución del cambio espontáneo (Bhimani *et al.*, 1993) o la inducción del metabolismo xenobiótico (Moorthy *et al.*, 1997). En MH la proporción de manchas grandes fue significativamente superior a la del testigo en las dos concentraciones más altas, lo cual incidió en la significancia para totales con estas dos concentraciones. Por lo tanto estos resultados no indican una curva respuesta clara. En BH (1.66 y 3.33 mM) los resultados que se obtuvieron son significativos para manchas pequeñas, pero sólo incidieron para una significancia en totales en la concentración 3.3 mM (Figura 12 B).

La distribución de clones *mwh* (en MH y BH) y gemelas (sólo en MH) se muestran en la figura 13. El tamaño de las clases representa el número de ciclos de división celular que ocurrieron entre el tiempo de inducción del clon en las células de los discos imagales en la larva y el comienzo de la diferenciación del ala. Al comparar las gráficas A y B de la figura 13, se observa que existe cierta similitud en la distribución, pero es posible distinguir clones *mwh* más grandes en MH que en BH. El tamaño de los clones *mwh* en las moscas BH siempre es más pequeño que en las moscas MH. Frei y colaboradores (Frei *et al.*, 1992; Frei y Würigler, 1996) indican que esto puede explicarse por aneuploidía parcial inducida que provoca una reducción en la capacidad de proliferación.

En la figura 13 C se muestra la distribución de las manchas gemelas en donde la mayoría tienen un tamaño de 5 a 16 células. Esto se debe básicamente a que el marcador *flr* generalmente no se expresa en clones pequeños y aunque en principio las

manchas gemelas son atribuidas exclusivamente a la recombinación. Su proporción de recuperación es inadecuada para determinar la actividad recombinagénica de un agente químico debido a que manchas gemelas pequeñas no pueden ser identificadas fácilmente, pudiendo ser confundidas con manchas pequeñas simples *mwh*. Esto coincide con lo reportado previamente, por lo cual para tener una determinación apropiada, ésta debe basarse en la proporción de clones *mwh* incluidos en las manchas simples y gemelas inducidas en moscas MH y BH (Spanó *et al.*, 2001).

Al calcular el porcentaje de recombinación del TAM, de acuerdo con la metodología ya descrita, se obtuvo un valor de -2.80, lo que siendo una *medida relativa* de la recombinación indica una tendencia a la presencia de eventos mutagénicos únicamente con este agente químico, lo cual se refuerza con la poca presencia de manchas gemelas (Figura 13 C).

Debido a que *Drosophila melanogaster* no tiene receptor de estrógeno, no es posible que el daño producido en el ADN haya sido causado por ninguna vía relacionada con este receptor. Las características lipofílicas del TAM y sus metabolitos indican que éstos se pueden difundir dentro de la célula y alcanzar la cromatina nuclear (Elkattan *et al.*, 2001). Por lo anterior, la genotoxicidad del TAM puede ser explicada con base a la formación de aductos ADN-TAM y coincide con la hipótesis propuesta por Smith y White (1998).

4-NQO

Al igual que en estudios anteriores (Graf *et al.*, 1989; Hayatsu *et al.*, 1992; Negishi *et al.*, 1994; Batiste-Alentorn *et al.*, 1995; Kaya *et al.*, 2002), el análisis con SMART dio resultados con significancia estadística para este agente. En la tabla 2 se aprecia que existe una gran diferencia entre los resultados del testigo y los de ambas concentraciones del 4-NQO en ambos fenotipos. Las proporciones obtenidas están aumentadas significativamente y todos los resultados son significativos. Al comparar las gráficas A y B de la Figura 12, se nota que hay más manchas en los individuos MH que en las moscas BH y que la mayoría fueron manchas pequeñas, excepto en la concentración 5 mM para los individuos MH, donde la mayoría fueron manchas grandes. La distribución de clones *mwh* mostradas en las gráficas A y B de la figura 13, muestra que la mayoría de las manchas están constituidas por 1 a 32 células en ambos fenotipos y en la gráfica C, la mayor parte de las manchas gemelas obtenidas con el 4-NQO están constituidas por 5 a 64 células lo cual contrasta con los clones obtenidos con el TAM cuyo tamaño va de 5 a 16 células.

Estos resultados muestran de forma evidente que el 4-NQO es más genotóxico que el TAM, y que las diferencias existentes en las proporciones de las manchas gemelas se

deben a que el 4-NQO actúa a menor edad larvaria. Con el TAM no hubo una gran producción de manchas gemelas, mientras que con ambas concentraciones del 4-NQO sí las hubo, lo que nos indica además la presencia de actividad recombinagénica. Los resultados logrados al calcular las regresiones del 4-NQO muestran que en la cruce estándar éste presenta una tendencia de 17.1 % de recombinación y 84.9% de mutación somáticas (Tabla 4).

DMN

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos con las diferentes concentraciones del testigo positivo y como era de esperarse fueron significativos estadísticamente. En la Figura 14, es posible observar que la mayoría de las manchas fueron pequeñas lo cual era de esperarse ya que el DMN es un promutágeno que tiene que ser activado por el metabolismo xenobiótico. Al comparar estos resultados con los encontrados con el TAM y el 4-NQO, se puede ver que la DMN tuvo más manchas totales y más manchas pequeñas que grandes, de la misma manera que Kawai (1998) y Rodríguez-Arnaiz *et al.*, (1996) lo demostraron. En la figura 15, al comparar la distribución de clones *mwh* en las gráficas A y B, se aprecia que ésta es muy similar, pero con mayor proporción en MH y que la mayoría de las manchas son de una o dos células en ambos fenotipos. También se ve que las manchas gemelas se distribuyen en clones de 2 a 32 células, aunque la mayoría tiene un tamaño de 3-4 células para la concentración 2 mM y de 9-16 células para la concentración 1 mM.

Los resultados obtenidos al calcular las regresiones lineales indican una tendencia de 82.9% de mutación y 17.1% de recombinación somáticas para el DMN (Tabla 4). Estos resultados difieren con los descritos por Rodríguez-Arnaiz *et al.*, (1996) quienes obtuvieron 67% de recombinación somática. Esto puede explicarse a que en el trabajo realizado por Rodríguez-Arnaiz *et al.*, (1996) las regresiones fueron hechas con diferentes concentraciones (0, 0.25, 0.5 y 1 mM), mientras que en el presente trabajo fueron mayores (0, 1 y 2 mM). Por otra parte, el tamaño de las muestras fue diferente, ya que en este trabajo se examinaron 54 individuos MH y 32 individuos BH, mientras que en el otro se analizaron 12 individuos MH y 21 individuos BH, lo cual pudo influir en los resultados (Frei y Würigler, 1995). Debido a que el tamaño promedio de clones *mwh* para el testigo agua es el mismo en ambos trabajos, se descarta la idea de que otros factores no controlados hayan influido en los resultados con el DMN.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este ensayo *in vivo* en la cruce estándar de *Drosophila melanogaster* muestran que para el fenotipo MH, las concentraciones 1.66 y 3.33mM y para el fenotipo BH, la concentración 3.33 mM del TAM son estadísticamente significativas, confirmando así la genotoxicidad de este agente químico, aún cuando la respuesta con relación a la dosis no es clara.

Ambas concentraciones del 4-NQO en ambos fenotipos fueron estadísticamente significativas.

El análisis de la tendencia *relativa* hacia eventos recombinagénicos mostró al TAM como un agente mutagénico y al 4-NQO con una importante actividad tanto recombinagénica como mutagénica.

Debido a que *Drosophila melanogaster* no tiene receptor de estrógeno, los eventos genotóxicos causados por el TAM deben ser consecuencia de la formación de aductos TAM-ADN.

Este ensayo *in vivo* con *Drosophila melanogaster* dio resultados estadísticamente significativas para el TAM, lo cual es importante considerando que este modelo biológico ha mostrado tener algunos co-reguladores y factores de transcripción basales homólogos a las proteínas de señalamiento de muchos mamíferos (Thackray *et al.*, 2000).

Se encontró la siguiente relación genotóxica entre los agentes utilizados en este ensayo: DMN > 4-NQO > TAM, en la que los resultados de genotoxicidad del TAM difieren con los del 4-NQO, ya que este último es claramente genotóxico en todas las concentraciones, en ambos fenotipos y con valores superiores.

Los resultados obtenidos en este bioensayo contribuyen a tener un mejor entendimiento sobre la posible participación del TAM por formación de aductos TAM-ADN para incrementar el cáncer de endometrio.

REFERENCIAS

Adams MD, Celniker SE y Holt RA. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 2000; **287**: 2185-2195.

Barakat RR. Endometrial cancer and tamoxifen. *Primary Care and Cancer* 1999; **19** Supl 1: 27-30.

Barakat RR, Greven K, Markman M, Thigpen JT. Endometrial cancer. En: Pazdur R, Coia LR, Hoskins WJ, Wagman LD. *Cancer management: A multidisciplinary approach*. 5a. Ed. Nueva York, PRR, Inc.; 2001; Capítulo 21, p. 389-407.

Batiste-Alentorn M, Xamena N, Creus A, Marcos R. Genotoxic evaluation of ten carcinogens in the *Drosophila* wing spot test. *Experientia* 1995; **51**, 73-76.

Beland FA, McDaniel LP y Marques MM. Comparison of the DNA adducts formed by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen *in vivo*. *Carcinogenesis* 1999; **20**, 471-477.

Bergman L, Beelen MLR, Gallee MPW, Hollema H, Benraad J y Van Leeuwen FE. The comprehensive cancer centers. ALERT Group. Risk and prognosis of endometrial cancer after tamoxifen for breast cancer. *Lancet* 2000; **356**, 881-887.

Bernstein L, Deapen D, Cerhan JR, Schwartz SM, Liff J, McGann-Maloney E, Perlman JA y Ford L. Tamoxifen therapy for breast cancer and endometrial cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 1999; **91**, 1654-1662.

Bertelli G, Venturini M, Del Mastro L, Garrone O, Cosso M, Gustavino C, Cusimano E, Guido T, Nicolo G, Rosso R. Tamoxifen and the endometrium: findings of pelvic ultrasound examination and endometrial biopsy in asymptomatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1998; **47**, 41-46.

Bhimani RS, Troll W, Grunberg D y Frenkel K. Inhibition of oxidative stress in HeLa cells by chemopreventive agents. *Cancer Res* 1993; **53**, 4528-4533.

Breast Health [en línea] 1998. Tamoxifen as a treatment for breast cancer [fecha de acceso 1 de Julio de 1999]; disponible en:
<http://www.breastcancerinfo.com/bhealth/html/tamoxifen.asp>

Busch H. Adducts and tamoxifen. *Semin Oncol* 1997; **24**, S1-98 - S1-104.

Cai Q y Wei YH. *In vivo* formation of DNA-adducts in mouse skin DNA by tamoxifen. *Cancer Lett* 1995; **92**, 187-192.

Cancer Center [en línea] 1994. Tamoxifen Warning: Increased risk of cancer of the uterus. University of Pennsylvania [fecha de acceso 19 de enero de 1999]; disponible en: http://oncolink.org/cancer_news/1994/tamox.html

CancerWeb [en línea] 1998. Questions and answers about tamoxifen. CancerNet from the National Cancer Institute. [fecha de acceso 7 de Julio de 1999]; disponible en: <http://www.graylab.ac.uk/cancernet/600716.html>

Carmichael PL, Sardar S, Crooks N, Neven P, Van Hoof I, Vgumadu A, Bourne TY, Tomas E, Hellberg P, Hewer AJ y Phillips DH. Lack of evidence from HPLC 32P-Post-labelling for tamoxifen-DNA adducts in the human endometrium. *Carcinogenesis* 1999; **20**, 339-342.

Carthew P, Martin EA, White IN, De Matties F, Edwards RE, Dorman BM, Heydon RT, Smith LL. Tamoxifen induces short-term cumulative DNA damage and liver tumours in rats: promotion by phenobarbital. *Cancer Res* 1995; **55**, 544-547.

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

Crofton-Sleigh C, Doherty A, Ellard S, Parry EM, Venitt S. Micronucleus assays using cytochalasin-blocked MCL-5 cells, a proprietary human cell line expressing five human cytochromes P-450 and microsomal epoxide hydrolase. *Mutagenesis* 1993; **8**, 363-372.

Dean R. Toxicology in: Water reuse. Problems and solutions. EUA. Academic Press. 1981. 264 p.

Delgado-Rodríguez A, Ortíz-Marttelo R, Villalobos-Pietrini R, Gómez-Arroyo S y Graf U. Genotoxicity of organic extracts of airborne particles in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere* 1999; **39**, 33-44.

Dueñas IE, Heres ME, Castañeda PL y Graf U. Easy raising of *Drosophila melanogaster* on a medium consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. *Dros Inf Serv* 2002; **84**, 166.

El-Kattan AF, Asbill CS, Kim N y Michniak BB. The effects of terpene enhancers on the percutaneous permeation of drugs with different lipophilicities. *Int J Pharm* 2001; **215**, 229-240.

Frei H y Würgler FE. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila melanogaster* indicates a positive, negative or inconclusive result. *Mutat Res* 1988; **203**, 297-308.

Frei H, Clements J, Howe D, y Würgler FE. The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 1992; **279**, 21-33.

Frei H y Würgler FE. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 1995; **334**, 247-258.

Frei H y Würgler FE. Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis* 1996; **11**, 315-325.

Frei H, Graf U y Würgler FE. Induced loss of heterozygosity in somatic cells of *Drosophila melanogaster* is a sensitive indicator of genotoxicity. *Toxicology letters* 1998; **95**, 43.

Friedberg EC, Walker GC y Siede W. DNA repair and mutagenesis. Washington, D.C. ASM Press, 1995. 42 p.

Frölich A y Würgler FE. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res* 1989; **216**, 179-187.

Glatt H, Davis W, Meini W, Hermersdofer H, Venitt S y Phillips DH. Rat, but not human, sulfotransferase activates a tamoxifen metabolite to produce DNA adducts and gene mutations in bacteria and mammalian cells in culture. *Carcinogenesis* 1998; **19**, 1709-1713

Graf U, Würgler FE, Katz AJ, Frei H, Huon H, Hall CB y Kale PG. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen* 1984; **6**, 153-188.

Graf U, Frei H, Katz AJ y Würgler FE. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res* 1989; **222**, 359-373

Graf U, Moraga AA, Castro R y Carrillo ED. E. Genotoxicity testing of different types of beverages in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. *Food Chem Toxicol* 1994; **32**, 423-430.

Graf U. 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 of *Drosophila melanogaster*. *Experientia* 1995; **51**, 168-173.

Graf U, Spanó MA, Guzmán Rincón J, Abraham SK y de Andrade HH. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. *Afr Newslett on Occup Health and Safety* 1996; **6**, 9-13

Guzmán Rincón J, Espinoza J y Graf U. Analysis of the *in vivo* nitrosation capacity of the larvae used in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 1998; **412**, 69 - 81.

Hällström I, Magnussom J y Ramel C. Relation between the somatic toxicity of dimethylnitrosamine and a genetically determined variation in the level and induction of cytochrome P-450 in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 1982; **92**, 161-168.

Hayatsu H, Inada N, Kafutani T, Arimoto S, Negishi T, Mori K, Okuda T y Sakata I. Suppression of genotoxicity of carcinogens by (-)-epigallocatechin gallate. *Prev Med* 1992; **21**, 370-376.

Hukkanen J, Mantyla M, Kangas L, Wirta P, Hakkola J, Paakki P, Evisalmi S, Pelkonen O y Raunio H. Expression of cytochrome P450 genes encoding enzymes active in the metabolism of tamoxifen in human uterine endometrium. *Pharmacol Toxicol* 1998; **82**, 93-97.

Jones CJ, Edwards SM y Waters R. The repair of identified large DNA adducts induced by 4-nitroquinoline- 1-oxide in normal or *xeroderma pigmentosum* group A human fibroblasts, and the role of DNA polymerases alpha or delta. *Carcinogenesis* 1989; **10**, 1197-1201.

Jordan VC. Tamoxifen for the treatment and prevention of breast cancer. Nueva York, EUA. PPR Inc., 1999a. 309 p.

Jordan VC. Targeted antiestrogens to prevent breast cancer. *Trends Endocrinol Metab* 1999b; **10**, 312-317.

Kawai K. Enhancement of the DNA damaging activity of N-nitrosodimethylamine by di(2-ethylhexyl)phthalate in somatic cells *in vivo* of *Drosophila melanogaster*. *Biol Pharm Bull* 1998; **21**, 579-582.

Kaya B, Creus A, Velazquez A, Yaniko A y Marcos R. Genotoxicity is modulated by ascorbic acid. Studies using the wing spot test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 2002; **520**, 93-101.

McClellan P [en línea] 1999a [fecha de acceso 22 de febrero de 2001]; disponible en: <http://www.ndsu.nodak.edu/instruct/mcclellan/plsc431/mutation/mutation1.html>

McClellan P [en línea] 1999b [fecha de acceso 22 de febrero de 2001]; disponible en: <http://www.ndsu.nodak.edu/instruct/mcclellan/plsc431/mutation/mutation2.html>

Mirzayans R, Bashir S, Murray D y Paterson MC. Inverse correlation between p53 protein levels and DNA repair efficiency in human fibroblast strains treated with 4-nitroquinoline 1-oxide: evidence that lesions other than DNA strand break trigger the p53 response. *Carcinogenesis* 1999; **20**, 941-946.

Mitchell I y Combes R. Mutation test with the fruit fly *Drosophila melanogaster*. Mutagenicity testing a practical approach. UK. IRL Press, 1984. 149-155 pp.

Moorthy B, Sriram P, Randerath E y Randerath K. Effects of cytochrome P450 inducers on tamoxifen genotoxicity in female mice *in vivo*. *Biochem Pharmacol* 1997; **53**, 663-669.

Negishi T, Nakano H, Kitamura A, Itome Ch, Shiotani T y Hayatsu H. Inhibitory activity of chlorophyllin on the genotoxicity of carcinogens in *Drosophila*. *Cancer Lett* 1994; **83**, 157-164.

Notley LM, De Wolf CJ, Wunsch RM, Lancaster RG y Gillam EM. Bioactivation of tamoxifen by recombinant human cytochrome p450 enzymes. *Chem Res Toxicol* 2002; **15**, 614-622

Oncology Group [en línea] 1998. Tamoxifen information. The Eastern Cooperative. [fecha de acceso 19 de enero de 1999]; disponible en: <http://ecog.dfci.harvard.edu/~wwwnew/general/tamoxifen.html>

O'Regan R, England G, Cisneros A, Jordan VC. Relationship of tamoxifen dose and the growth of tamoxifen-stimulated tumor. NorthWestern University, Chicago, EUA. [en línea] 1998 [fecha de acceso 19 de enero de 1999]; disponible en: http://www.asco.org/prof/me/html/98abstract/bc/m_419/hm

Osborne MR, Hardcastle IR y Phillips DH. Minor products of reaction of DNA with alpha-acetoxymetoxifen. *Carcinogenesis* 1997; **18**, 539-543.

Peters-Engl C, Leodolter S, Frank W, Danmayr E, Friedl HP y Medl M. Association between endometrial cancer and metoxifen treatment of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1999; **54**, 255-260.

Phillips DH. Understanding the genotoxicity of Metoxifen? *Carcinogenesis* 2001; **22**, 839-849.

Quinn MA y Campbell JJ. Metoxifen therapy in advanced/recurrent endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1989; **32**, 1-3.

Rodríguez-Arnaiz R y Ramos P. *Drosophila* como sistema para detectar agentes genotóxicos. México. Manual. Fac. Ciencias, UNAM, 1992. 50 p.

Rodríguez-Arnaiz R, Orozco SP, Gaytán OJC y Graf U. Analysis of mitotic recombination induced by several mono- and bifunctional alkylating agents in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res* 1996; **351**, 133-145.

Sharpe CR, Collet J-P, Belzile E, Hanley JA y Boivin J-F. The effects of tricyclic antidepressants on breast risk. *Brit Jour Cancer* 2002; **86**, 92-97.

Shibutani S, Ravindernath A, Suzuki N, Terashima I, Sugarman SM, Arthur P, Grollman AP y Pearl ML. Identification of metoxifen-DNA adducts in the endometrium of women treated with metoxifen *Carcinogenesis* 2000a; **21**, 1461-1467.

Shibutani S, Reardon JT, Suzuki N y Sancar A. Excision of metoxifen-DNA adducts by the human nucleotide excision repair system. *Cancer Res* 2000b; **60**, 2607-2610.

Smith LL y White IN. Antiestrogen therapy: uncertainties and risk assessments. *Oncology-New York* 1998; **12**, 14-22.

Spanó MA, Frei H, Würigler FE y Graf U. Recombinagenic activity of four compounds in standar and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis* 2001; **16**, 385-394.

Stiborová M, Bořek-Dohlská L, Hodek P, Mráz J y Frei E. New selective inhibitors of cytochromes P450 2B and their application to antimutagenesis of metoxifen. *Archiv Biochem Biophys* 2002; **40**, 41-49.

Styles JA, Davies AA, Lim CK, De Matteis F, Stanley LA, White IN, Yuan ZX y Smith LL. Genotoxicity of tamoxifen, tamoxifen epoxide and toremifene in human lymphoblastoid cells containing human cytochrome P450s. *Carcinogenesis* 1994; **15**, 5-9.

Styles JA, Davies A, Davies R, White IN y Smith LL. Clastogenic and aneugenic effects of tamoxifen and some of its analogues in hepatocytes from dosed rats and in human lymphoblastoid cells transfected with human P450 cDNAs (MCL-5). *Carcinogenesis* 1997; **18**, 303-313.

Thackray VG, Young RH, Hooper JE y Nordeen SK. Estrogen agonist and antagonist action on the human estrogen receptor in *Drosophila*. *Endocrinology* 2000; **141**, 3912-3915.

Van Leeuwen FE, Benraadt J, Coebergh JW, Kiemeney LA, Gimbrere CH, Otter R, Schouten LJ, Damhuis RA, Bontenbal M, Diepenhorst FW, *et al.* Risk of endometrial cancer after Tamoxifen treatment of breast cancer. *Lancet* 1994; **343**, 448-452.

Van Schaik N y Graf U. Genotoxicity evaluation of five antidepressants in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 1991; **260**, 99-104.

Van Schaik N y Graf U. Structure activity relationships of tricyclic antidepressants and related compounds in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 1993; **286**, 155-163.

Wade CB, Robinson S, Shapiro RA y Dorsa D. Estrogen receptor (ER)[alpha] and ER[beta] exhibit unique pharmacologic properties when coupled to activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 2001; **142**, 2336-2342.

White INH. The Tamoxifen dilemma. *Carcinogenesis* 1999; **20**, 1153-1160.

Wilking N, Isaksson E y von Schoultz E. Tamoxifen and secondary tumors: an update. *Drug Safety* 1997; **16**, 104-117.

Wogan GN. Review of the toxicology of tamoxifen. *Semin Oncol* 1997; **24**, S1-87-S1-97.

Zijlstra JA. Pharmacological and mechanistic aspects of chemically induced mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. Alemania. Druk:Krips Repro Meppel, 1987. 192 p.