



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

CONTRIBUCIÓN A LA VALORACIÓN DEL
EFECTO GENOTÓXICO DEL ÁCIDO CAFEICO EN
Drosophila melanogaster CON SMART EN ALA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

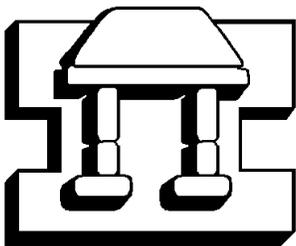
BIÓLOGO

PRESENTA:

DIEGO ORTEGA CAPITAINÉ

DIRECTORA DE TESIS:

M. en C. IRMA ELENA DUEÑAS GARCÍA



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, EDO DE MÉXICO 2004



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 mis padres: Rubén Ortega y Esther Capitaine por ser las personas mas importantes en mi vida, ya que este trabajo también les pertenece por todos sus sacrificios, comprensión, paciencia, aliento y su amor. Además de todas las lecciones que me han dado en la vida y por que son un ejemplo a seguir.

A mi hermano: Rodrigo por que siempre has estado conmigo cada vez que te necesitaba.

AGRADECIMIENTOS

A las profesoras: Irma Elena, María Eugenia y Laura, por que he aprendido mucho de ustedes, por su apoyo y su confianza.

A mis tías: Dalila y Yolanda por todo su apoyo.

A mis amigos de mi generación: Ricardo, Efraín (Trashcheche), Lola, Paty, Monse y Celina por todas las experiencias que compartimos durante muchos años.

A Nayo por que siempre estuviste en las buenas y en las malas además de ser una persona especial en mi vida.

A la Banda: Jenny (Karina), Roberto (Toro), Memo, Chago, Alberto (Caver), Abraham (Feno), Efraín (El bueno), Carlos (Tache), Lalo, Tomas, Trino, Ángel (Lobo), Emmanuel (Piojo), Víctor (Manatí), Rodrigo (Cheche), Miguel (Mike) y Omar (Por que la Chela y el Estudio si se llevan).

A mis compañeros de laboratorio: En especial a Zoraya por tu ayuda y brindarme tu amistad.

A Laura por todo lo que has compartido.

Y a los que no mencione lo siento pero no me puedo andar acordando de todos.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Drosophila melanogaster	8
Prueba SMART.....	10
Líneas y marcadores.....	14
Cruzas.....	16
ANTECEDENTES	17
JUSTIFICACIÓN	20
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
RESULTADOS.....	23
DISCUSIÓN.....	27
CONCLUSIONES	33
ANEXO 1.....	34
REFERENCIAS	35

RESUMEN

El ácido cafeico (AC) es un compuesto natural presente en la dieta humana principalmente en productos de origen vegetal y en actual controversia por sus efectos ya que se ha reportado como no genotóxico, antígenotóxico, genotóxico y cancerígeno. La prueba SMART evalúa la genotoxicidad originada por la exposición a un químico. El objetivo del presente trabajo fue valorar la actividad genotóxica de concentraciones altas de AC en la craza Bioactivación Elevada de *Drosophila melanogaster* con SMART en ala. Se realizaron tres experimentos independientes utilizando concentraciones de 57.8, 173 y 289 mM de AC. Los resultados muestran que el AC presentó un efecto genotóxico débil en las concentraciones 57.8 y 173 mM obteniéndose una frecuencia estadísticamente significativa sólo en manchas pequeñas, lo cual sugiere que el AC pudiera tener efectos aneuploidogénicos y citostáticos. Por el contrario, la concentración 289 mM no causó efecto genotóxico. Estas observaciones nos permiten sugerir que el AC es un promutágeno o un mutágeno directo con efectos citotóxicos. Se sugiere utilizar la craza Estándar que presenta niveles regulados de citocromo P450 para poder confirmar estos resultados.

INTRODUCCIÓN

Durante su evolución y su vida los organismos están sometidos a distintas presiones, factores que pueden ser de tipo ambiental, biológico o químico. Ante esto los organismos deben reaccionar, adaptarse o perecer (Renzoni *et al.*, 1993).

Actualmente los seres humanos se exponen a un sinnúmero de productos industriales sintéticos que se han venido a añadir a los de origen natural y que se utilizan como aditivos de alimentos, cosméticos, medicamentos, productos de limpieza, plaguicidas, fertilizantes, u otro tipo de sustancias extrañas (xenobióticos) (Vogel, 1991).

El monitoreo de la contaminación por análisis directo de los agentes químicos requiere de gran precisión y conocimiento del contaminante a verificar, además, su evaluación está limitada por la sensibilidad y especificidad del método utilizado.

Entre las sustancias con efecto tóxico merecen destacarse aquéllas que por su estructura son capaces de interactuar con los ácidos nucleicos, presentando una posible actividad mutagénica y/o cancerígena. La toxicidad que afecta al material genético y que manifiesta una expresión retardada en el tiempo se denomina genotoxicidad (Hofnung y Quillardet, 1984). Algunas sustancias genotóxicas son cancerígenas, capaces de incrementar la tasa de aparición de tumores cancerosos, otras son recombinogénicas, y algunas otras son mutágenos, es decir, capaces de incrementar la tasa de mutación. Algunas de estas últimas se pueden clasificar como promutágenos, ya que necesitan ser activados por determinadas enzimas como los Citocromos P450 (CYP450) (Figura 1) para en algún momento ocasionar daños a moléculas como ADN y proteínas al unirse covalentemente a ellas (Figura 2) (Córdoba, 2001; Murray *et al.*, 1992).

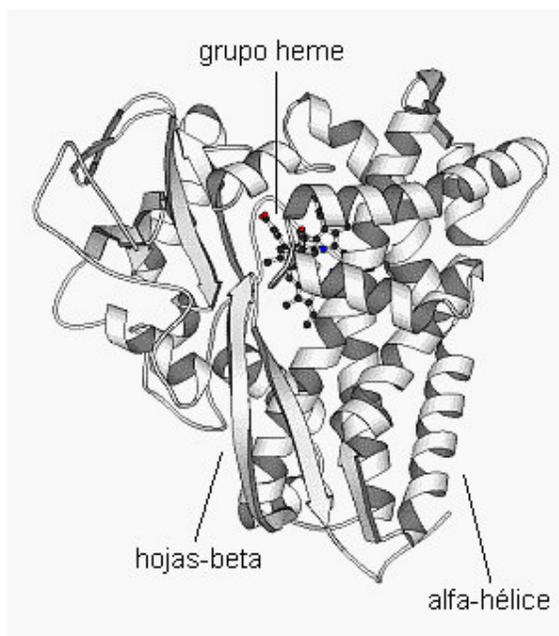


Fig. 1. Estructura del Citocromo P450 (Tomado de www.mogensgallardo.com/p450/estructu.html).

Los CYP450 constituyen una superfamilia enzimática involucrada en el metabolismo oxidativo de compuestos endógenos como esteroides, ácidos grasos o vitaminas liposolubles (A y D) y en el metabolismo de xenobióticos entre los que se encuentran muy diversas drogas, cancerígenos, pesticidas, alcaloides, entre otros (Figura 3) (Santiago *et al.*, 2002).

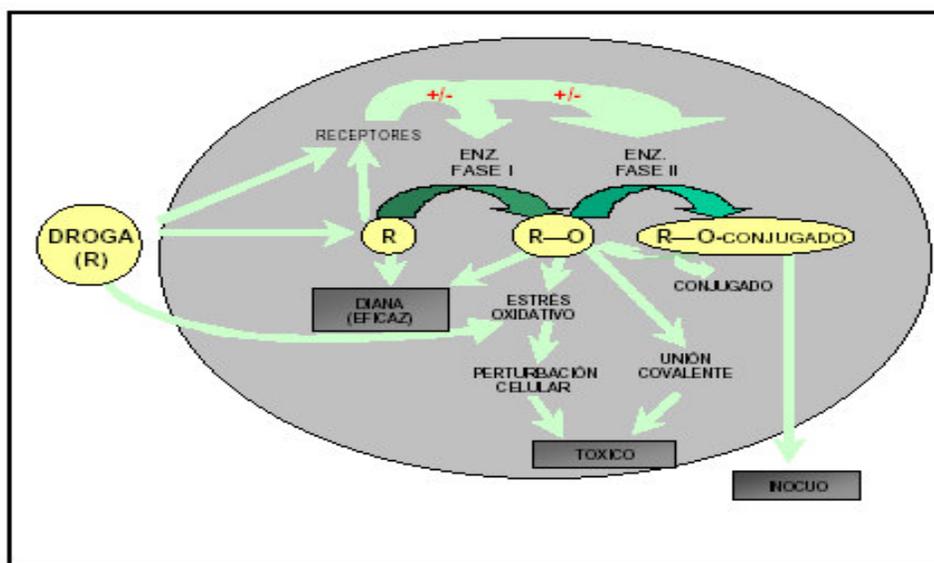


Fig. 2. Esquema del metabolismo de una droga (R) cuando entra en una célula: Una vez que ha penetrado en la célula, tanto la droga no metabolizada como su metabolito pueden ejercer un efecto beneficioso actuando sobre su diana terapéutica o por el contrario pueden llegar a ser tóxicos como consecuencia de una perturbación en el ciclo celular o por la formación de uniones covalentes con ácidos nucleicos o proteínas (Tomado de Santiago *et al.*, 2002).

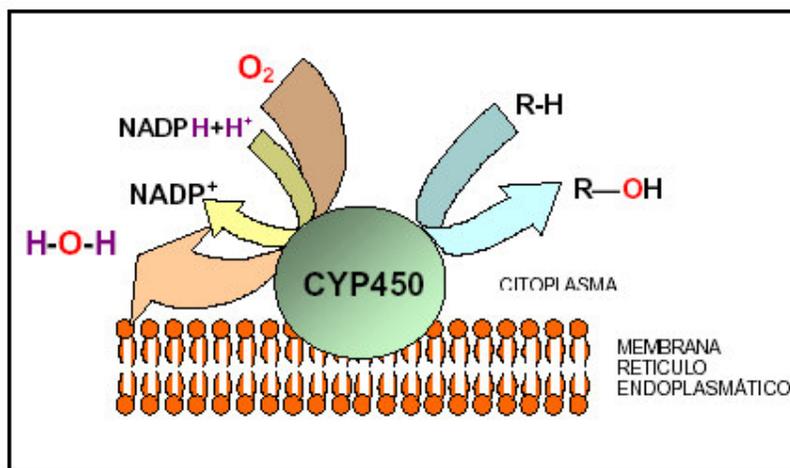


Fig. 3. Hidroxilación de una droga liposoluble por acción del citocromo P450. El producto R-OH aumenta la solubilidad en agua, facilitando su excreción (Tomado de Santiago *et al.*, 2002).

Se ha demostrado experimentalmente que existe una correlación positiva entre agentes genotóxicos y cancerígenos (Purchase, 1982). No todos los agentes que contribuyen al desarrollo de cánceres humanos son genotóxicos. Un posible mecanismo de acción para estos cancerígenos no genotóxicos consiste en su capacidad de interferir con los mecanismos de reparación del ADN o de incrementar la respuesta mutagénica a otros agentes, motivo por el cual se les suele designar con el término de comutágenos (Rossman, 1986).

La Genética Toxicológica estudia los daños al ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) y proteínas. La información genética se encuentra en el ADN, manteniéndose, replicándose, y transmitiéndose a las generaciones sucesivas con alta fidelidad. El daño a éste puede ocurrir a través de procesos biológicos normales o por el resultado de la interacción con algún agente físico o químico (Young, 2002).

Los xenobióticos pueden dispersarse en el medio ambiente y producir efectos directos o indirectos sobre el hombre y los animales, incluso a bajas concentraciones. Esto obliga a la adopción de estrictas medidas de control, siendo imprescindible la realización de pruebas de determinación de genotóxicos y/o cancerígenos de todas las sustancias químicas de uso frecuente, así como de mezclas complejas presentes en el medio ambiente debidas a la actividad humana.

Los estudios epidemiológicos sirven para determinar agentes específicos asociados con una determinada ocupación laboral y el riesgo de desarrollar algunos tipos de cáncer. No obstante, estos métodos de detección de sustancias genotóxicas presentan también algunas desventajas debidas principalmente a la naturaleza no experimental de la investigación. Existen diferentes tipos de marcadores biológicos como también numerosos ensayos donde se emplean a diversos organismos como elementos de investigación para determinar el potencial genotóxico de una sustancia química o muestra ambiental. Entre los ensayos de genotoxicidad con organismos superiores en los cuales se pueden citar el ensayo de intercambio de cromátidas hermanas en peces o el ensayo de determinación de micronúcleos en los linfocitos periféricos de larvas de anfibios de los géneros *Pleurodeles* o *Xenopus*. También, un vegetal como la cebolla (*Allium cepa*) ha sido empleado en un ensayo de determinación de la genotoxicidad en el que se investigan parámetros citológicos como el índice mitótico, aberraciones cromosómicas, aneuploidía y mitosis. Los ensayos con células de mamíferos, roedores fundamentalmente, son asimismo muy útiles en la predicción de mutagénesis celular (Forni y Bertazzi, 1987). Estos son sólo algunos ejemplos de los muchos que existen.

Frente a estos ensayos clásicos de determinación de toxicidad a nivel genético, la tendencia actual es el empleo de ensayos a corto plazo ya que éstos tienen la ventaja económica y el empleo de grandes poblaciones en los ensayos. La mayoría de estos utilizan como elementos de experimentación a microorganismos, sobre todo bacterias, y a cultivos celulares al igual que insectos como *Drosophila* (Venitt y Perry, 1984).

El uso de plantas con fines terapéuticos se remonta prácticamente desde la prehistoria hasta nuestros días. Este conocimiento empírico se denomina Etnobotánica (Popoca *et al.*, 1996). Esta medicina herbolaria tradicional tiene dos aspectos: El primero, muy positivo, consiste en que a través de la historia de la humanidad e incontables experiencias empíricas realizadas por diversas culturas, se ha logrado una selección sumamente valiosa de un conjunto muy importante de vegetales con definidas acciones sobre la salud. En este proceso, se han descartado muchas plantas ya sea por ser tóxicas o inocuas. El segundo aspecto, un tanto negativo, ya que no pueden descubrirse las sustancias (y sus mecanismos bioquímicos de acción) responsables de las actividades terapéuticas. Restando solamente estas propiedades medicinales a los testimonios personales, opiniones o creencias (Podolsky, 2001).

En el Estado de San Luis Potosí se utiliza de manera empírica como protector solar el género *Buddleja escordioides* el cual contiene un principio activo conocido como verbascósido (Figura 4) compuesto fenilpropanoico constituido por dos moléculas de azúcares enlazados por uniones éster además, de anillos aromáticos (Ávila-Acevedo, 2002). Sin embargo, la piel podría absorber el verbascósido y llegar a hidrolizarlo, ya que en las células existen enzimas de la clase hidrolasas, cuya función es la transferencia de grupos funcionales al agua. En el caso del verbascósido, éste presenta un enlace éster el cual es el sustrato en el cual la hidrolasa del tipo esterasa puede actuar y ésta es la vía por la que posiblemente este compuesto es hidrolizado en dos moléculas: una es el 2 (3,4 dihidroxifenil) etanol y la otra es el ácido cafeico (Ávila-Acevedo, 2002).

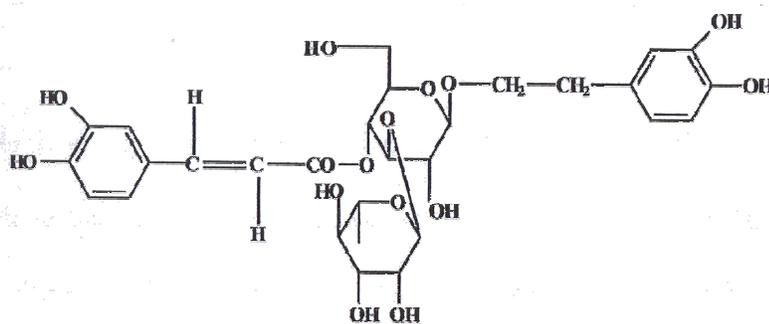
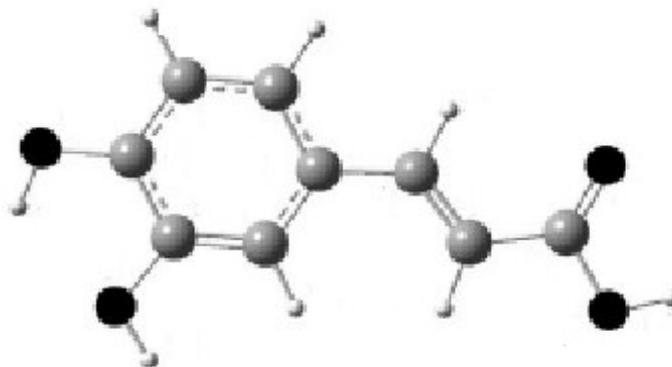


Fig. 4. Verbascósido (Tomado de Ávila-Acevedo, 2002)

El ácido cafeico (AC) (Figura 5) es uno de los principales representantes de la familia de los ácidos fenólicos orgánicos, principios activos de origen vegetal de potente actividad biológica. Está involucrado en muchas acciones metabólicas y de manera natural se encuentra en muchos productos comestibles derivados de plantas, frutas, condimentos y bebidas (té y café) consumidas por los seres humanos (VanBesien y Marques, 2003).

FÓRMULA: $C_9H_8O_4$, PM: 180.2

Fig. 5. Molécula del ácido cafeico (Tomado de VanBesien y Marques, 2003).



Existe gran controversia respecto a los efectos que puede provocar este compuesto ya que Podolsky (2001) ha recopilado para este ácido las siguientes propiedades:

- Protección del colágeno y de la elastina (condiciones básicas para regenerar la piel a partir de heridas, úlceras o quemaduras)
- Disminución de la actividad mastocitaria (efecto antihistamínico) que es compartida también por la quercetina.
- Inhibición de prostaglandinas proinflamatorias (en especial sobre las que originan inflamaciones crónicas).
- Efecto antiapoptótico sobre las células endoteliales, es decir, un efecto frenador de la muerte de las células que tapizan nuestro sistema circulatorio (citoprotección).
- Actividad antioxidante (potente protector de los tejidos frente al daño de los radicales libres).

Aunque esta propiedad se encuentra en discusión ya que se comprobó que el ácido cafeico no confiere ninguna protección antioxidante en una concentración de 100 μ M causando daño al ADN (presentando un efecto genotóxico) (Szeto *et al.*, 2002).

- Cancerígeno en pruebas con mamíferos provocando hiperplasia, papilomas, tumores y carcinomas a una concentración de 2 mM (Kaneko *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2000; Hirose *et al.*, 1997).

Drosophila melanogaster

La selección de un organismo específico para realizar estudios genéticos depende de las ventajas que éste presente para la realización de la investigación deseada.

La mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* (Figura 6) resulta un excelente organismo eucariótico para experimentación en Genética. Tiene las siguientes ventajas: 1) ciclo vital relativamente corto (10-14 días) a 25°C; 2) fácil cultivo en botellas o tubos de vidrio con un medio barato y sencillo de preparar; 3) gran fertilidad (una pareja produce varios cientos de descendientes); 4) número cromosómico bajo (4 pares); 5) gran número de caracteres heredables que afectan la morfología del adulto y 6) gran similitud genética con el ser humano ya que su genoma se encuentra totalmente secuenciado por lo que ahora se sabe que más del 60 % de los genes implicados en

enfermedades humanas tienen ortólogos en *Drosophila* y un 25.5% de sus proteínas son similares en un 80% de sus secuencias (Adams, 2000; Goñi, 1993).

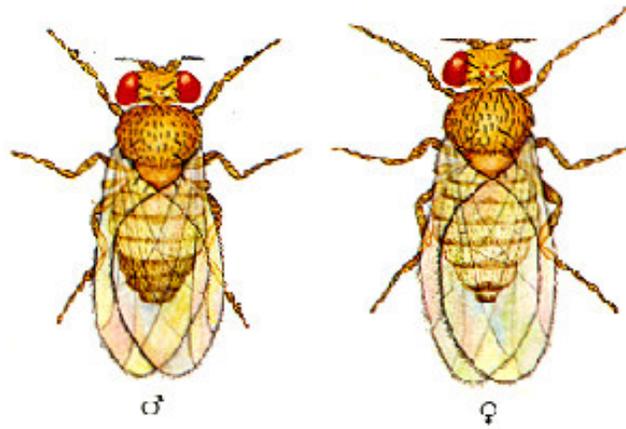


Fig. 6. *Drosophila melanogaster* (Tomada de Ramos *et al.*, 1993).

El ciclo de vida de *Drosophila* consiste de varios estadios de desarrollo distintos (Figura 7). Después de que el óvulo es fecundado, ocurre un periodo de embriogénesis durante el cual el cigoto se convierte en una forma inmadura conocida como larva.

Después de la eclosión, cada larva experimenta varias mudas. Cada muda permite un incremento de tamaño hasta que la larva está lista para transformarse en pupa.

La pupación implica una muda y el endurecimiento de la nueva cutícula externa, de modo que la pupa queda por completo encapsulada. El insecto sufre entonces una metamorfosis completa. En este tiempo la mayor parte de los tejidos larvales degeneran y otros se diferencian (discos imagales) para formar los órganos de la mosca sexualmente madura (imago) (Villem, 1998).

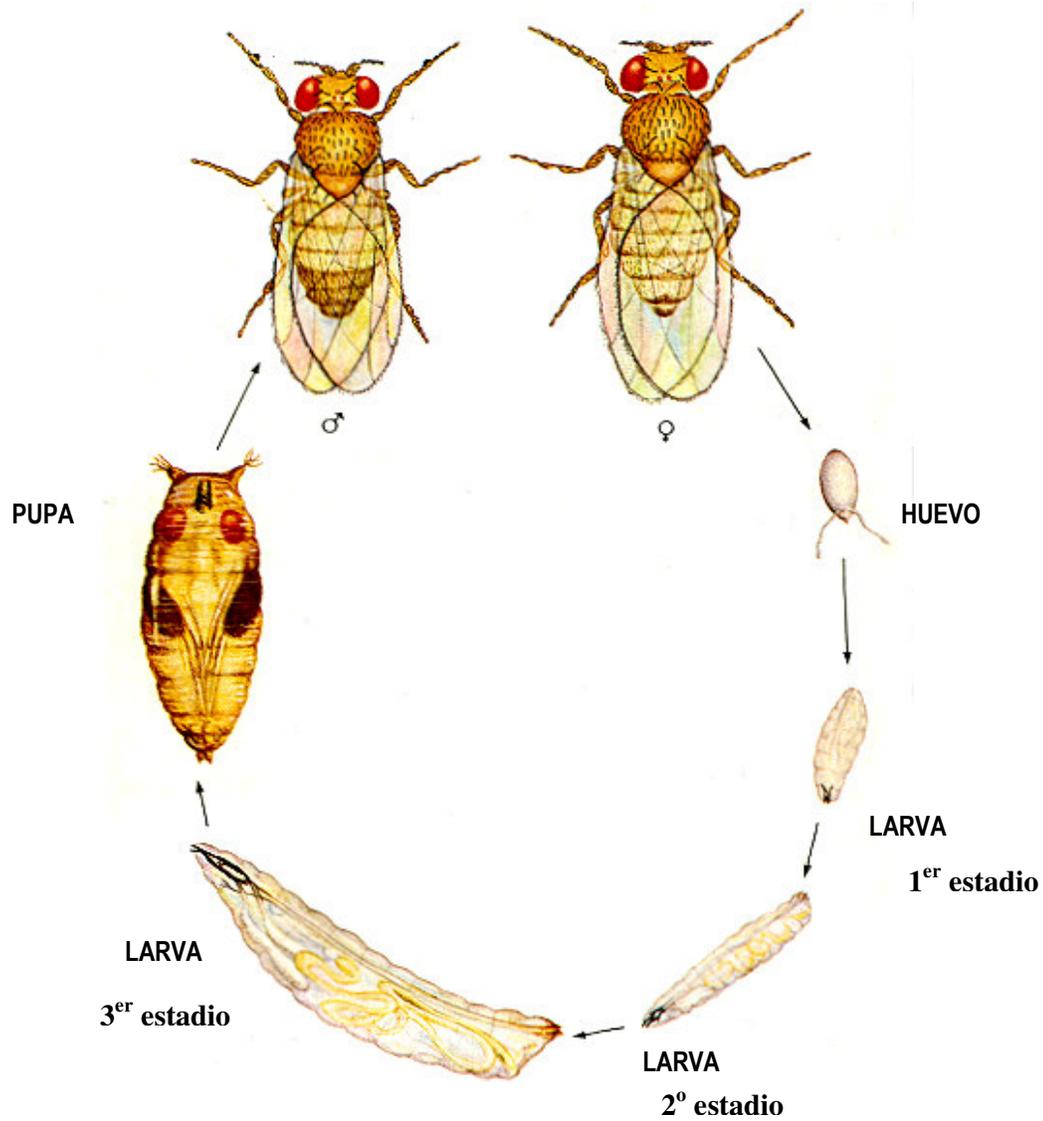


Fig. 7. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (Tomada de Ramos *et al.*, 1993).

Los discos imagales son bolsas epiteliales de alrededor de 20 a 50 células que permanecen indiferenciadas durante el estadio embrionario; pero durante la metamorfosis dan origen a estructuras que conformarán al organismo adulto tales como antenas, patas, ojos, alas, etc. (Figura 8). De tal manera que, si ocurriera daño genético en una de estas células, éste se expresará en el adulto, como un clon de células mutantes en el tejido.

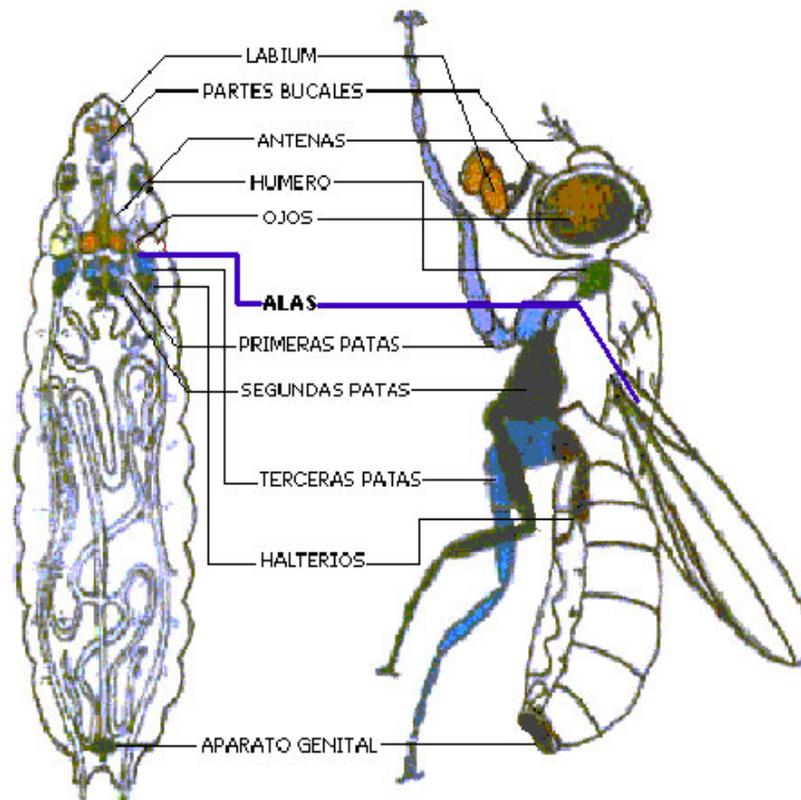


Fig. 8. Discos imagales de la larva que en la metamorfosis se estimulan y diferencian para formar las estructuras del cuerpo del adulto: antenas, ojos, patas, genitales externos, alas, etc (Tomado de Lawrence, 1992).

PRUEBA SMART

La prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART, por sus siglas en inglés) de *Drosophila melanogaster* es *in vivo*, con gran potencial de aplicación en estudios de genotoxicidad básicos y aplicados. En este sistema se utilizan marcadores fenotípicos para los tricomas o pelos de las alas (SMART en alas) o para el color de los ojos (SMART en ojos). Los marcadores utilizados son recesivos, por lo que las moscas adultas tienen fenotipo silvestre (Graf *et al.*, 1984).

Organismos transheterocigotos y heterocigotos para los marcadores fenotípicos de una u otra versión de SMART se exponen durante la fase larvaria al posible genotóxico de interés. Si durante el desarrollo ocurren eventos como mutación (Figura 9e), recombinación (Figura 9b y 9d), deleción o pérdida de material genético (Figura 9c) y

no disyunción (Figura 9f) en las células somáticas se puede producir pérdida de heterocigosis produciéndose clonas mutantes que en el adulto se expresarán como manchas mutantes en un contexto silvestre (Figura 10a, 10b y 10c). En ausencia de retraso o muerte celular, el tamaño de la mancha es indicativo del número de divisiones que transcurren a partir de la alteración original, y el tipo de mancha puede indicar si el evento genético que le dio origen es recombinación u otro de los señalados en la Figura 9 (Graf *et al.*, 1984).

El diagnóstico del efecto se basa en la comparación del tipo y la frecuencia de las manchas recobradas. Como en otros sistemas de prueba, es necesario que la información proporcionada reduzca al mínimo la probabilidad de resultados falsos positivos y falsos negativos (Frei y Würigler, 1995).

Este ensayo combina dos pruebas estadísticas:

- (i) Contra la hipótesis nula H_0 . En ésta se asume que el tratamiento experimental no incrementa la frecuencia de daño genético por encima de la del control
- (ii) Contra la hipótesis alterna H_A . En esta se asume *a priori* que un tratamiento dado aumenta la frecuencia de daño genético por un cierto múltiplo de la frecuencia en el control. El rechazo de H_A implica que la frecuencia en los tratamientos está significativamente por debajo de cierta frecuencia definida por el investigador como el nivel de riesgo genotóxico mínimo no aceptable.

El contrastar los valores contra un riesgo igual a cero es imposible, por lo que se definió un riesgo mínimo, en términos de un cierto múltiplo p de la frecuencia espontánea. En trabajos con radiaciones, el concepto del doblaje de la dosis $\rho = 2$ se aplica frecuentemente.

En SMART se utiliza m donde $m = \rho$

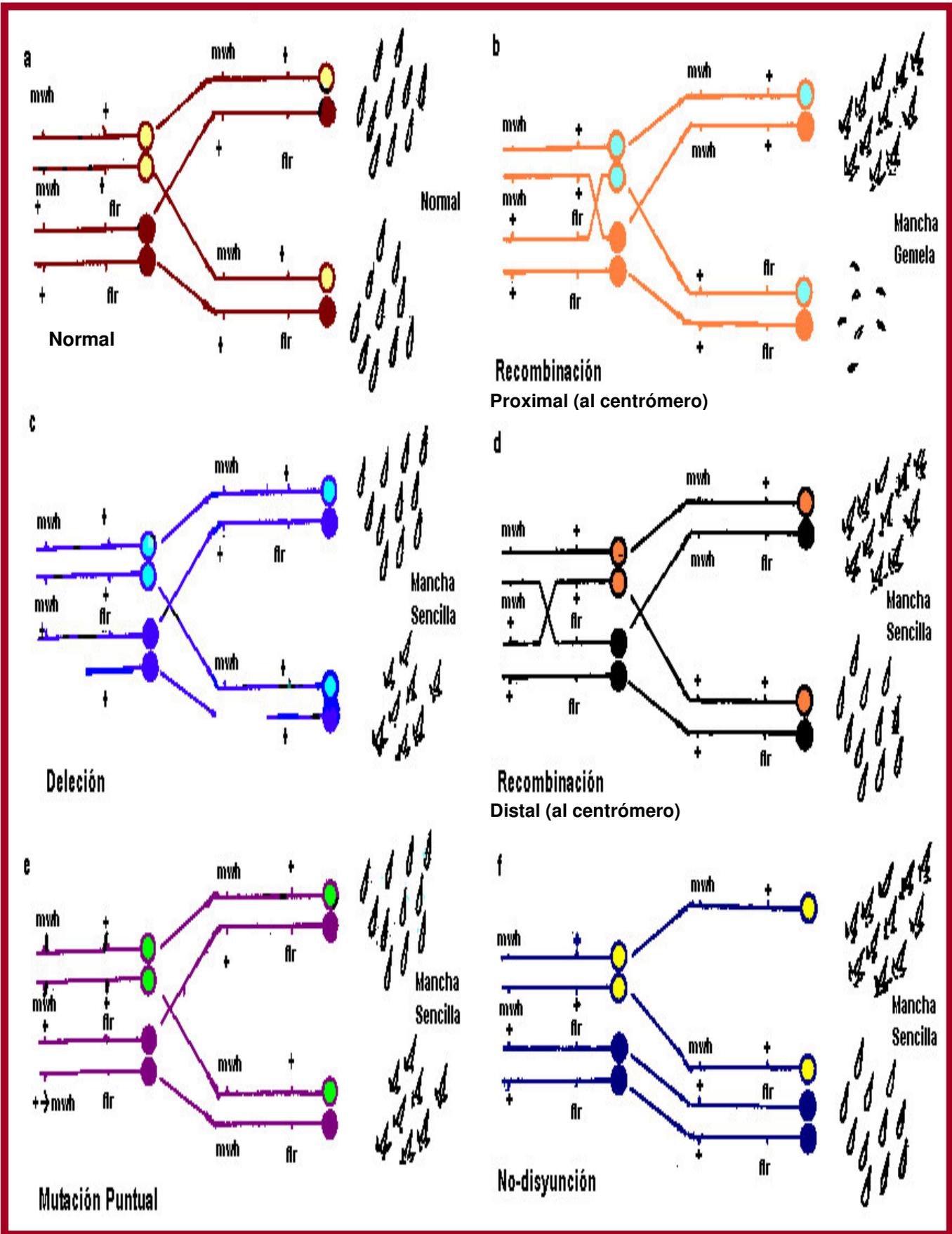


Fig. 9. Eventos que ocasionan la pérdida de heterocigosis en *Drosophila melanogaster* (Modificado de Graf, 1984).

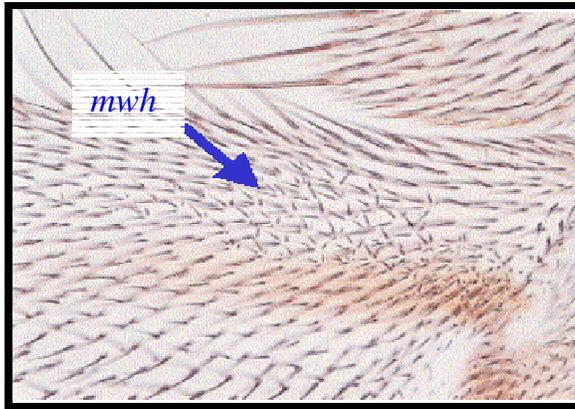


Fig. 10a. Mancha sencilla *mwh*.

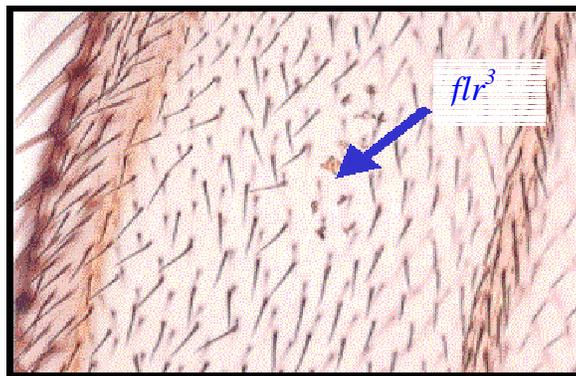


Fig. 10b. Mancha sencilla *flr*³.

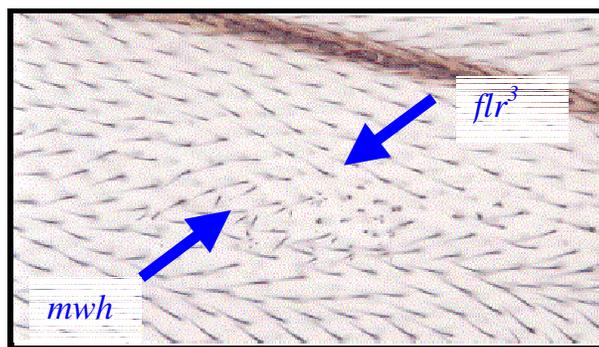


Fig. 10c. Mancha gemela.

LÍNEAS Y MARCADORES

En esta prueba se utilizan tres líneas, “multiple wing hairs” (*mwh/mwh*), “Oregon-flare” (*ORR (1); ORR (2); flr³ / TM3, Bd^s*) y “flare” *flr³/TM3, Bd^s* con los siguientes marcadores:

mwh (*multiple wing hairs*): Mutación recesiva localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-0.3). Su expresión fenotípica es un cambio en el número de tricomas por célula (2-5) (Figura 11) (Graf y van Schaik, 1992).



Fig. 11. Marcador genético *mwh*.

flr³ (*flare*): Es una mutación recesiva que se expresa como tricomas mal formados y cortos, con apariencia de flama o roseta de maíz. Está localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 pero en una posición más próxima al centrómero que el marcador *mwh* (3-38.8). Se conocen alelos mutantes para este locus, todos letales con condición homocigótica. Sin embargo, las células individuales homocigotas en los discos imagales de las alas son viables y pueden producir clones mutantes en las células del ala del adulto (Figura 12) (Graf *et al.*, 1996).



Fig. 12. Marcador genético *flr³*.

Bd^s (*Beaded-Serratia*): Este alelo del locus *Beaded*, se localiza en el cromosoma 3 (3-92.5), fue originalmente llamado *Serratia* (*Ser*), se identifica porque las moscas

que lo poseen presentan muescas en el borde de las alas. Este marcador dominante se utiliza para reconocer a las líneas *flare* y Oregon-*flare*; en condición homocigótica también es letal (Figura 13).

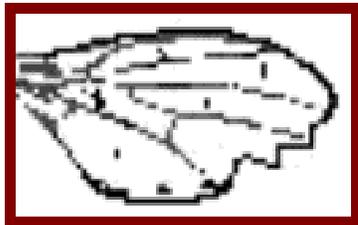


Fig. 13. Marcador genético Bd^s .

TM3 (Third Multiple 3): Como los marcadores flr^3 y Bd^s son letales en homocigosis las líneas *flare* y Oregon-*flare* presentan un cromosoma balanceador con tres inversiones: dos paracéntricas (L y R) y una pericéntrica (L + R) que impiden recuperar eventos no deseables, producto de la recombinación meiótica y permiten mantener las líneas con los marcadores letales en heterocigosis..

La línea Oregon-*flare* fue construida por Frölich y Würigler en 1990. Presenta los cromosomas 1 y 2 de la línea Oregon R(R) resistente al DDT. El cromosoma 2 acarrea la mutación dominante *Rst* (2) DDT localizada en (2-65) que provoca la expresión constitutiva de una proteína inductora de los genes *Cyp*. Los genes *Cyp* se expresan en las enzimas del complejo enzimático CYP450. Esta mutación confiere en consecuencia, no sólo resistencia al DDT e insecticidas organofosforados en larvas y adultos, sino también el incremento general en el metabolismo xenobiótico, permitiendo valorar la activación, *in vivo*, de promutágenos (Saner *et al.*, 1996).

CRUZAS

La craza bioactivación elevada (B.E.) se caracteriza por presentar los niveles constitutivamente altos de CYP450. Un número de promutágenos incrementa su genotoxicidad cuando se emplea esta craza.

Esta craza se realiza con hembras vírgenes *ORR(1);ORR(2); flr³/ TM3, Bd^s* y machos *mwh/ mwh* (Graf y van Schaik, 1992).

La craza estándar (E), que presenta niveles regulados de los CYP450, se realiza con las líneas, *flare (flr³/TM3, Bd^s)* y *multiple wing hairs (mwh/mwh)*(Graf y van Schaik, 1992).

ANTECEDENTES

En el estudio del AC se han reportado diferentes acciones las cuales han puesto en controversia respecto a los efectos de este compuesto.

Ensayos con roedores han demostrado que el AC presenta efectos cancerígenos propiciando la aparición de papilomas en estómago, adenomas en células renales e incidencia de hiperplasia renal (Hirose *et al.*, 1997).

Además, se han utilizado líneas celulares de roedores en las cuales se han obtenido resultados de genotoxicidad, degradación de proteínas y ácidos nucleicos y se ha determinado la ruta metabólica del AC (Gao *et al.*, 2000; Moridani *et al.*, 2002; Szeto *et al.*, 2002).

También se han reportado resultados negativos en las pruebas de Ames y SMART en ala (Karekar *et al.*, 2000; Ojeda, 2002).

Existen investigaciones con resultados sobre efectos protectores al daño celular causado por H₂O₂ en combinación con AC presentando características quimiopreventivas y antioxidantes (Nakayama, 1999; Yagasaki *et al.*, 2000).

En las tablas I-III se resumen los resultados de los antecedentes ya mencionados. La tabla IV muestra algunos de los alimentos que contienen AC, el consumo de éstos y las concentraciones en las cuales presentan efectos cancerígenos y tóxicos para roedores.

.

Tabla I. Referencias con resultados positivos para AC.

AÑO	INVESTIGADOR	TIPO DE ENSAYO	RESULTADO
1997	Hirose <i>et al.</i>	Efecto cancerígeno del ácido cafeico en ratas (2 mM).	El ácido cafeico provoca un efecto sobre la cancerinogénesis.
2000	Gao <i>et al.</i>	Interacción de células U937 de ratas tratadas con ácido cafeico (0.11 mM y 0.44 mM).	El ácido cafeico puede degradar las proteínas y los ácidos nucleicos de las células.
2002	Moridani <i>et al.</i>	Ruta metabólica del ácido cafeico en hepatocitos de rata (1 Mm).	Los resultados muestran el camino de la toxicidad y de la desintoxicación.
2002	Szeto <i>et al.</i>	Ensayo cometa (1mM)	Efecto genotóxico.

Tabla II. Referencias con resultados negativos para AC.

AÑO	INVESTIGADOR	TIPO DE ENSAYO	RESULTADO
2000	Karekar <i>et al.</i>	Efecto antígenotóxico de ácido cafeico en la prueba de Ames y <i>Drosophila</i> (0.25, 0.5 y 1 mM).	El ácido cafeico presenta un efecto antígenotóxico.
2002	Ojeda	Ensayo SMART en ala de <i>Drosophila</i> . (27mM, 81 mM y 135 mM).	Respuesta negativa en las tres concentraciones

Tabla III. Referencias con efectos protectores a daño celular.

AÑO	INVESTIGADOR	TIPO DE ENSAYO	RESULTADO
1999	Nakayama.	Efectos protectores contra daños en células inducidos por H ₂ O ₂ en células de rata (1 mM).	El ácido cafeico presenta efectos antioxidantes.
2000	Yagasaki <i>et al.</i>	Efectos inhibitorios del ácido cafeico en invasión de células cancerígenas. (1 mM).	Protección de radicales libres a células tratadas con ácido cafeico.

Tabla IV. Riesgo existente en el consumo de algunos alimentos que contienen AC.

Exposición humana diaria media	Concentraciones correspondientes a cancerígenos para roedores	Concentraciones tóxicas para los roedores
Café 13.3g	23.9 mg (0.13 mM)	297 mg (1.64 mM)
Lechuga 14.9g	7.90 mg (0.043 mM)	
Manzana 32g	3.40 mg (0.018 mM)	
Papa 54.9g	867 µg (0.48 mM)	
Apio 7.95g	858 µg (0.47 mM)	
Zanahoria 12.1g	374 mg (2 mM)	
Ciruela 2g	276 µg (0.15 mM)	
Pera 3.29g	240 µg (0.13 mM)	

(Tomado de Ames y Swirsky, 1999).

JUSTIFICACIÓN

Este proyecto es parte de una investigación realizada en conjunto por los Laboratorios de Genética Toxicológica y de Fitoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO), en el cual se evalúa la actividad genotóxica del verbascósido (principio activo de un filtro solar natural) y de su producto a causa de su hidrólisis (AC).

El AC es un compuesto que puede encontrarse en un gran número de productos naturales utilizados por el hombre: desde alimentos hasta productos comerciales como el vino y en un protector solar.

Diversas investigaciones sobre sus efectos lo ha reportado como: no genotóxico, cancerígeno, genotóxico y hasta antígenotóxico; por lo tanto se realizó la presente investigación para poder obtener resultados que apoyen algunas de las ya mencionadas.

HIPÓTESIS

Si el AC en altas concentraciones tiene un efecto genotóxico, habrá diferencias significativas entre las frecuencias de manchas del testigo negativo y los experimentales.

OBJETIVO

Valorar la actividad genotóxica de concentraciones altas del ácido cafeico (57.8 mM, 173 mM y 289 mM) en la cruza de Bioactivación Elevada de *Drosophila melanogaster* en SMART en ala.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Se aislaron hembras vírgenes de las líneas Oregon-*flare* (*ORR(1);ORR(2); flr³/ TM3, Bd^S*) y machos de la línea *multiple wing hairs* (*mwh/mwh*).

Se realizó la cruce de Bioactivación Elevada durante 72 h en un cultivo de 5g de puré de papa en hojuela hidratada con 20 ml de solución conservadora (Dueñas *et al.*, 2001). Para la colecta de huevos se trasvasaron las moscas a frascos con medio de levadura activada durante 8 hrs a 25 °C y 65 % de humedad. Posteriormente se recuperaron las larvas de 72 +/- 4 h de vida.

Las larvas se sometieron a un tratamiento crónico durante 48 hrs, con 2 ml de AC (57.8, 173 y 289) y dos concentraciones de uretano (10 y 20 mM) como testigo positivo, en viales con 0.5 g de Medio Instantáneo Carolina (Carolina Supply Co.).

Los imagos se recuperaron 10 días después de la colecta de huevos y se fijaron en alcohol al 70 %. Posteriormente se disectaron las alas de moscas transheterocigotas con fenotipo silvestre (*mwh + / + flr³*) y se realizaron preparaciones permanentes con solución de Faure (30 g de goma arábica, 20 ml de glicerol, 50 g de hidrato de cloral y 50 ml de agua).

Se analizaron las alas de fenotipo silvestre en un microscopio óptico a 40X para cuantificar el número, tamaño y tipo de mancha (Graf *et al.*, 1984). Se analizaron 60 individuos por tratamiento siendo el tamaño de muestra óptimo para la prueba (Frei y Würigler, 1995). Los datos obtenidos se analizaron con el programa estadístico SMART PC-versión 2.1, desarrollado por Frei y Würigler en 1988, el cual se basa en la prueba no paramétrica de ji cuadrada para proporciones (de una cola), con un grado de libertad y una probabilidad de 0.05.

Para corroborar los resultados no concluyentes obtenidos con SMART se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon con modificación para una cola para datos individuales. Se empleó para ello el programa estadístico STAT graphics versión 6.0. En este caso, el diagnóstico estadístico puede ser no significativo con probabilidades menores o iguales a 0.05, 0.01 ó 0.001.

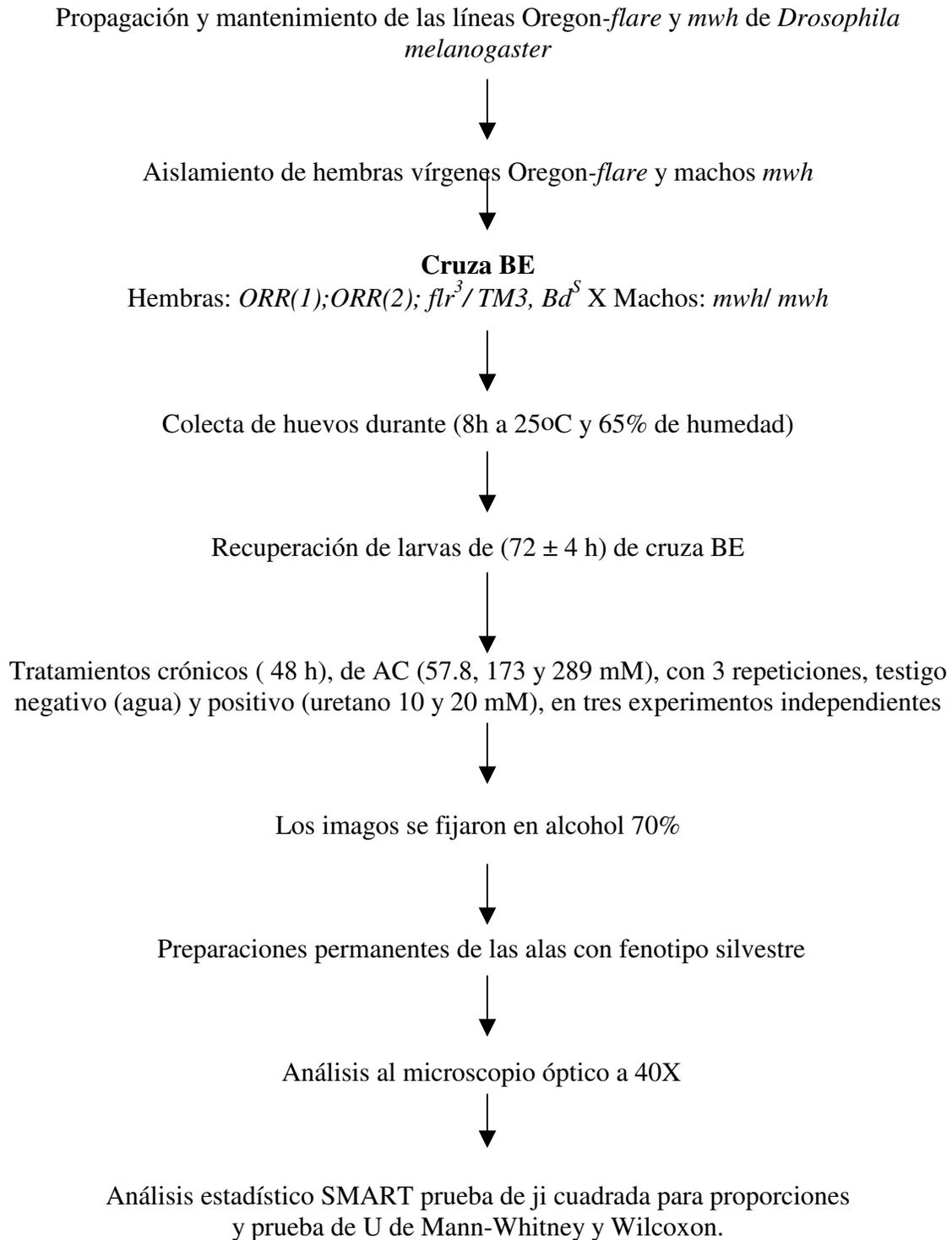


Fig. 14. Diagrama de flujo de la metodología para SMART en ala.

Tabla V. Resultados obtenidos con SMART para AC

			Frecuencia de manchas por individuo. Diagnóstico estadístico*^a			
Compuesto	Concentración mM	Número de individuos	Manchas pequeñas (1-2 células) m=2.00	Manchas grandes (> de 2 células) m=5.00	Manchas gemelas m=5.00	Manchas totales m=2.00
Control	0.0	744**	0.55 (407)	0.13 (94)	0.05 (39)	0.73 (540)
Ácido cafeico	57.8	61	0.82 (50)+	0.07 (4) -	0.03 (2)-	0.92 (56)-
	173	60	0.83 (50)+	0.08 (5)-	0.05 (3)-	0.97 (58)-
	289	60	0.57 (34)-	0.12 (7)-	0.07 (4)i-	0.75 (45)-
Uretano	10	9	40.22 (362)+	14.33 (129)+	4.67 (42)+	59.22 (533)+
	20	3	50.67 (152)+	2.67 (8)+	1.00 (3)+	54.33 (163)+

*Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würigler (1988). Donde: m: Factor de multiplicación i: indecisos; Prueba estadística de una cola. Niveles de probabilidad de α y β ; resultados positivos: + ($\alpha = 0.05$); resultados negativos: - ($\beta = 0.05$). ^a Prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon utilizada para corroborar los resultados indecisos por la prueba SMART (Frei y Würigler, 1995).

**Control histórico de la cruz B.E. del Laboratorio de Genética Toxicológica de la FES-Iztacala UNAM correspondiente a 30 experimentos independientes.

RESULTADOS

Ácido Cafeico Cruza Bioactivación Elevada (B.E)

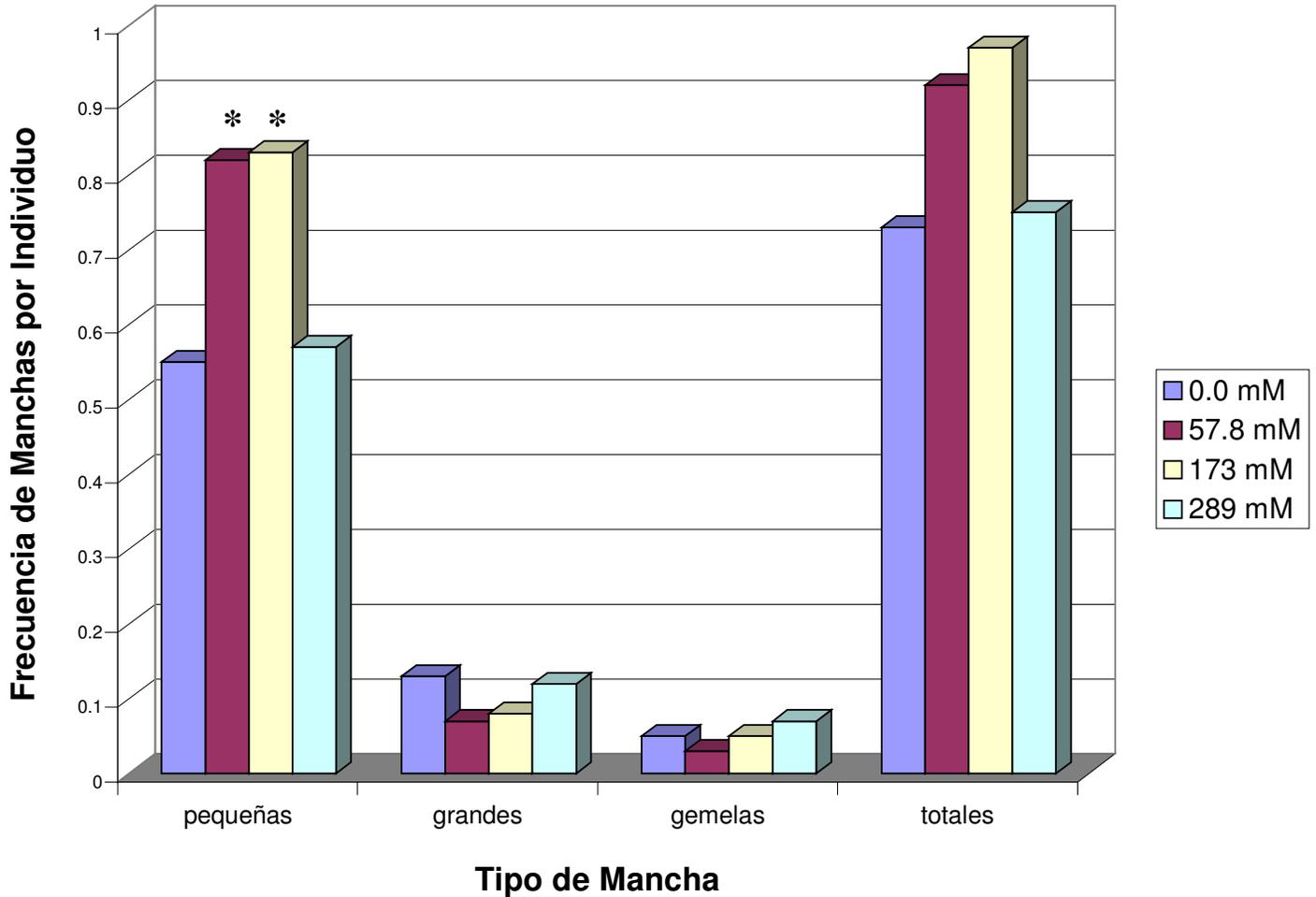


Fig 15. Frecuencia de manchas por concentración de ácido cafeico. *Significancia en la frecuencia de manchas para la prueba SMART.

La Figura 15 y la tabla V muestran las frecuencias de manchas por individuo obtenidas al alimentar larvas de *Drosophila melanogaster* con AC. Estos resultados se analizaron con el control histórico del testigo agua para transheterocigotos de la cruce B.E. obtenida en el Laboratorio de

Genética Toxicológica de la FES-Iztacala con los resultados de 30 experimentos independientes. Las concentraciones 57.8 y 173 mM resultaron estadísticamente significativos para manchas pequeñas; la concentración de 289 mM y el resto de los diferentes tipos de manchas no resultaron estadísticamente significativos.

Considerando la posibilidad de que estos resultados fueran falsos positivos se aplicó la prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon para discernir en los resultados no concluyentes y comprobar los positivos. Con este estadístico se obtuvo que los resultados no concluyentes fueron negativos y se comprobó la genotoxicidad de las concentraciones 57.8 y 173 mM para las manchas pequeñas.

La Figura 16 muestra la frecuencia y distribución de clones *mwh* dependiendo del tamaño por número de células. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en las manchas con 1 célula con las concentraciones 57.8 y 173 mM y la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en la concentración 289 mM.

Ácido Cafeico cruza Bioactivación Elevada (B.E)

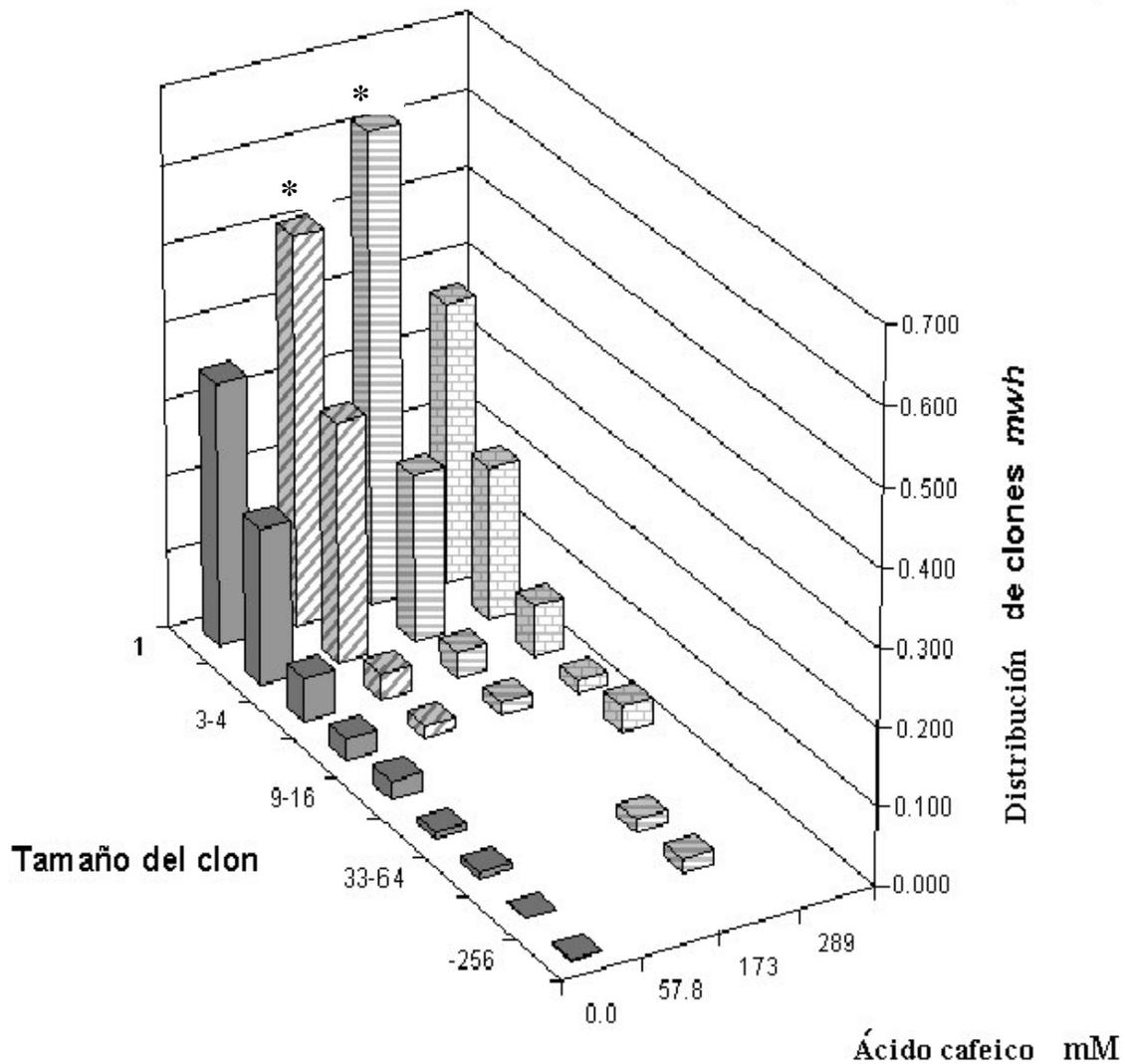


Fig. 16. Distribución de clones *mwh* por tamaño y frecuencia por exposición a diferentes concentraciones de AC. * Significancia de los clones de una sola célula utilizando la prueba de U-Mann-Whitney y Wilcoxon.

DISCUSIÓN

Muchos alimentos de origen vegetal contienen compuestos de los que no se conocen los efectos específicos después de ser metabolizados, un ejemplo es el AC cuyas propiedades están en controversia (Auger *et al.*, 2004; VanBesien y Marques, 2003; Nardini *et al.*, 2002; Podolsky, 2001).

El análisis de la prueba SMART en ala mostró que el AC presenta un efecto genotóxico débil en las concentraciones 57.8 y 173 mM y no existe una dosis-respuesta clara. La gráfica de frecuencias y distribución del tamaño del clon *mwh* muestra que las manchas pequeñas de una célula presentan significancia estadística, lo cual indica que el compuesto podría ser aneuploidogénico (Frei y Würigler, 1995; Graf *et al.*, 1984) y citostático al inhibir el crecimiento y la división celular (Martínez *et al.*, 2002). Lo cual puede concordar con Gao *et al.* (2000) quien utilizó hepatocitos de rata de la línea U937 tratadas con AC (0.11 y 0.44 mM) y obtuvieron resultados positivos al daño en los ácidos nucleicos, y con Szeto *et al.* (2002) que encontraron resultados positivos para el AC 1 mM en el ensayo cometa presentando una actividad genotóxica y de daño celular.

Por otro lado, Karekar *et al.* (2000) mediante SMART en ala, cruza E obtuvieron resultados negativos para el AC (0.25, 0.5 y 1 mM) e incluso reportan una acción antígenotóxica contra la aflatoxina B₁. Ojeda (2002) también reportó resultados negativos con SMART en ala en la cruza B.E., a concentraciones altas de AC (27, 81 y 135 mM). La diferencia de los resultados de Ojeda y la presente investigación puede deberse al número de organismos estudiados, 55 individuos (110 alas) por tratamiento para Ojeda y 60 individuos (120 alas) por tratamiento para este estudio, ya que al realizar una comparación de las frecuencias obtenidas la diferencia es mínima (ver apéndice). Lo que podría indicarnos que el efecto genotóxico esta en el límite inferior de lo positivo.

En base a que el AC puede ser biotransformado en la Fase I del metabolismo xenobiótico por enzimas de la familia de los CYP450 (Moridani *et al.*, 2002; James y Roberts, 2000;

Mckinnon y Evans, 2000) o por fenol monooxigenasas que se encuentran presentes en bacterias, plantas, insectos y mamíferos (White, 1978) y peroxidases, en algunos casos por iones metálicos y oxígeno molecular transformándolo en *o*-quinona (Bolton *et al.*, 2000; Kallel *et al.*, 2004; Urios *et al.*, 2003; Moridani *et al.*, 2002). La *o*-quinona puede producir aductos sobre la guanina en el N7 lo que puede generar una transversión de guanina a timina (G-T) (Figura 17) (Bolton *et al.*, 2000; Harvey *et al.*, 2003).

ADUCTOS POR *O*-QUINONA

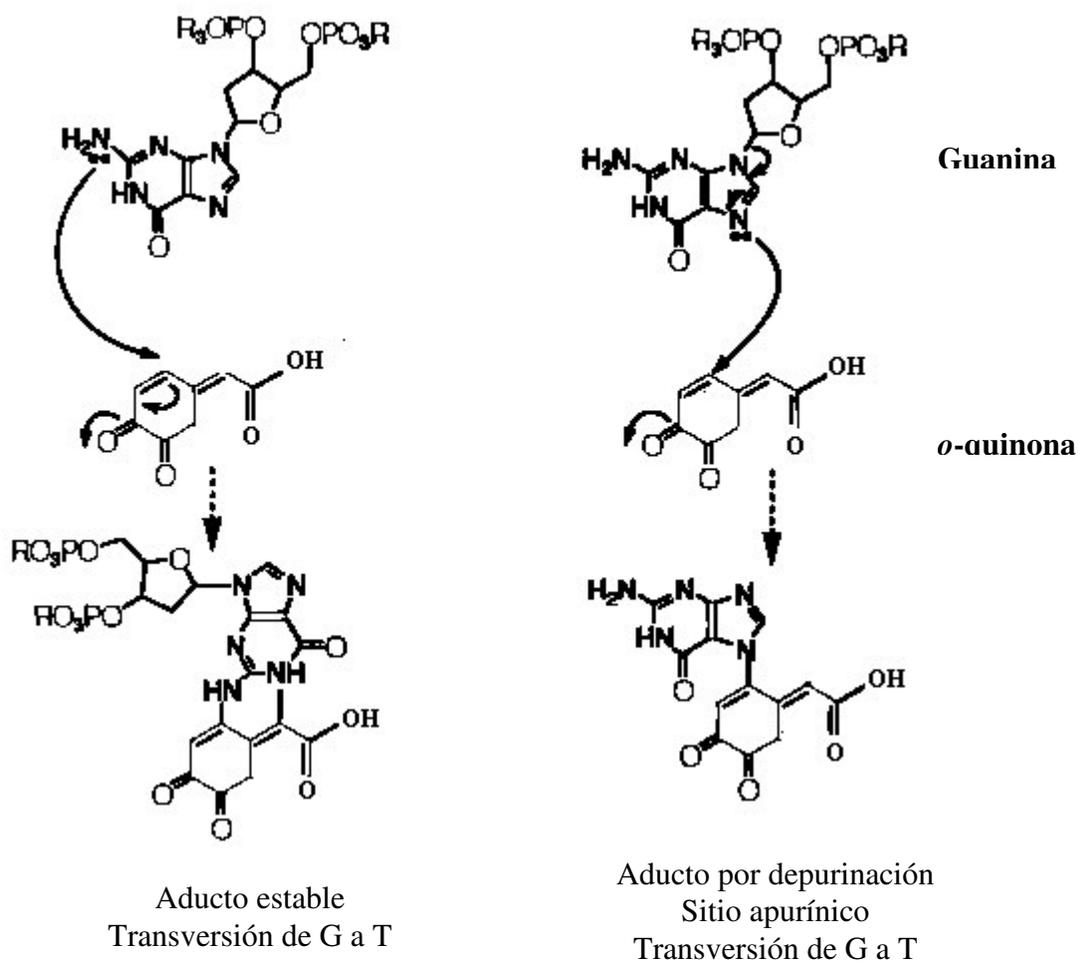


Fig. 17. Formación de aductos a causa de la *o*-quinona (Tomado de Bolton *et al.*, 2000).

Los resultados positivos encontrados en este trabajo se pueden explicar de dos maneras

1. **Mutágeno directo.** El AC pertenece al grupo de los ácidos fenólicos los cuales pueden incrementar la genotoxicidad y lesionar al ADN por mecanismos mediados por especies

reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) que producen desaminación, rompimientos simples o dobles de los enlaces fosfodiéster en la cadena de ADN, entrecruzamientos entre cadenas de ADN y entre ADN y proteínas (Friedberg *et al.*, 1995; Duarte *et al.*, 1999; Smith y Jones, 1999); además el AC se puede transformar en *o*-quinona como consecuencia de la reducción de la (NAD (P) H) sin intervención de enzimas. En este proceso se pierden dos electrones del AC, los cuales producirían ROS. Por otro lado los radicales hidroxilo (OH•) que se encuentran en el AC pueden enlazarse con amidas del grupo C=O y esto a su vez afecta a las proteínas causando plegamientos o estructuras de forma helicoidal (Szeto *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2000), además estos radicales generan múltiples productos al unirse con las bases del ADN (Figura. 18) (Halliwell, 1999). Los daños causados por los mecanismos descritos serían directos y se esperaría que incrementaran significativamente las frecuencias de manchas simples (pequeñas y grandes) y gemelas, lo cual no ocurrió (Figura 19a). Aunque por otro lado un efecto directo se podría ver reflejado con un aumento en la frecuencia de manchas pequeñas, con respecto al testigo, siempre y cuando este compuesto tuviera efecto aneuploidogénico y posteriormente citostático evitando la división celular (Figura 19b). Lo anterior apoyaría los resultados mostrados en la tabla V y la Figura 15 donde se observa que la frecuencia de manchas pequeñas es estadísticamente significativa.

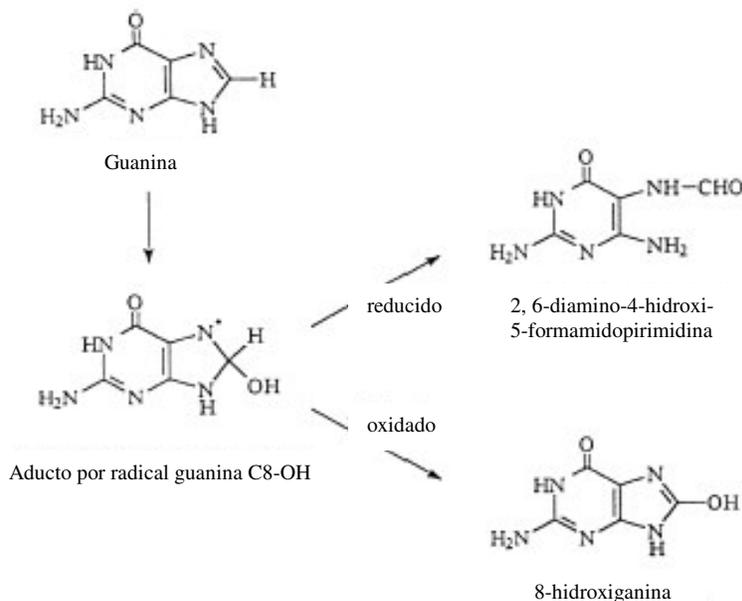


Fig. 18. Modificación de la guanina a causa del ataque de OH• (Tomado de Halliwell, 1999).

2. **Promutágeno.** Las frecuencias positivas en las manchas pequeñas también se pueden explicar si el daño al ADN hubiera ocurrido en las células de los discos imagales al final de la etapa larvaria (Graf *et al.*, 1995). Como se mencionó anteriormente el AC también se puede transformar en *o*-quinona con la reducción de un electrón por enzimas mitocondriales o microsomales (CYP450/P450 reductasa) (Szeto *et al.*, 2000), posteriormente se establece el ciclo redox, el cual puede amplificar la producción de ROS oxidando el ADN (Figura 19c) (Bolton *et al.*, 2000; Urios *et al.*, 2003; Friedberg *et al.*, 1995).

Debido a que la cruz BE presenta altos niveles constitutivos de los CYP450s, deberíamos encontrar incremento estadísticamente significativo en las frecuencias de manchas pequeñas, grandes y gemelas si la producción enzimática de ROS estuviera relacionada íntimamente con el metabolismo xenobiótico del AC (Figura 19d). Sin embargo, esta opción no está apoyada por los resultados que muestran un aumento en la frecuencia de manchas pequeñas.

La concentración de 289 mM dio resultados estadísticamente negativos, esto puede explicarse a que existió un bajo número de sobrevivientes, los cuales probablemente fueron resistentes al agente químico.

El testigo positivo (uretano 10 y 20 mM), presenta una frecuencia elevada en todos los tipos de mancha como se esperaba, lo cual ayuda a verificar la presencia de los marcadores de la cruz B.E. Estos resultados coinciden con los reportados por Frölich y Würigler (1990).

El AC mostró ser un genotóxico débil, lo cual es importante ya que se encuentra presente en grandes cantidades en alimentos de origen vegetal como la manzana, café, ciruela, apio, y en bebidas como el vino rojo. La exposición diaria a este compuesto por la dieta fluctúa entre 200 a 800 mg, lo que depende del consumo y de los hábitos alimentarios (Auger *et al.*, 2004; Nardini *et al.*, 2002). Los métodos de la toxicología clásica indican que más de 50 % de las sustancias ensayadas a elevadas concentraciones son genotóxicas o cancerígenas

para el animal de laboratorio lo cual es confirmado en este proyecto. La exposición de un organismo a las concentraciones ensayadas en este trabajo podrían ocurrir por dos caminos: uno menos probable es la sobre-exposición al compuesto y a sus reactivos intermedios. El otro más probable sería por la aplicación continua o ingestión de productos de origen natural. Un ejemplo de ello es el caso del verbascósido, que se utiliza en el Norte de nuestro país como filtro solar natural y que al hidrolizarse libera una molécula de AC por cada una del compuesto (Ávila-Acevedo, 2002). Si se trata de sustancias cancerígenas y genotóxicas, una sola molécula bastaría para provocar la mutación de una célula, sin embargo, este dogma puede ser discutido ya que todos los organismos poseen mecanismos de defensa como: la transformación metabólica de la molécula responsable de las mutaciones, lo que reduce su toxicidad y favorece su eliminación; la inhibición de la unión entre la molécula y el material nucleico; los procesos diversos de la reparación del ADN; la estimulación de las comunicaciones intercelulares que limitan la multiplicación de células mutadas (Ames y Swirsky, 1999).

Por el momento, no se puede dar una respuesta contundente sobre los efectos genotóxicos del AC. Sólo el conocimiento completo de los mecanismos de acción de este ácido podrán ayudar a tener una adecuada conclusión. Por lo tanto se recomienda continuar las investigaciones con respecto a los efectos genotóxicos y el metabolismo del AC.

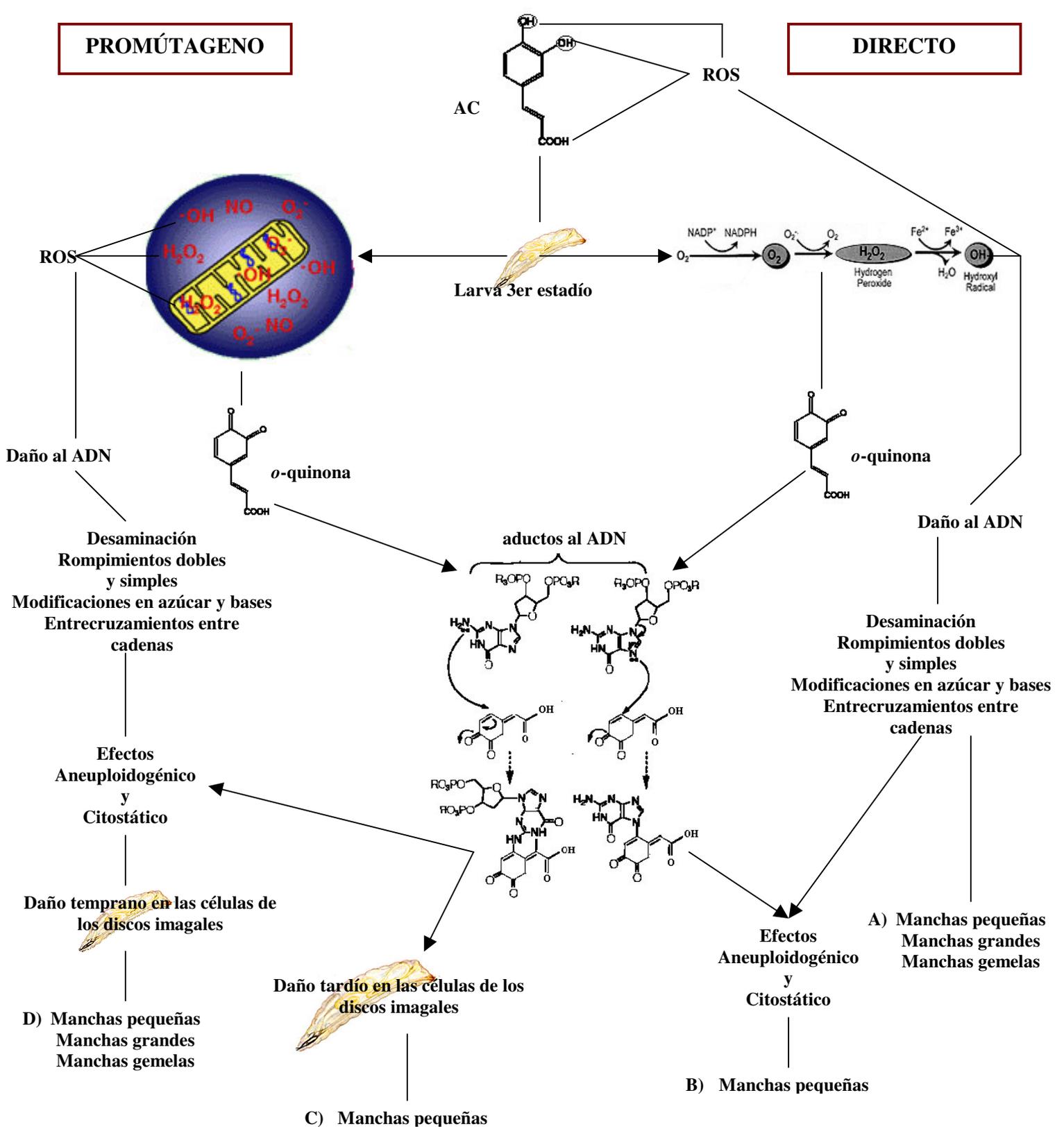


Fig. 19. Diagrama de las posibles rutas del AC después de la ingesta. a) daño directo todo tipo de manchas, b) daño directo con manchas pequeñas, c) daño indirecto manchas pequeñas y d) daño indirecto todo tipo de manchas

CONCLUSIONES

El AC presenta efectos genotóxicos débiles en altas concentraciones (57.8 y 173 mM) en la cruza BE.

Los efectos genotóxicos débiles se presentan como un incremento estadístico significativo de las manchas pequeñas respecto al control agua pero muy por abajo del testigo positivo.

La presencia de manchas pequeñas podría indicar que el AC es un promutágeno o un mutágeno directo con efecto aneuploidogénico o citostático. Se recomienda utilizar la cruza E para corroborar lo anterior.

APÉNDICE

			Frecuencia de manchas por individuos. Diagnóstico estadístico*			
Investigador	Concentración en mM	Número de individuos	Manchas pequeñas (1-2 células) m=2.00	Manchas grandes (mas de 2 células) m=5.00	Manchas gemelas m=5.00	Manchas totales m=2.00
Control histórico	0.0	744**	0.55 (407)	0.13 (94)	0.05 (39)	0.73 (540)
Ojeda, 2002	27	55	0.60 (33) -	0.05 (3)-	0.05 (3)-	0.71 (39)-
Presente Investigación	57.8	61	0.82 (50)+	0.07 (4) -	0.03 (2)-	0.92 (56)-
Ojeda, 2002	81	55	0.78 (43)-	0.11 (6)-	0.05 (3)	0.91 (50)-
Ojeda, 2002	135	55	0.78 (43)-	0.11 (6)-	0.02 (1)-	0.91 (34)-
Presente Investigación	173	60	0.83 (50)+	0.08 (5)-	0.05 (3)-	0.97 (58)-
Presente Investigación	289	60	0.57 (34)-	0.12 (7)-	0.07 (4)-	0.75 (45)-

*Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988). Donde: m: Factor de multiplicación; Prueba estadística de una cola. Niveles de probabilidad de α y β ; resultados positivos: + ($\alpha = 0.05$); resultados negativos: - ($\beta = 0.05$).

**Control histórico de la cruce B.E del Laboratorio de Genética Toxicológica de la FES-Iztacala correspondiente a 10 experimentos independientes

REFERENCIAS

- Adams, M., Celniker, S. y Holt, R. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. **287**: 2185-2195.
- Ames, B. y Swirsky, L. (1999). Contaminación, cáncer y alimentación. *Mundo Científico*. **207**: 30-37.
- Auger, C., Laurent, N., Laurent, C., Besancon, P., Caporiccio, B., Teissédre, P. y Rouanet J. (2004). Hydroxycinnamic acids do not prevent aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic golden *Syriam hamsters*. *Life Sciences*. **74**: 2365-2377.
- Ávila, G. 2002. Estudio fitoquímico de *Buddleja perfiolata* y *Buddleja escordioides*, evaluación antibacteriana y fotoprotectora de sus principales metabolitos secundarios. Tesis de Doctorado, UNAM, México.
- Bolton, L., Trush, M., Penning, T., Dryhurst, G. y Monks, T. (2000). Role of Quinones in Toxicology. *Chemical Research in Toxicology*. **3**: 135-160.
- Córdoba, D. (2001). Toxicología. El Manual Moderno. 4ª Edición. Madrid. 198-199.
- Duarte, M., Laires, A., Gaspar, J., Leao, D., Oliviera, J., Rueff, J. (1999). Genotoxicity of instant coffee : possible involvement of phenolic compounds. *Mutat. Res*. **442** : 43-51.
- Dueñas, I. E., M. E. Heres, P. L. Castañeda, U. Graf. (2001). Easy raising of *Drosophila melanogaster* on a medium consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. *Drosophila Information Service*. **84** : 166

Forni, A. y Bertazzi, P. A. (1987). Epidemiology in protection and prevention against environmental mutagens/carcinogens. Examples from occupational medicine, *Mutation Research*. **181**: 289-297.

Frei, H. y Würgler, 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 Würgler, F. E. (1995). Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. *Mutat. Res.* **334** : 247 – 325.

Friedberg, E., Walker, G. y Siede, W. (1995). DNA Repair and mutagenesis. ASM PRESS. USA. 14-15.

Frölich, A. y Würgler, F. (1990). Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing spot test: Dependence on genotype-controlled metabolic capacity. *Mutat. Res.*, **244** : 201-208.

Gao, T. Ci, Y. Jian, H. y An, Ch. (2000). FTIR investigation of the interaction of tumor cells treated with caffeic acid and chlorogenic acid. *Vibrational Spectroscopy*. **24** : 225–231.

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 of *Drosophila melanogaster*. *Experientia*. **51**:168-173.

Graf, U. y van Schaik, N. (1992). Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, **271**: 59-67.

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

Graf, U y Würgler, F. E. (1996). The somatic white-ivory eye test does not detect the same spectrum of genotoxic events as the wing Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Env. Mol. Mutag.* **27**: 219-226.

Goñi, B. (1993). Ubicación y mapeo de un locus incógnito en *Drosophila melanogaster*. Sección Genética Evolutiva Facultad de Ciencias. <http://genetica.fcien.edu.uy/practicos/drosophila2003.pdf>.

Halliwell, B. (1999). Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat. Res.* **443** : 37-52.

Harvey, R., Dai, Q., Ran, Ch., y Penning, T. (2004). Synthesis of the *o*-quinones and other oxidized metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons implicated in carcinogenesis. *J. Org. Chem.* **69** : 2024-2032.

Hirose, M. Takesada, Y. Tanaka, H. Tamano, S. Kato, T. y Shirai, T. (1997). Carcinogenicity of antioxidants BHA, caffeic acid, sesamol, 4-methoxyphenol and catechol at low doses, either alone or in combination, and modulation of their effects in a rat medium-term multi-organ carcinogenesis model. *Carcinogenesis.* **19**: 207 – 212.

Hofnung, M. y Quillardet, P. (1984). Use of the terms mutagenicity and genotoxicity. *Mutation Research.* **132**: 141-142.

James, R. y Roberts, S. (2000). Principles of toxicology : Environmental and industrial applications. 2a Edición. John Wiley & Sons, Inc. 57-85.

Kallel, S., Tahar, B. y Abdelhedi, R. (2004). Electrochemical behavior of caffeic acid. *Electrochimica Acta*. **49** : 1647-1654.

Kaneko, M. Morimura, K. Nishikawa, T. Wanibuchi, H. Takada, N. Osugi, H. Kinoshita, H. y Fukushima, S. (2002). Different genetic alterations in rat forestomach tumors induced by genotoxic and non-genotoxic carcinogens. *Carcinogenesis*. **23** : 1729-1735.

Karekar, V. Joshi, S. y Shinde, S. L. (2000). Antimutagenic profile of three antioxidants in the Ames assay and the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res*. **468** : 183–194.

Lawrence, P.A. (1992). The marking of fly, the genetics of animal design. Blacwell Scientific Publication. U.S.A.

Martínez, M., García, F., Hernández, J., Saura, M., Garrigós, J. (2002). Los Citostáticos. www.um.es/eglobal/.

McKinnon, R. y Evans, A. (2000). Cytochrome P450. *J. Hosp. Pharm.* **30** : 102-105.

Moridani, M. Y. Scobie, H. y O'Brien, P. J. (2002). Metabolism of caffeic acid by isolated rat hepatocytes and subcellular fractions. *Toxicol. Letters*. **133** : 141–151.

Murray, R., Granner, D., Mayes, P. y Rodwell, V. (1992). Bioquímica de Harper. Manual Moderno. 12ª Edición. 656-660.

Nakayama. (1999). Protective effects of caffeic acid esters against H₂O₂ induced Ccell damages. *Mutat. Res*. **23** : 1 – 12 .

Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F. y Scaccini, C. (2002). Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *J. Agric. Food Chem.* **50** : 5735-5741.

Ojeda, D.J. (2002). Valoración de la genotoxicidad del ácido cafeico en la cruza Bioactivación Elevada de *Drosophila melanogaster* en la prueba SMART. Tesis. UNAM FES Iztacala Edo. México. 29 pp.

Podolsky, J. (2001). Situación actual de la fitoterapia. Propiedades biológicas de principios activos de origen vegetal contenidos en propóleos. www.inta.gov.ar/apinet/congreso/c04.pdf.

Popoca, S. J., Villarrel, M. L. y Aguilar, A. (1996). Actividad citotóxica de extractos orgánicos derivados de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana como antitumorales. Resumen de Ponencias del Primer Congreso Nacional de Plantas Medicinales de México, Tlaxcala, Tlax., 84-85.

Purchase, J. (1982). Toxicology. *Mutat. Res.* **31** : 53 – 60.

Ramos, P. (1993). Manual de laboratorio de genética para *Drosophila melanogaster*. Shaum. McGraw-Hill. México.

Renzoni, A., Mattei, N., Lari, L. y Fossi, M.C. (1993). Contaminants in the environment. CRC Press, Inc. 286.

Rossmann, P. (1986). Genetic toxicology of environmental chemicals. 4^a ed. Oxford University Press, Inc. New York. 4 – 5.

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

Santiago, C., Bandrés, F. y Gómez-Gallego, F. (2002). Polimorfismos de citocromo P450: Papel como marcador biológico. *Med. del Trabajo.* **3** : 130-140.

Smith, P. Y Jones, C. (1999). DNA recombination and repair. The Bath Press, Avon. New York. 166 p

Szeto, Y. T. Collins, A. R. y Benzie, I. F. F. (2002). Effects of dietary antioxidants on DNA damage in lysed cells using a modified comet assay procedure. *Mutat Res.* **500**: 31 – 38.

Urios, A., López-Gresa, P., González, C., Primo, J., Martínez, A., Herrera, G., Escudero, J., O'Connor, J. y Blanco, M. (2003). Nitric oxide promotes strong cytotoxicity of phenolic compounds against *Escherichia coli*: The influence of antioxidant defenses. *Free Radical Biology & Medicine.* **11** : 1373-1381.

VanBesien, E. y Marques, M. P. M. (2003). Ab initio conformational study of caffeic acid. *Journal of Molecular Structure.* **625** : 265–275.

Venitt, J. y Perry, C. (1984). Mutagenicity Testing: A Practical Approach. Editorial Sales, and Customer service Offices. USA. 30 – 45.

Villee, C. (1998). Biología de Villee. McGraw-Hill Interamericana. 4ª edición. México. 369.

Vogel, E. (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.

White, A. (1978). Principles of Biochemistry. Mc Graw-Hill. Inc USA. 411-412.

www.mogensgallardo.com/p450/estructu.html.

Yagasaki, K., Furuse T. y Miura Y. (2000). Inhibitory effects of coffee and caffeic acid, 3,4-dihydroxycinnamic acid, on the invasion of hepatoma cells. *Cancer Lett.* **32** : 43 - 54

Young, R. (2002). Genetic toxicology: Web resources. *Toxicology.* **173** : 103 – 121.