

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA



IZTACALA

**EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE VITAMINA C, IÓN
FIERRO Y DIFERENTES CONCENTRACIONES DE METIL-
METANOSULFONATO (MMS) CON LA PRUEBA SMART EN
ALA DE *Drosophila melanogaster*.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

KARINA PATRICIA ESTRADA GONZÁLEZ

DIRECTORA DE TESIS:
M. en C. MARÍA EUGENIA HERES Y PULIDO



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉX. 2008



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.

*Hay gente que sueña y que se resigna solo a soñar y gente
que sueña y que además, pone un pie delante del otro y
camina para hacer realidad sus sueños''*

Arturo Pérez-Reverte

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por el regalo de la vida.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Por permitirme formar parte de la máxima casa de estudios, darme la posibilidad de un mejor futuro y una constante lección de vida.

A LA M. EN C. MARÍA EUGENIA HERES

Por su asesoramiento científico y estímulo para seguir creciendo intelectual y personalmente. Mi madre académica, que durante mi estancia en el Laboratorio de Genética Toxicológica me brindó apoyo, cariño y paciencia. Porque más que una tutora es un ejemplo de vida y más aún mi modelo a seguir "Gracias por todo".

A LA M. EN C. IRMA ELENA DUEÑAS

Por su permanente e incondicional disposición en aclarar mis dudas y por sus valiosas sugerencias durante la redacción de esta tesis. Agradezco el haberla encontrado en mi camino, porque me ha permitido conocer a un ser humano excepcional que nació para transmitir ejemplarmente el conocimiento. Gracias por su amistad y por enseñarme el buen hábito de sonreírle a la vida.

A LA M. EN C. LAURA CASTAÑEDA

Por su apoyo y compañía en este camino tan importante en mi vida profesional y por su constante alegría. Por sus relatos siempre certeros y por enseñarme que abren más puertas, la prudencia y la amabilidad que la impaciencia y arrebato. Gracias maestra por permitirme conocerla y más aún por brindarme su amistad.

A LA M. EN C. ANA MARÍA BORES

Por su importante aportación, no sólo a esta tesis, sino a mi vida profesional y personal. Gracias por esas palabras que me llenan de emoción cuando expresan su confianza en mí. Podría escribir mil palabras más para expresarle mi agradecimiento y cariño, pero por ahora basta con decirle que usted ha dejado una huella en mí, que la aprecio y admiro.

AL M. EN C. ÁNGEL DURÁN Y AL DR. DIEGO ARENAS

Quienes fungieron como evaluadores de esta tesis, enriqueciendo con invaluable conocimiento su contenido. Agradezco sinceramente su aportación para la culminación de la misma, que representa tanto en mi vida profesional. Es para mí un honor haber contado con tan importantes profesionales.

A LA BIOL. SAHARAY CRUZ

Por ser no sólo mi maestra, sino también mi amiga. Por tu paciencia y consejos. Por enseñarme constantemente que siempre hay una salida y que el valor y la fuerza para enfrentar cualquier situación se llevan por dentro.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES: LIDIA GONZÁLEZ Y MIGUEL ÁNGEL ESTRADA

Gracias: por la oportunidad de existir, por su sacrificio en algún tiempo incomprendido, por su increíble esfuerzo para que yo tenga lo mejor, por su ejemplo de superación incansable, por su amor y amistad incondicional. Sabiendo que no existirá una forma de agradecer una vida de sacrificio y esfuerzo, quiero decirles que son las personas de quienes más he buscado aprobación porque los quiero, soy su hija y siempre van a ser el primer cariño que habita mi corazón y aquél cariño por el que le agradezco a Dios. El objetivo logrado también es de ustedes, con la promesa de seguir siempre adelante...

A MI HERMANA GABRIELA (POLLO)

Porque al crecer tu estabas ahí sosteniendo mi mano, orientándome cuando estaba perdida, viviendo mis triunfos y llorando mis fracasos, enseñándome que la vida es más que una simple expectativa. Gracias por todo tu apoyo y confianza y sobre todo, por ser la persona que más cree en mí. Gracias por ser, no sólo mi hermana sino mi amiga.

A MIS AMIGAS DE TODA LA VIDA: ROCHI, GIS Y LES (Lunita te quiero)

Por estar en cada uno de los altibajos de mi vida, en las risas y en el llanto, en mi locura y en mi estrés. Gracias por hacerme reír en las tardes grises. Por ser mis mejores amigas, por avanzar conmigo y no dejarme caer. Por soportarme en TODO momento y conocerme mejor que nadie. Son mis hermanas y no sé que haría sin ustedes, simplemente me perdería. Aún cuando nos separe un océano entero, seguiremos juntas. Las adoro.

Rochi = Alegría y paciencia. Gis = Inteligencia y sinceridad. Les = Diversión y Ternura.
Juntas = Son el complemento perfecto en la vida de una persona.

A MI PRIMITA SELENE

Por tus amenas conversaciones y singular alegría. Por estar presente en mi vida y por enseñarme que la familia es algo más que buenos momentos. Me asombra tu fortaleza y vulnerabilidad, tu inteligencia y audacia, tu ambición y perseverancia. Antes que mi prima, mi amiga.

A ADÁN

Por quererme como me quieres, por estar en mi pasado, mi presente y mi futuro. Mi amigo incondicional. Porque admiro al médico, al estudiante, al amigo y al hombre fenomenal que eres. Gracias por crecer conmigo, por apoyarme en mis aciertos y desaciertos. Por estar presente aún cuando yo no lo veía. Sabes que te quiero.

A MI FAMILIA ACADÉMICA: ROSA, LUIS, DIANA, CHIO, SOL, GERARDO, M. MARU, M. IRMA Y M. LAURA

Por ser una verdadera familia para mí y hacer de estos años los MEJORES de toda la carrera.

ROSS: Por ser no sólo mi compañera, sino mi amiga inseparable. Gracias por correr en mi auxilio todo el tiempo, por estar ahí incondicionalmente y hacerme reír; por tus palabras acertadas y por dejarme conocer a la maravillosa persona que eres. Me asombro diariamente por tu inteligencia, tranquilidad y nobleza. Sigamos adelante siempre. Te adoro.

DIANA (PS): Porque sin ti todo hubiera sido más difícil. Gracias por tu esfuerzo constante y por dejarme llamarte AMIGA. Fui MUY afortunada en tenerte como colega en este trabajo y más aún por tenerte como amiga y consejera.

LUIS: Eres de esa clase de personas que todo lo comprenden y dan lo mejor de si mismos sin esperar nada a cambio...sabes escuchar y brindar ayuda cuando es necesario y por ello te has ganado mi cariño. Gracias por tu presencia en esas largas tardes.

CHIO, SOL Y GERARDO: Gracias por hacerme reír diariamente y enseñarme que no todo es tan malo como parece, por su muy singular forma de ser, por sus opiniones y consejos en las tardes de confusión. Los quiero.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS: JULS, ANGI, RAMÓN, RUTH, MARCE, VICTOR, NANCY, SANDRA, CLARITA, KAREN, MAYRA, ROSALÍA, RAFA (Sabes que eres una de las personas mas importantes en mi vida, TSQD).

Y A TODAS LAS PERSONAS QUE HAN ESTADO PRESENTES DE ALGÚN MODO EN ESTE INCREÍBLE CAMINO.

Por los momentos compartidos, que son peldaños en mi vida y ya forman parte de mi esencia.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	1
Introducción	2
Vitamina C	4
Actividad antioxidante	6
Efecto pro-oxidante	8
Ión hierro	10
Interacción de la vitamina C con el ión hierro	13
Metil-metanosulfonato (MMS)	15
Prueba de mutación y recombinación somática (SMART)	19
Objetivo	20
Hipótesis	20
Materiales y métodos	21
Diagrama metodológico	23
Resultados	
Cruza estándar (E)	24
Cruza bioactivación elevada (BE)	30
Discusión	
Testigos VitC+FeSO ₄ y agua	35
MMS	37
Cotratamientos MMS 0.125, 0.250 y 0.375 mM + VitC+FeSO ₄	38
Tamaño del clon <i>mwh</i>	41
Conclusiones y recomendaciones	42
Referencias	43
Apéndice I	55
Apéndice II	58
Apéndice III	61

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y GRÁFICAS.

FIGURAS

Figura 1.	Diagrama esquemático donde se muestran los puntos en los cuales los compuestos de la dieta con propiedades antimutagénicas pueden impactar potencialmente en la probabilidad de una mutación en humanos. ROS: especies reactivas de oxígeno; XME: metabolismo xenobiótico (Modificado de Ferguson y cols., 2004).	3
Figura 2.	Estructura química de la VitC (Murray y cols., 1997).	4
Figura 3.	Mecanismo de la destrucción de radicales libres por la VitC (Ballester, 1996).	5
Figura 4.	Oxidación, regeneración y descomposición de la VitC (Modificado de Halliwell, 1999).	7
Figura 5.	Vía pro-oxidante de la VitC (Modificado de Rietjens y cols., 2002).	9
Figura 6.	Esquema de un citocromo (Modificado de Ophardt, 2003).	10
Figura 7.	Ciclo biológico del hierro. Distribución e intercambio entre los distintos compartimentos (Boccio y cols., 2003).	11
Figura 8.	Reacción de Fenton (Kitts, 1997).	11
Figura 9.	Modelo para explicar la modificación dada en el ADN por la reacción Fenton (<i>in situ</i>) (Meneghini, 1997).	12
Figura 10.	Acción oxidante del complejo hierro-VitC (Modificada de CSIC, 2007).	14
Figura 11.	Estructura química del metil-metanosulfonato (MMS) (NIH, 2007).	15
Figura 12.	Sistema de reparación por escisión de bases (Modificado de Pinto y cols., 2003).	18
Figura 13.	<i>Drosophila melanogaster</i> .	55
Figura 14.	Ciclo vital de <i>Drosophila melanogaster</i> (Modificado de <i>Primers in Biology</i> , 2008).	56
Figura 15.	Morfología, localización y estructuras del adulto a las que darán lugar los discos imagales de <i>Drosophila melanogaster</i> (Modificado de <i>Primers in Biology</i> , 2008).	57
Figura 16a	Eventos que ocasionan la pérdida de heterocigosis para los	62
Figura 16b	marcadores <i>flr³</i> y <i>mwh</i> en <i>Drosophila melanogaster</i> .	63

CUADROS

Cuadro I.	Especies reactivas “atrapadas” por la VitC (Modificado de Naidu, 2003).	7
Cuadro II.	Resumen de resultados obtenidos con SMART para la cruza E y su diagnóstico estadístico, después del tratamiento crónico a larvas ($72 \pm 4h$) con metil-metanosulfonato (MMS), vitamina C (VitC) y sulfato ferroso ($FeSO_4$).	25
Cuadro III.	Resumen de resultados obtenidos de la comparación de los cotratamientos con sus respectivos testigos, obtenidos con SMART para la cruza E y su diagnóstico estadístico, después de tratamiento crónico a larvas ($72 \pm 4h$) con metil-metanosulfonato (MMS), vitamina C (VitC) y sulfato ferroso ($FeSO_4$).	28
Cuadro IV.	Resumen de resultados obtenidos con SMART para la cruza BE y su diagnóstico estadístico, después de tratamiento crónico a larvas ($72 \pm 4h$) con metil-metanosulfonato (MMS), vitamina C (VitC) y sulfato ferroso ($FeSO_4$).	33
Cuadro V.	Resumen de resultados obtenidos de la comparación de los cotratamientos con sus respectivos testigos, obtenidos con SMART para la cruza BE y su diagnóstico estadístico, después de tratamiento crónico a larvas ($72 \pm 4h$) con metil-metanosulfonato (MMS), vitamina C (VitC) y sulfato ferroso ($FeSO_4$).	34
Cuadro VI.	Primera línea de defensa antioxidante	54
Cuadro VII.	Marcadores que presenta <i>D. melanogaster</i> .	60

GRÁFICAS

Gráfica 1.	Frecuencia de manchas totales/individuo para los testigos: agua, VitC, $FeSO_4$ y VitC+ $FeSO_4$, (Cruza E y BE). E: Estándar; BE: Bioactivada. ☆ Resultados estadísticamente significativos ($P < 0.05$).	24
Gráfica 2.	Frecuencia de los diferentes tipos de manchas/individuo para los testigos: agua, MMS (0.125, 0.250 y 0.375 mM), VitC+ $FeSO_4$, y los cotratamientos VitC+ $FeSO_4$ +MMS (0.125, 0.250 y 375 mM) (Cruza E). ☆ Resultados estadísticamente significativos ($P < 0.05$).	27

Gráfica 3.	Regresión polinómica entre la frecuencia de manchas/individuo obtenidas en los testigos MMS (0.125, 0.250 y 0.375 mM) y con los cotratamientos MMS+VitC+FeSO ₄ (Cruza E), donde se muestra una concentración-respuesta polinomial (ver ecuaciones). En la concentración 0.250 mM (↓) el cotratamiento provocó una disminución significativa con respecto al testigo MMS.	29
Gráfica 4.	Frecuencia del tamaño del clon <i>mwh</i> /individuo, cruza E, en las diferentes concentraciones (cotratamientos y testigos). (↓) Disminución estadísticamente significativa con respecto al testigo MMS (P < 0.05).	30
Gráfica 5.	Frecuencia de los diferentes tipos de manchas/individuo para los testigos: agua, MMS (0.125, 0.250 y 0.375 mM), VitC+FeSO ₄ , y los cotratamientos VitC+FeSO ₄ + MMS (0.125, 0.250 y 0.375 mM) (Cruza BE). ☆ Resultados estadísticamente significativos (P < 0.05).	32
Gráfica 6.	Regresión entre la frecuencia de manchas/individuo y el tratamiento con diferentes concentraciones de MMS (0.125, 0.250 y 0.375 mM) (Cruza BE) en donde se observa la concentración-respuesta polinomial (ver ecuaciones). En la concentración 0.375 mM (↓) el cotratamiento provocó una disminución significativa con respecto al testigo MMS.	35
Gráfica 7.	Frecuencia del tamaño del clon <i>mwh</i> /individuo, cruza BE, en las diferentes concentraciones (cotratamientos y testigos). (↓) Disminución estadísticamente significativa con respecto al testigo MMS (P < 0.05).	36

ABREVIATURAS

8-oxo-dA	8-oxo-7,8-dihidro-desoxiadenosina
8-oxo-dG	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
ADN	Ácido deoxirribonucleico
AP	Sitiosapurínicos/apirimídicos
BE	Cruza bioactivación elevada
BER	Sistema de reparación por escisión de bases
CH ³⁺	Ión metilo
CoCl ₂	Cloruro de cobalto
CYP450	Citocromos P450
DHAA	Ácido dehidroascórbico
DIM	Medio Instantáneo Carolina
E	Cruza estándar
Fe ²⁺	Ión férrico
Fe ³⁺	Ión ferroso
FeSO ₄	Sulfato ferroso
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HR	Humedad relativa
MMS	Metil-metanosulfonato
NADH	Ubiquinona oxidorreductasa
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NDMA	<i>N</i> -nitroso-dimetilamina
O ₂	Oxígeno
O ₂ ^{•-}	Anión superóxido
OH [•]	Radical hidroxilo
RDA	Cantidad diaria recomendada
ROS	Especies reactivas de oxígeno

Semi-DHAA	Semidehidroascórbico o radical ascorbil
SMART	Prueba de mutación y recombinación somáticas
VitC	Vitamina C

RESUMEN

La exposición a determinados compuestos químicos se relaciona con un incremento en las mutaciones por lo que el estudio de aquellos que poseen propiedades antimutágenicas y anticancerígenas es importante. La vitamina C (VitC) ha mostrado propiedades antimutagénicas *in vitro* e *in vivo*, y tiene un papel controversial, al exhibir efectos pro-oxidantes en presencia de metales de transición aumentando las especies reactivas de oxígeno. Se realizó la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) en ala de *Drosophila melanogaster* para contribuir al conocimiento de los efectos que la VitC pudiera tener en presencia del hierro y de diferentes concentraciones de metil-metanosulfonato (MMS), un agente alquilante directo. Larvas de 72 ± 4 h de edad, de las cruzas estándar (E) y bioactivación elevada (BE) de *D. melanogaster*, fueron alimentadas por 48 h con VitC (5.6 mM), FeSO_4 (0.2 mM) y MMS (0.125, 0.250 y 0.375 mM). Para la craza E, se encontró un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de manchas para los testigos VitC, FeSO_4 y VitC + FeSO_4 , y para la craza BE se observó una disminución. La acción alquilante directa del MMS se confirmó en ambas cruzas y depende de la concentración. Las mezclas MMS (0.250 y 0.375 mM) + VitC + FeSO_4 disminuyeron significativamente las frecuencias de manchas en las cruzas E y BE, respectivamente. Se propone que el aumento de frecuencias en los testigos sea por efecto pro-oxidante (cruza E) y que la disminución (cruza BE) sea por inducción del sistema de reparación y apoptosis. Para explicar la disminución en los cotratamientos se proponen tres hipótesis: (1) la acción antioxidante de la VitC reduce la inducción genotóxica por el MMS; (2) una competencia por parte de la VitC con los sitios nucleofílicos del ADN por el MMS; (3) la acción pro-oxidante de la VitC que en presencia del FeSO_4 aumente los sistemas de reparación del ADN que eliminan deficientemente el daño.

INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental global como consecuencia de un crecimiento vigoroso de la industria y el desarrollo de la civilización humana, produce un incremento en mutaciones genéticas y un alto riesgo de padecer cáncer; es por esto que la exploración de compuestos que poseen propiedades antimutágenicas y anticancerígenas es de gran importancia (Odin, 1997). Para ello, es necesario recurrir a ensayos genotóxicos que tienen como objetivo principal evidenciar qué tipo de daño se produjo en el ADN y como actuó el agente genotóxico (Sánchez-Lamar y cols., 2000). Se ha estudiado intensamente la capacidad genotóxica (mutagénesis, recombinogénesis, clastogénesis) de diferentes agentes cotidianos, pero también se ha hecho evidente la necesidad de encontrar compuestos que inhiban, retarden o reviertan estos procesos (Lehman y cols., 2000).

Bajo esta perspectiva, la dieta puede ser un factor clave en determinar la estabilidad genómica por su impacto en todos los mecanismos relacionados con ello (exposición a cancerígenos, activación/desintoxicación de agentes químicos, síntesis y reparación del ADN) y el desencadenamiento a la apoptosis (Figura 1) (Ferguson y cols., 2004).

En este contexto, se ha puesto especial atención a la vitamina C (VitC) por sus propiedades antimutagénicas tanto *in vitro* como *in vivo* (Naidu, 2003; Lutsenko y cols., 2002; Ames, 2001; Griffiths y Lunec, 2001; Cooke y cols., 1998; Odin, 1997), sin embargo, su papel es controversial, al exhibir efectos pro-oxidantes en presencia de metales de transición, como el Fe^{2+} y el Cu^{2+} (Rietjens y cols., 2002; Griffiths y Lunec, 2001; Fahey y Talalay, 1999; Kitts, 1997).

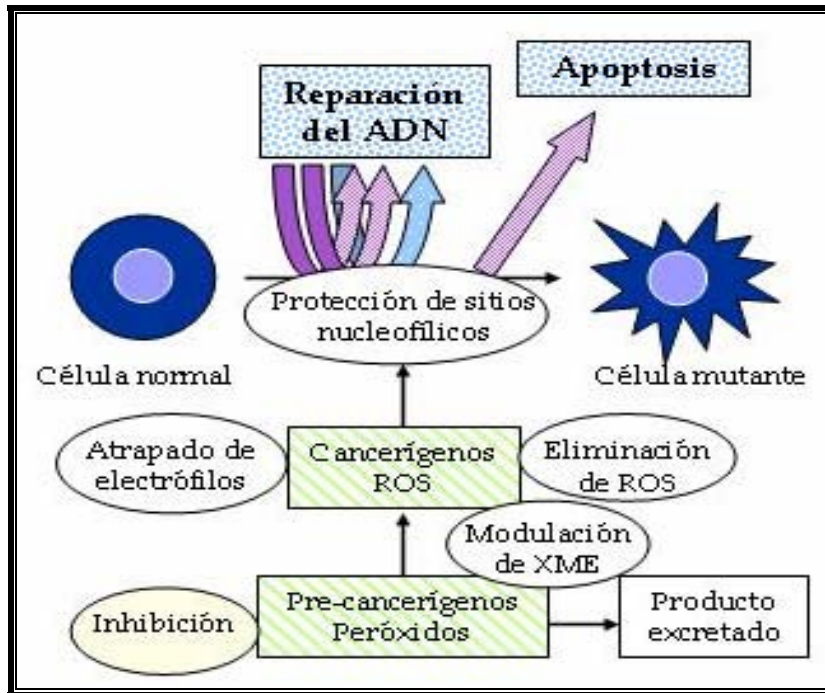


Figura 1. Diagrama esquemático donde se muestran los puntos en los cuales los compuestos de la dieta con propiedades antimutagénicas pueden impactar potencialmente en la probabilidad de una mutación en humanos. ROS: especies reactivas de oxígeno; XME: metabolismo xenobiótico (Modificado de Ferguson y cols., 2004).

VITAMINA C

La VitC también conocida como ácido ascórbico, es un compuesto hidrosoluble que actúa como agente reductor en reacciones de hidroxilación o reacciones de oxidoreducción por sus dos grupos donadores de protones (Figura 2). Es considerada como el agente reductor más reactivo que puede ocurrir en forma natural en el tejido vivo (Soto-Vega, 2005); es un nutriente esencial para el ser humano, ya que éste no puede sintetizarlo por sí solo debido a la ausencia de la enzima L-gulonolactona oxidasa (Murray y cols., 1997). La VitC solamente se encuentra en concentraciones significativas en frutas y verduras como: pimientos, cítricos, coles, coliflor, espinacas, papas, plátanos, mangos, piña, etc. y la cantidad diaria recomendada (RDA por sus siglas en inglés: Recommended Daily Allowances) para el humano, es de 75 a 90 mg/día para evitar los daños que provocan sus deficiencias (Fenech, 2002). Esta vitamina es fundamental para la biosíntesis de proteínas como colágena, carnitina, neurotransmisores, péptidos neuroendocrinos, además participa en la degradación de tirosina, en el metabolismo de carbohidratos, etc. (Soto-Vega, 2005; Naidu, 2003; Murray y cols., 1997).

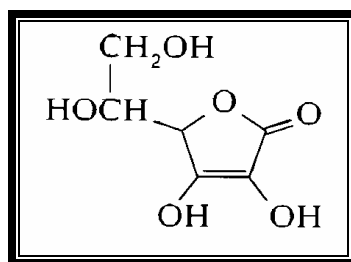


Figura 2. Estructura química de la VitC (Murray y cols., 1997).

Existen reportes científicos y revisiones, en donde se discute la naturaleza de la VitC, dado que tiene una actividad pro-oxidante bajo ciertas condiciones. Podmore y cols. (1998) evaluaron en linfocitos periféricos de voluntarios bajo suplementación de VitC (500 mg/día), niveles de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dG) y de

8-oxo-7,8-dihidro-desoxiadenosina (8-oxo-dA) como marcadores de daño al ADN por ROS encontrando una disminución y un incremento significativos respectivamente, lo que sugiere que esta vitamina exhibe simultáneamente propiedades pro-oxidantes y antioxidantes.

Por otra parte, la VitC destruye ciertos radicales que se forman en el propio organismo o provienen de productos que se ingieren o se inhalan (humo del tabaco, alimentos a la brasa marcadamente carbonizados, etc.) Este mecanismo ocurre cuando el anión ascorbato entra en contacto con un radical y lo inactiva, dando como resultado la forma reversible oxidada de la VitC (Figura 3) (Ballester, 1996).

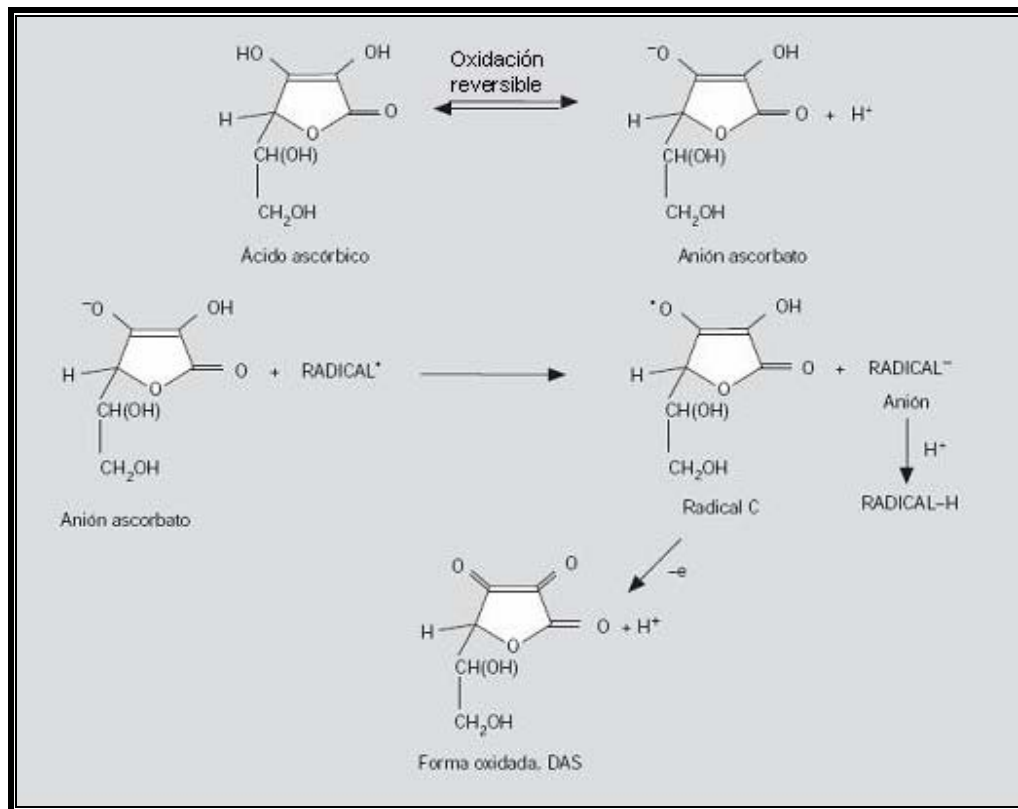


Figura 3. Mecanismo de la destrucción de radicales libres por la VitC (Ballester, 1996).

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La VitC es un potente antioxidante y esto se debe a que es un donador de electrones, lo que explica que sea un reductor que directamente neutraliza o disminuye el daño ejercido por especies muy reactivas, denominadas radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés: Reactive Oxygen Species) (Cuadro I) (Apéndice I). Tanto los radicales libres derivados del oxígeno, del nitrógeno y sulfoderivados o mixtos, dañan por oxidación cualquier macromolécula (García y cols., 2006; Kitts, 1997).

Bioquímicamente, cuando la VitC se oxida en la presencia de ROS, dona dos de sus electrones desde un doble enlace entre los carbonos de las posiciones 2 y 3; esta donación es secuencial, ya que la primera especie molecular, generada tras la pérdida de un electrón, es un radical libre denominado ácido semidehidroascórbico (semi-DHAA) o radical ascorbil, que es regularmente no reactivo (Kitts, 1997). Si por algún motivo el ascorbil se torna potencialmente reactivo, los sistemas del tipo ascorbil-reductasa se encargan de neutralizarlos; entre éstos se encuentran los dependientes de NADH y la tiorredoxinoreductasa dependientes de NADPH. Cuando dona el segundo electrón, se forma el ácido dehidroascórbico (DHAA) que posee una vida media en el rango de minutos, que depende del pH y la temperatura. Tanto el ascorbil como el DHAA son reducidos hacia ácido ascórbico, pero sólo parcialmente, de tal forma que no se recupera en su totalidad (Figura 4). De esta manera, la VitC convierte a los radicales libres en productos no reactivos, actuando como un antioxidante que puede proteger del daño a biomoléculas *in vivo* (García y cols., 2006; Halliwell, 1999).

Cooke y cols. (1998), demostraron la remoción del 8-oxo-dG en suero y orina de voluntarios tratados con 500 mg/día de VitC (6 semanas) sugiriendo que esta vitamina actúa como un antioxidante, recogiendo radicales libres mientras interviene en la regulación de las enzimas de reparación del ADN. De manera similar, Konopacka y cols. en 1998, encontraron en ratones, un efecto protector del daño en el

ADN por radiación gama en post-tratamiento de VitC (400mg/kg/día). Estos autores sugieren que esta disminución se debe a sus propiedades antioxidantes.

Cuadro I. Especies reactivas “atrapadas” por la VitC (Modificado de Naidu, 2003).

ESPECIES QUÍMICAS	VELOCIDAD DE REACCIÓN (M ⁻¹ S ⁻¹)
Especies Reactivas de Oxígeno	
Radical hidroxilo (OH•)	1.1 x 10 ¹⁰
Radical alcoxil (RO•)	1.6 x 10 ⁹
Radical peroxil (ROO•)	1.2 x 10 ⁶
Radical hidroperoxil / Anión superóxido (O ₂ • ⁻)	1.0 x 10 ⁵
Especies Reactivas de Nitrógeno	
Trióxido de dinitrógeno / tetraóxido de dinitrógeno (N ₂ O ₄ •)	1.2 x 10 ⁹
Peroxinitrito / Ácido peroxi-nitroso (ONOO•)	235
Radicales Antioxidantes	
Radical alfa-tocoferol	2 x 10 ⁵
Radical til / sulfenil	6 x 10 ⁸

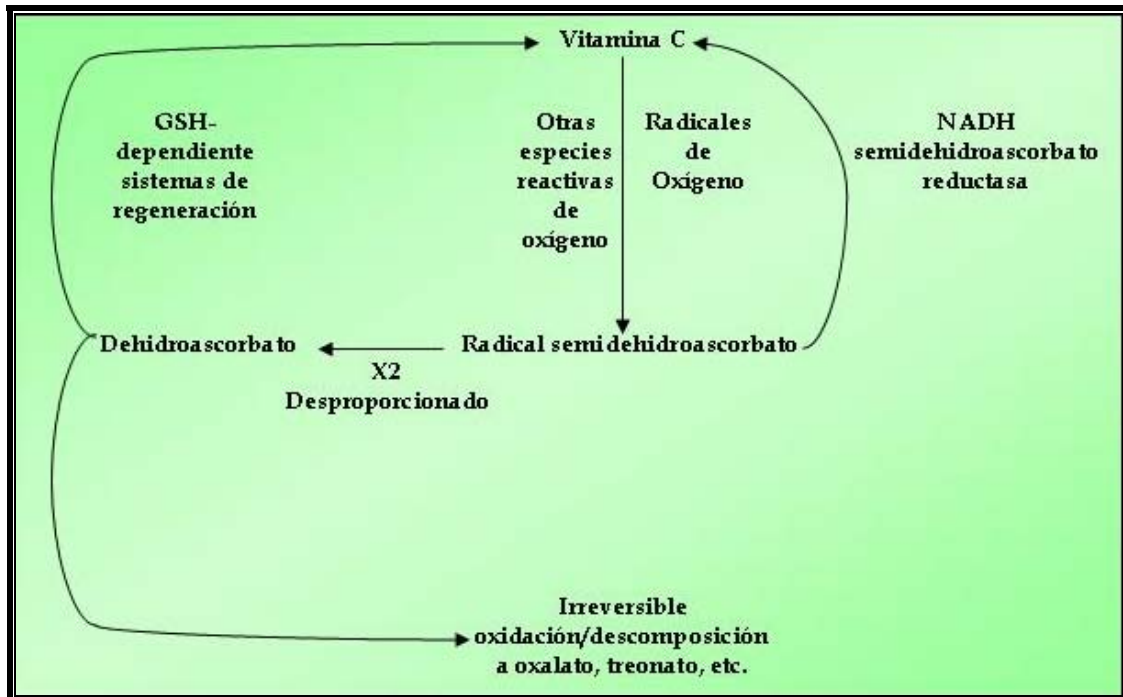


Figura 4. Oxidación, regeneración y descomposición de la VitC (Modificado de Halliwell, 1999).

EFECTO PRO-OXIDANTE

La actividad pro-oxidante de la VitC, depende tanto de la dosis en la dieta como de la presencia de metales de transición, como el fierro y el cobre libres, para que se produzcan reacciones tipo Fenton y esto es amplificado por la presencia adicional de ciertos radicales libres en el medio circundante (Fraga y Oteiza, 2002; Proteggente y cols., 2000). Lo anterior, dependería también de la reacción de la VitC con ciertas moléculas. Por ejemplo, la VitC (25, 75 y 250 mM) en co-tratamiento con cloruro de cobalto (CoCl_2) induce un incremento significativo en la frecuencia de manchas en alas de *D. melanogaster*, debido a la producción de radicales OH^\bullet por efecto del H_2O_2 (vía la reacción de Fenton) y por tanto, inducen su actividad pro-oxidante (Kaya y cols., 2002).

Cuando el Fe^{3+} está presente, la VitC puede convertirlo a Fe^{2+} , el cual subsecuentemente reacciona con O_2 o H_2O_2 , dando como resultado la formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y OH^\bullet (Figura 5) (Rietjens y cols., 2002). En ocasiones las células utilizan las propiedades pro-oxidantes a favor de la generación de radicales libres específicos (García y cols., 2006).

Una característica importante de la acción pro-oxidante de la VitC, es la estimulación que provoca para llevar a apoptosis, lo cual es empleado para el tratamiento de diferentes líneas celulares tumorales (Park y cols., 2004; Horváthóva y cols., 1998). Otros autores (Franke y cols., 2005; Halliwell, 1999) coinciden con lo anterior ya que la VitC actúa como pro-oxidante, provocando un incremento en la actividad de reparación en el ADN, ya que promueven la oxidación en este nucleico, así como la oxidación en lípidos y proteínas *in vitro*.

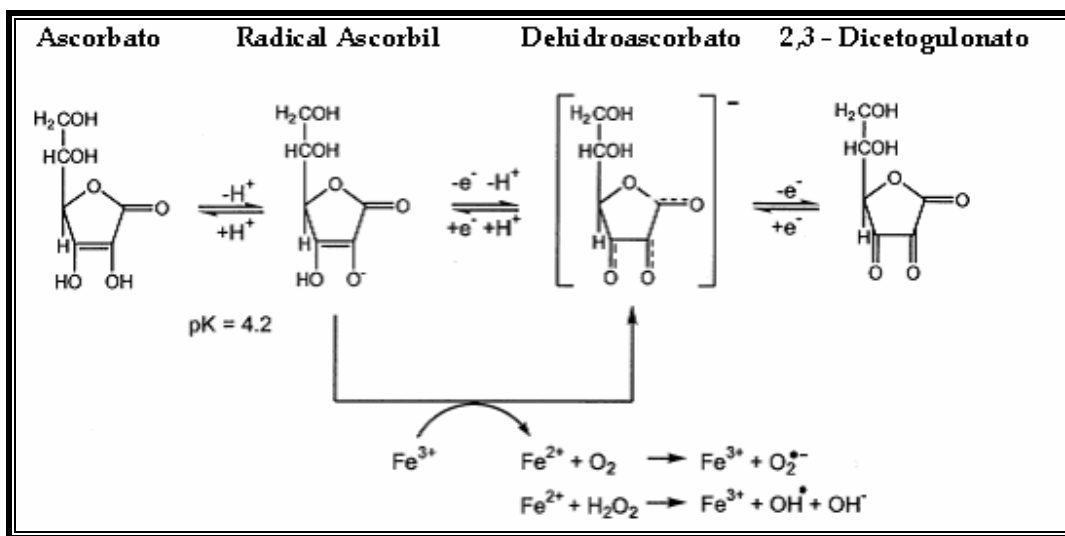


Figura 5. Vía pro-oxidante de la VitC (Modificado de Rietjens y cols., 2002).

IÓN FIERRO

El hierro es un elemento esencial para la vida puesto que participa prácticamente en todos los procesos de oxidación-reducción. Lo podemos hallar formando parte esencial de las enzimas del ciclo de Krebs, en la respiración celular y como transportador de electrones en los citocromos (Figura 6). Interviene en el crecimiento y la multiplicación celular y es necesario para que la enzima ribonucleótido reductasa catalice la reducción de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos, por lo tanto es clave en la síntesis del ADN (Blanco, 1999).

En los alimentos, el hierro se encuentra formando parte de dos grupos diferentes, uno de hierro hémico y otro de hierro no hémico (Forellat y cols., 2000). El de tipo hémico, es el que forma parte de la hemoglobina, mioglobina y muchas otras hemoproteínas. El de tipo no hémico corresponde a aquél que no se encuentra unido al grupo hemo; básicamente está formado por sales inorgánicas que se encuentran principalmente en los alimentos de origen vegetal (Blanco, 1999).

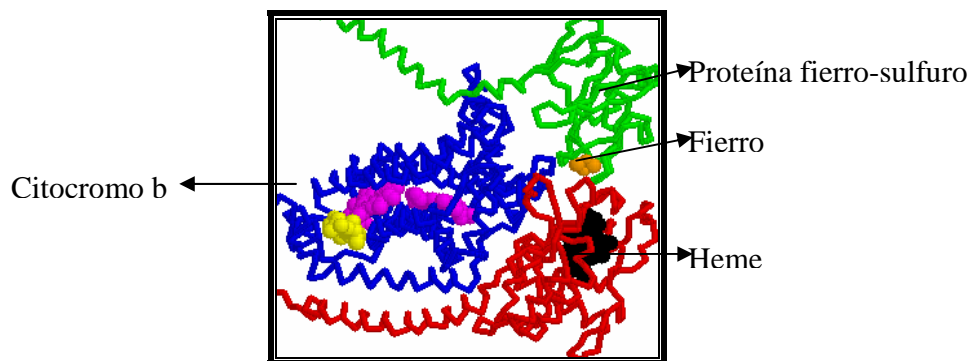


Figura 6. Esquema de un citocromo (Modificado de Ophardt, 2003).

En condiciones normales, la cantidad de hierro ingerida es de aproximadamente unos 10-14 mg por día; en el duodeno y en la porción superior del intestino delgado se absorben unos 0,5 a 2 mg. Una vez que el hierro es absorbido por

los enterocitos de la mucosa intestinal, éste pasa al plasma donde es transportado por la transferrina a los diferentes tejidos y órganos (Figura 7) (Boccio y cols., 2003).

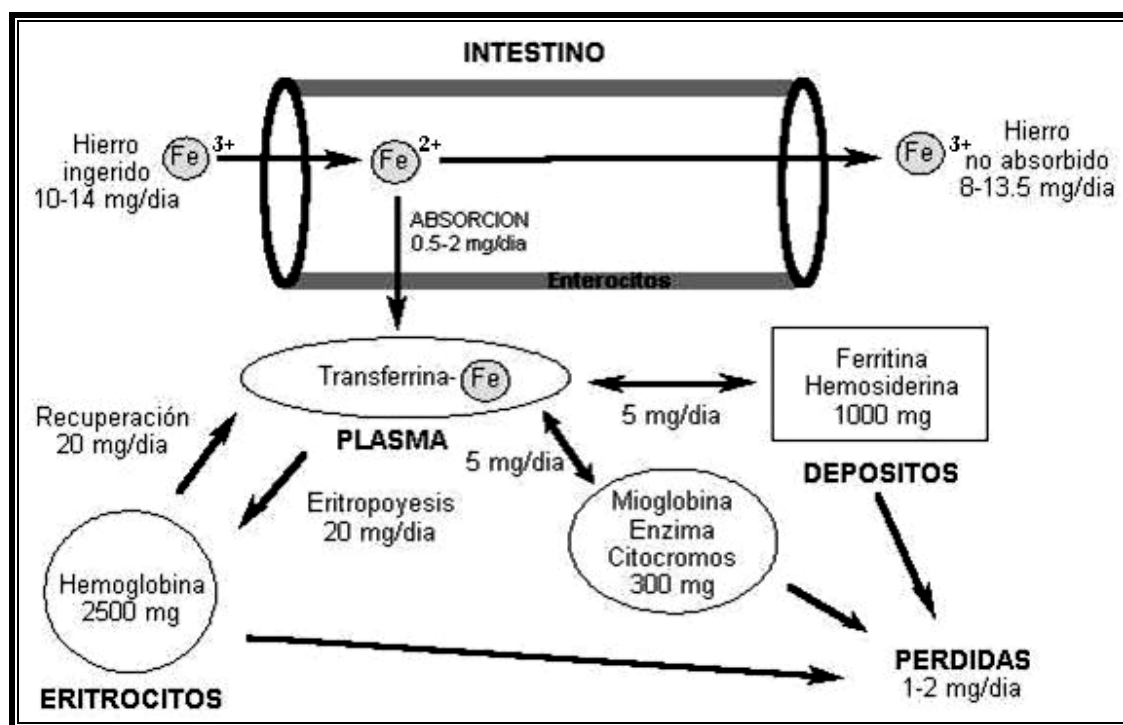


Figura 7. Ciclo biológico del hierro. Distribución e intercambio entre los distintos compartimentos (Boccio y cols., 2003).

La toxicidad del hierro, proviene por su capacidad para catalizar la formación de ROS, debido a que transfiere un electrón al di-oxígeno, generando radicales $\text{O}_2^{\bullet-}$, los cuales son precursores de H_2O_2 . Éste reacciona con Fe^{2+} para producir un potente oxidante, que es el OH^{\bullet} . Este proceso es conocido como Reacción de Fenton (Figura 8) (IUPAC, 2003; De Freitas y Meneghini, 2001; Kitts, 1997).

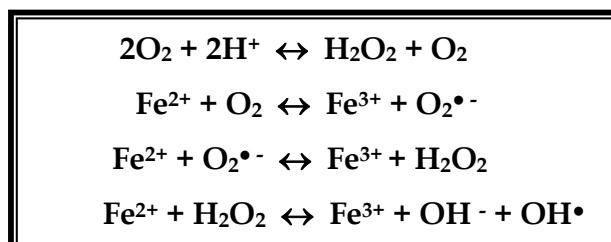


Figura 8. Reacción de Fenton (Kitts, 1997).

Los $O_2^{\cdot-}$ reaccionan más rápidamente con los grupos sulfuro de las proteínas, mientras que los OH^{\cdot} , reaccionan con todas las macromoléculas (Figura 9) (Meneghini, 1997). Erichsen y cols. (2005), reportaron que la suplementación con $FeSO_4$ (200 mg/día) a pacientes con deficiencia de hierro, provocó un incremento en la peroxidación lipídica con respecto a los que habían consumido el placebo.

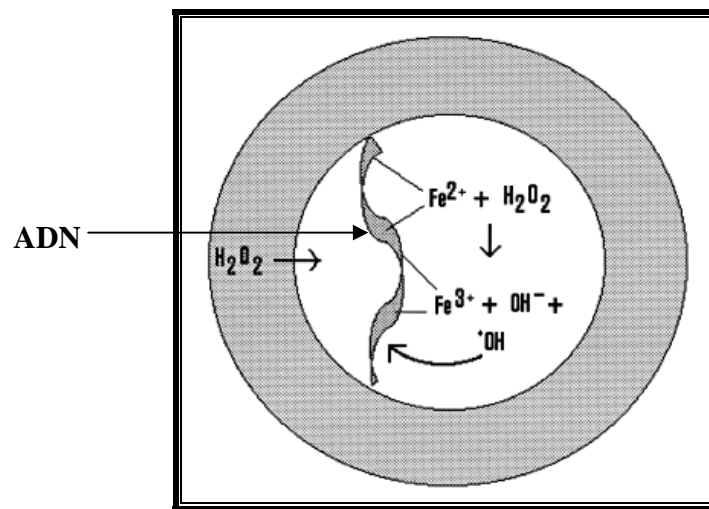


Figura 9. Modelo para explicar la modificación dada en el ADN por la reacción Fenton (*in situ*) (Meneghini, 1997).

INTERACCIÓN DE LA VITAMINA C CON EL IÓN FIERRO

La VitC es conocida por aumentar la disponibilidad y absorción del hierro (distinto al del grupo hemo) (Murray y cols., 1997). Ya se ha mencionado que en la presencia de hierro libre, dicha vitamina actúa como pro-oxidante y puede contribuir a la formación de $\text{OH}\cdot$ y $\text{O}_2\cdot^-$, los cuales eventualmente ocasionan la oxidación de las macromoléculas (Figura 10) (Halliwell, 1999). Sin embargo, Proteggente y cols. (2000), reportaron en voluntarios sanos bajo suplementación de VitC mas hierro (260 mg/día - 14 mg/día), una disminución significativa de 8-oxo-dG en lugar de un incremento como se esperaba, concluyendo que no hay suficiente evidencia para afirmar una actividad pro-oxidante de la suplementación con VitC *in vivo*, en presencia o ausencia de hierro. En otro estudio, Rehman y cols., (1998) demostraron que la suplementación con hierro (14 mg/día) y VitC (60 mg/día - 260 mg/día) en voluntarios, con niveles iniciales bajos de ascorbato en plasma, presentaron una disminución en los niveles de daño oxidativo en el ADN. Sugieren que esta disminución puede ser por la capacidad de atrapar las ROS por parte de la VitC, por un aumento en las enzimas de reparación del ADN o un mejor secuestro o quelación del hierro. De manera similar, Suh y cols. (2003), mostraron que aún en la presencia de hierro (1 mM) y/o H_2O_2 (1 mM), la VitC (1 mM) actúa como un antioxidante que previene la peroxidación lipídica, y no promueve oxidación proteica en plasma humano *in vitro* aun bajo las condiciones más extremas de estrés oxidativo.

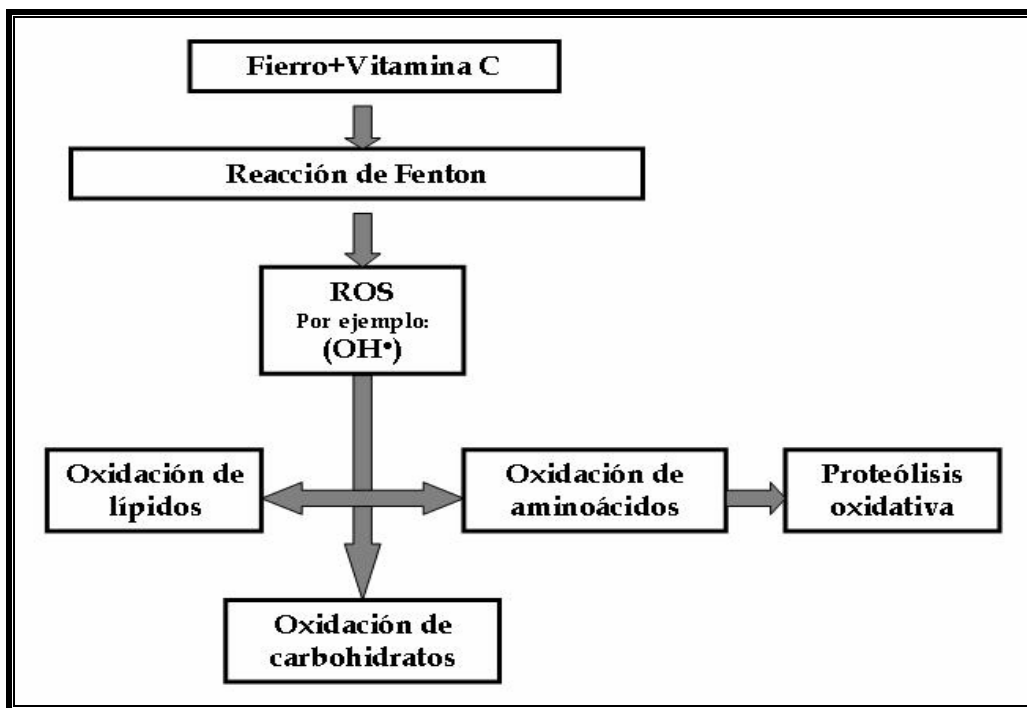


Figura 10. Acción oxidante del complejo hierro-VitC (Modificada de CSIC, 2007).

METIL-METANOSULFONATO (MMS)

Los agentes alquilantes son conocidos por su habilidad de generar metilos que interactúan con diferentes tipos de macromoléculas como el ADN. Su acción puede ser: indirecta o directa. Los agentes indirectos como la *N*-nitroso-dimetilamina (NDMA) requieren activación enzimática para provocar daño; los de acción directa reaccionan con las macromoléculas sin requerir de una activación metabólica por los citocromos P450 (CYP450), como es el caso del metil-metanosulfonato (MMS) (Figura 11) (Friedberg y cols., 1995).

El MMS es un líquido incoloro extremadamente irritante, anteriormente utilizado como insecticida y fármaco antineoplásico o citostático en tratamientos contra el cáncer (NIH, 2007). Fue uno de los primeros en utilizarse para tratar los tumores malignos, ya que es activo durante todo el ciclo celular, aunque se ha reportado que las células son más sensibles al MMS durante la fase S del ciclo celular (Chang y cols., 2002).

Este alquilante es tóxico, cancerígeno y mutagénico, con una gran afinidad a centros nucleofílicos del ADN como el N⁷G (Chang y cols., 2002). Tiene propiedades electrofílicas y una alta selectividad nucleofílica (*s-value* 0.83), debido a que el reactivo final del MMS es el ión metilo (CH³⁺), además presenta una vía de reacción alquilante SN₂, de tipo monofuncional porque sólo dona un metilo a cualquier oxígeno o nitrógeno de las bases nitrogenadas, excepto el N¹ de la pirimidinas y el N⁹ de las purinas que se unen a la d-ribosa (Jenkins y cols., 2005).

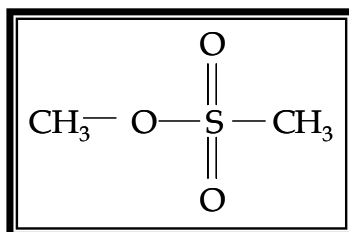


Figura 11. Estructura química del metil-metanosulfonato (MMS) (NIH, 2007).

El MMS provoca aductos en el ADN, unión entre cadenas (*cross links*) entre dos moléculas ADN-ADN y ADN-proteínas, así como rompimientos que pueden generar aberraciones cromosómicas y otros daños. De esos aductos (Jenkins y cols., 2005) las proporciones son:

81-83% en N ⁷ G	0.6% en N ³ G
10.4-11.3% en N ³ A	0.3% en O ⁶ G
1.8% en N ⁷ A	<1 en N ³ C

La alquilación del oxígeno en los enlaces fosfodiéster produce fosfotriésteres en 1% (Friedberg y cols., 1995) además el MMS puede inducir daño oxidativo (Franke y cols., 2005; Horváthóva y cols., 1998).

Debido a que los aductos predominantes N⁷G y N³A no son mutagénicos por sí mismos, se clasifica como un mutágeno relativamente débil (Chang y cols., 2002), ya que puede ocurrir la replicación sin desemparejamientos, aunque tienden a formar sitios apurínicos/apirimídicos (AP). Cuando posteriormente se inserta una base incorrecta, o después de la replicación, estos sitios producen mutaciones, y en caso de que hayan provocado rupturas simples éstas se convierten en dobles (Jenkins y cols., 2005).

Un factor que puede determinar el umbral de respuesta genotóxica del MMS, es el sistema de reparación por escisión de bases (BER por sus siglas en inglés: Base Escisión repair) pues interviene en la reparación de los N⁷-MeG y N³-MeA (Jenkins y cols., 2005; Glaab y cols., 1999). Por otra parte, Seidel y cols. (2004) reportaron en líneas celulares de ratón (MEFs, MB16tsA y MB36.3) que el MMS altera la expresión de los genes asociados con la apoptosis, lo que puede estar envuelto en la respuesta al estrés y la desintoxicación. BER es considerado el sistema de reparación predominante del ADN en células de mamíferos para eliminar lesiones pequeñas, generadas por compuestos exógenos o endógenos (Sobol y cols., 2002). En *Drosophila melanogaster* (Apéndice II) se ha reportado que éste es uno de los cinco principales mecanismos de reparación (De Buendía, 1998).

En términos generales este sistema de reparación actúa así (Figura 12) (Pinto y cols., 2003):

- 1) BER se inicia con el reconocimiento del daño en una a siete bases del ADN.
- 2) Las ADN glicosilasas rompen el enlace glucosídico entre el C¹ de la desoxirribosa y el N¹ de las pirimidinas o el N⁹ de las purinas, formando sitios AP.
- 3) Las AP-endonucleasas rompen el enlace azúcar-fosfato en el sitio AP de los sitios 5' ó 3' cercanos al daño.
- 4) Las exonucleasas (también nombradas dRpasas) eliminan los residuos del esqueleto azúcar-fosfato sin bases.
- 5) Una vez que se ha eliminado la zona dañada, la ADN polimerasa I sintetiza el segmento faltante (5'→3').
- 6) Una ADN ligasa sella el corte que queda en el extremo 3'-OH de la última base insertada, cerrando así el hueco.

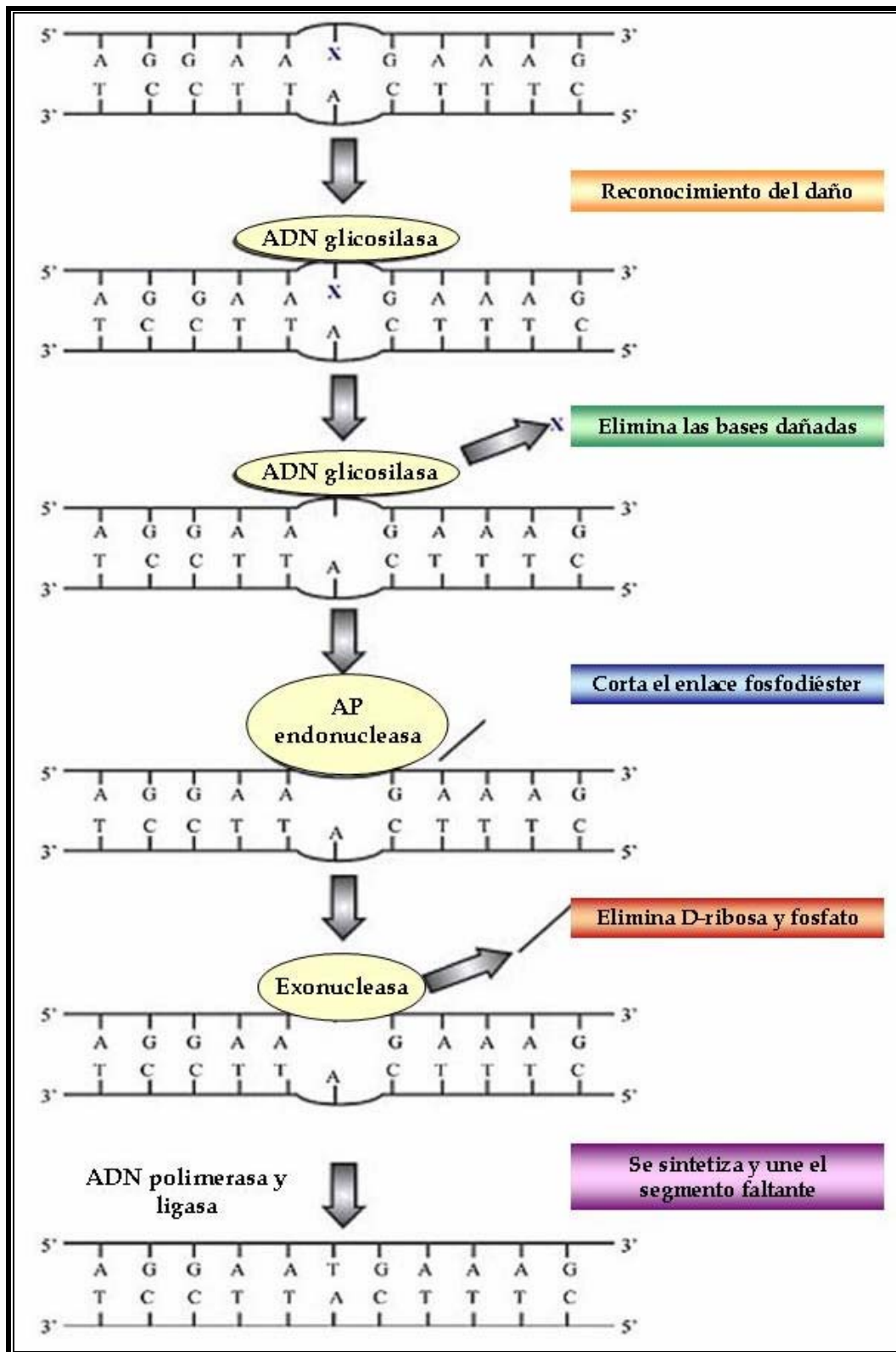


Figura 12. Sistema de reparación por escisión de bases (Modificado de Pinto y cols., 2003).

PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICAS

La prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) (Apéndice III) en el ala de *D. melanogaster* fue diseñada para detectar *in vivo* eventos mutagénicos (mutaciones puntuales, deleciones, aneuploidías y recombinación) provocados por agentes químicos (Graf y cols., 1984). Esta prueba ha demostrado ser eficaz al confirmarse con más de 400 agentes químicos, puros y en mezclas (Graf y cols., 1998). Tiene como fundamento la pérdida de heterocigosis de genes marcadores en células de los discos imagales de las larvas que se expresa como manchas o clones de tricomas en alas de los organismos adultos.

Tomando en cuenta que *D. melanogaster* tiene genes similares al del humano (Culliton, 2000) se utiliza para predecir la posible genotoxicidad y antigenotoxicidad en mamíferos (Sharpe y cols., 2002). Este organismo eucarionte ha sido utilizada en la prueba SMART en tratamiento crónico con MMS por 48 h (Vega-Contreras, 2006; Dueñas-García y cols., 2005; Kaya, 2003; Lehmann y cols., 2000; Santos y cols., 1999; Rodríguez-Arnaiz y cols., 1996; Graf y cols., 1995, y en tratamiento agudo (Heres-Pulido, 2001; Rodríguez-Arnaiz y cols., 1996).

OBJETIVO

Evaluar la interacción de la VitC, el ión hierro y diferentes concentraciones de metilmetanosulfonato (MMS) con la prueba SMART en ala de *Drosophila melanogaster*, en las cruza estándar (E) y bioactivación elevada (BE).

HIPÓTESIS

- * Si se exponen las larvas a diferentes concentraciones de MMS, se observarán diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias de manchas en alas de *D. melanogaster* que tendrán una relación concentración-respuesta.
- * Si el $\text{Fe}^{2+,3+}$ modula la acción de la VitC, por medio de la reacción Fenton, entonces se observarán un aumento estadísticamente significativo en las frecuencias de manchas en alas de *D. melanogaster*, en presencia y ausencia de este ión.
- * Si las concentraciones de VitC (5.6 mM) y FeSO_4 (0.2 mM) aumentan las ROS y existe una interacción con el daño producido por el MMS, entonces se observará un aumento estadísticamente significativo en las frecuencias de manchas en alas de *D. melanogaster* con respecto al testigo MMS, debido al efecto pro-oxidante de la VitC, en presencia del $\text{Fe}^{2+,3+}$.
- * Si ocurre dicha interacción entonces al exponer las larvas a diferentes concentraciones de MMS + VitC + FeSO_4 , se observará un aumento estadísticamente significativo en las frecuencias de manchas en alas de *D. melanogaster* que serán dependientes de la concentración.

MATERIALES Y MÉTODOS

QUÍMICOS

El metilmetano-sulfonato (CAS 66-27-3, pureza 98%), la VitC (CAS 50-81-7, pureza 99%) y el FeSO₄ (CAS 7782-63-0, pureza 99.99%) se obtuvieron de Sigma (St Luis, MO, EUA) y se disolvieron en agua desionizada. El Medio Instantáneo Carolina (DIM) se adquirió de Carolina Biological Supply Co. (Burlington, North Carolina, EUA). Todas las soluciones se prepararon justo antes de utilizarlas.

CULTIVO Y PROPAGACIÓN DE LÍNEAS DE *D. melanogaster*

Se cultivaron y propagaron las líneas “*flare*³” (*flr*³/TM3, *Bd*^S), “Oregon-*flare*³” (ORR (1); ORR (2); *flr*³/TM3, *Bd*^S) y “*multiple wing hairs (mwh)*” (*mwh/mwh*) a 25°C, humedad relativa (HR) de 65 % y total oscuridad. Se realizaron las cruzas E (hembras *flare*³ y machos *mwh*) y BE (hembras Oregon-*flare*³ y machos *mwh*) (Apéndice III).

OBTENCIÓN DE LAS LARVAS DE *D. melanogaster*

Se colectaron huevos de las cruzas E y BE en medio de levadura activada bajo condiciones de oscuridad, a una temperatura de 25 ° C y HR 60% durante 8 h. Tres días después, las larvas de 72 ± 4h de edad (tercer estadio) se retiraron del medio lavando con agua corriente (25 ° C) y con la ayuda de un colador metálico de malla muy fina (Guzmán-Rincón y Graf, 1995).

TRATAMIENTOS PARA SMART EN ALA

Se sometieron larvas de ambas cruzas, de 72 ± 4h de edad, a tratamientos crónicos (hasta el final de la fase larvaria) con diferentes proporciones de MMS (0.125, 0.25, 0.375 mM) en DIM, con y sin VitC (5.6 mM) + FeSO₄ (0.2 mM), en tres experimentos

independientes. Los testigos fueron la VitC (5.6 mM), el FeSO₄ (0.2 mM) y el disolvente agua desionizada.

MANCHAS EN ALAS

Después de 10-12 días de haber colectado los huevos, los imagos que emergieron se colectaron en frascos viales con alcohol al 70%. Posteriormente se montaron las alas en preparaciones permanentes. Se analizaron 60 individuos por tratamiento por ser el tamaño de muestra óptimo para la prueba (Frei y Würigler, 1995).

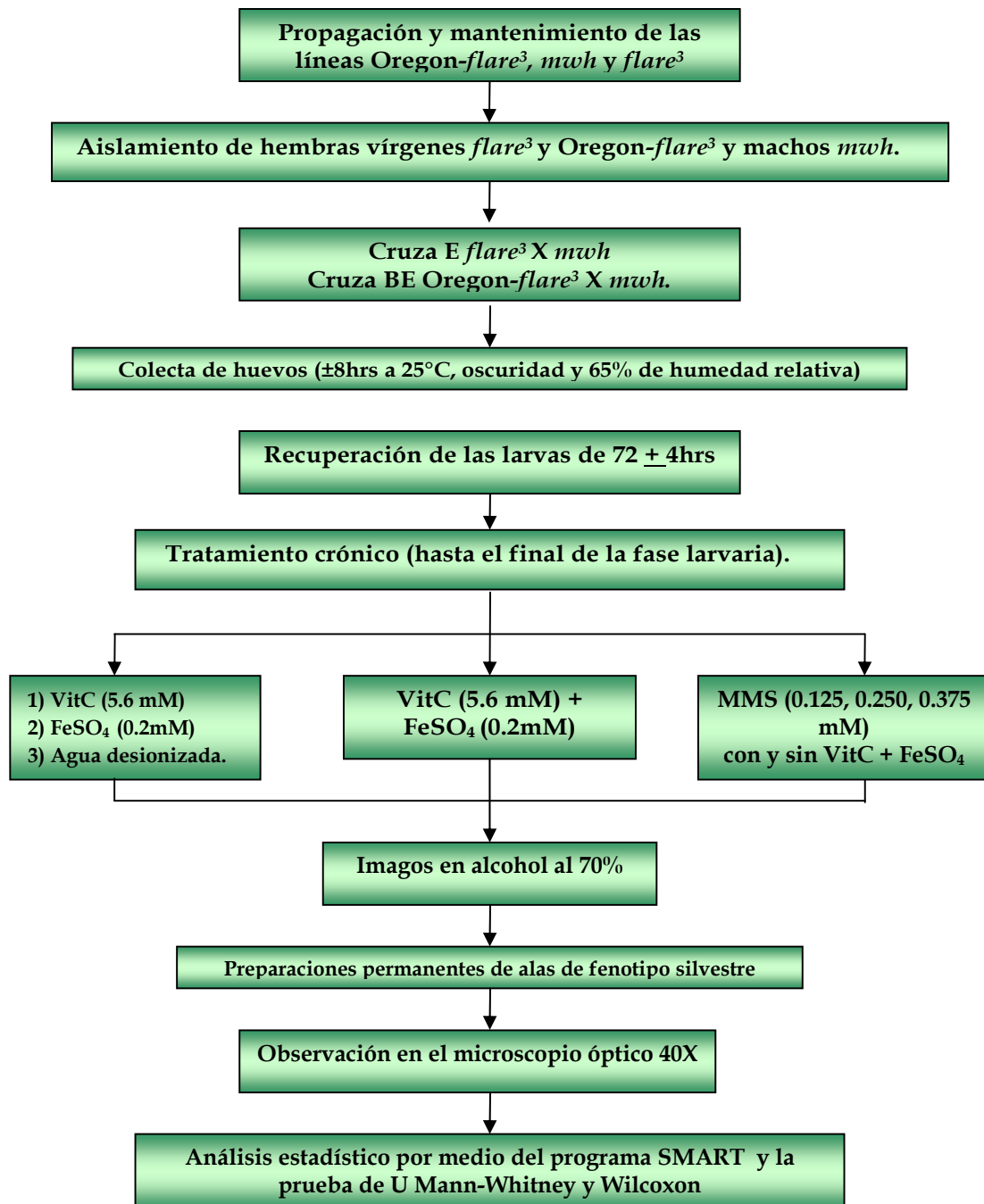
Se revisaron las dos superficies de cada ala en un microscopio óptico a 40X, registrando el número y tipos de mancha o clones de células mutantes presentes (Graf y cols., 1984). En cada caso el tamaño de las manchas se determinó con base al número de células que presentan el fenotipo *mwh* o el *flr³*. Se reconocieron tres categorías de manchas: (1) manchas *mwh* simples, (2) manchas *flr³* simples y (3) manchas gemelas (manchas que exhiben áreas *mwh* y *flr³* adyacentes por recombinación).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA SMART

Para el análisis estadístico se utilizó el programa para PC SMART que evalúa estadísticamente las frecuencias de las manchas en las alas. Para determinar la significancia estadística de la frecuencia de manchas por individuo se utiliza la regla de decisión múltiple, que realiza el análisis estadístico basado en ji cuadrada para proporciones. Este programa verifica que las diferencias cumplan el valor de factor multiplicador (m) que indica que para manchas gemelas y totales el valor comparado debe ser el doble (m = 2) para que la diferencia sea significativa y en manchas gemelas y grandes el quintuplo (m = 5) (Frei y Würigler, 1988). Con el número y tamaño de los clones de *mwh* se calculó la frecuencia de inducción genotóxica por célula. Por medio de la frecuencia y distribución del tamaño del clon *mwh* se demuestra la acción alquilante directa (temprana) del MMS, cuando hay una

frecuencia estadísticamente significativa de clones grandes (≥ 33 a 64 células). Para los resultados débiles o indecisos se optó por realizar el análisis con la prueba no paramétrica U de Wilcoxon-Mann-Whitney que considera la variabilidad individual (Frei y Würigler, 1995).

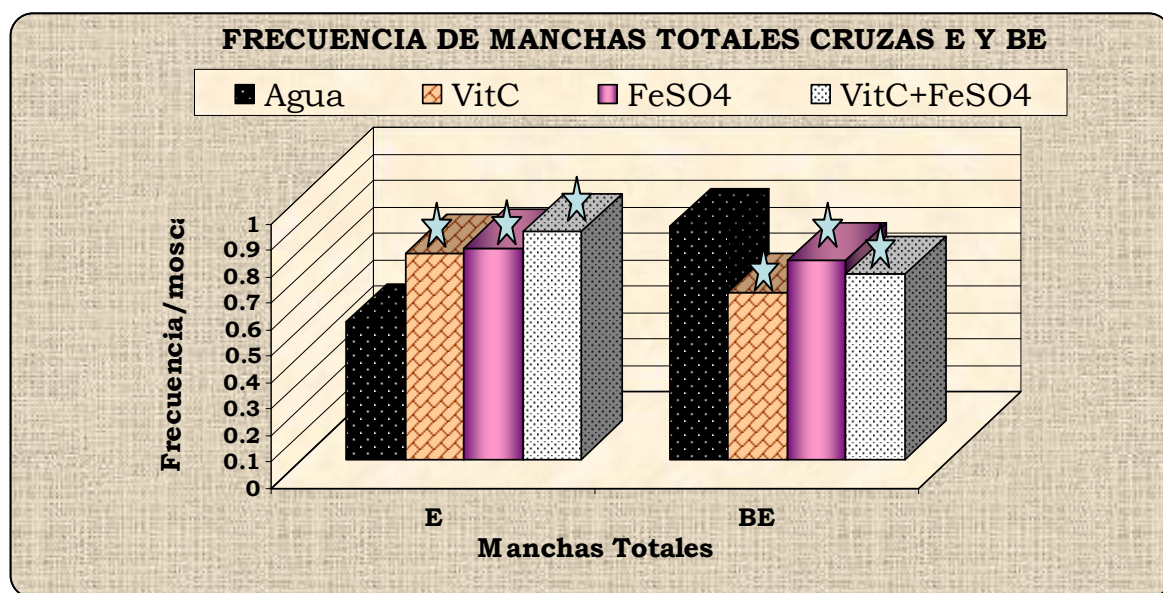
DIAGRAMA METODOLÓGICO



RESULTADOS

CRUZA ESTÁNDAR (E)

En el cuadro II(A) y gráfica 1(E), se muestra la comparación entre la frecuencia de manchas totales para los testigos agua, VitC, FeSO₄ y VitC+FeSO₄, arrojando resultados positivos (+) al realizar el estadístico χ^2 de la prueba SMART para PC (Frei y Wügler, 1995), señalando un aumento estadísticamente significativo en los tres testigos con respecto al agua.



Gráfica 1. Frecuencia de manchas totales/individuo para los testigos: agua, VitC, FeSO₄ y VitC+FeSO₄, (Cruza E y BE). E: Estándar; BE: Bioactivada. ☆ Resultados estadísticamente significativos (P < 0.05).

En el cuadro II(B) y gráfica 2 se muestra la comparación del testigo agua y las diferentes concentraciones de MMS, obteniéndose resultados positivos (+) en todos los tipos de manchas para las tres concentraciones del MMS, principalmente de manchas pequeñas, lo que indica el aumento estadísticamente significativo en la tasa de mutación inducida por este mutágeno.

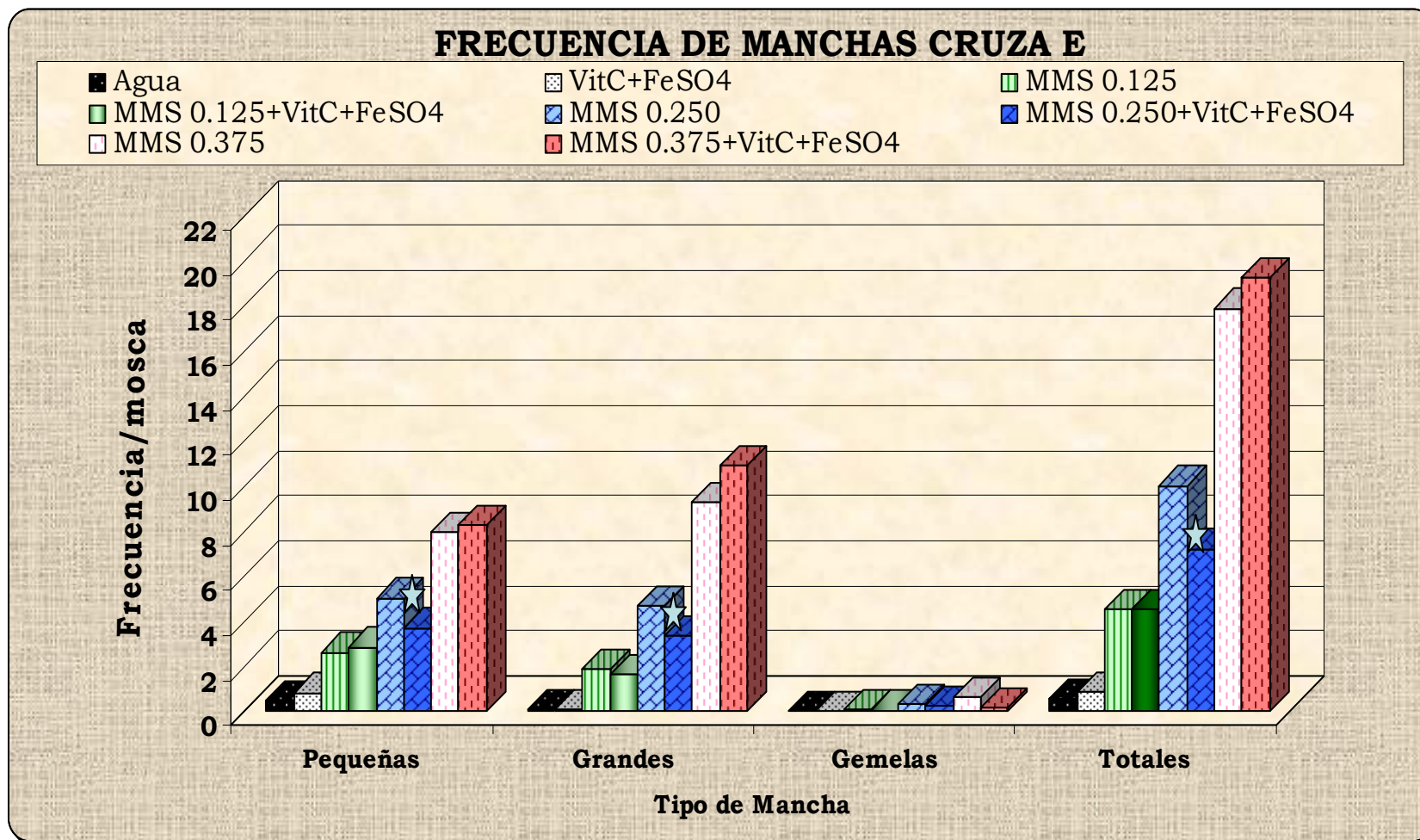
Cuadro II. Resumen de resultados obtenidos con SMART para la cruce E y su diagnóstico estadístico*, después del tratamiento crónico a larvas (72 ± 4 h) con metil-metanosulfonato (MMS), vitamina C (VitC) y sulfato ferroso (FeSO_4).

Tratamiento (Concentración mM)	Número de Individuos	<i>Manchas por Individuo (número de manchas) análisis estadístico*</i>													
		Manchas pequeñas (1-2 células) m=2		Manchas grandes (> 2 células) m=5			Manchas gemelas m=5		Manchas totales m=2		Manchas con clones <i>mwh</i>				
Cruza Estándar (E)															
A Agua desionizada	60	0.47	(28)		0.05	(3)		0.00	(0)		0.52	(31)		1.25	(28)
VitC(5.6)	58	0.74	(43)	+	0.03	(2)	-	0.00	(0)	-	0.78	(45)	+	1.29	(45)
FeSO_4 (0.2)	61	0.70	(43)	+	0.10	(6)	-	0.00	(0)	-	0.80	(49)	+	1.53	(49)
VitC(5.6) + FeSO_4 (0.2)	59	0.80	(47)	+	0.07	(4)	-	0.00	(0)	-	0.86	(51)	+	1.59	(51)
B Agua desionizada	60	0.47	(28)		0.05	(3)		0.00	(0)		0.52	(31)		1.25	(28)
MMS 0.125	55	2.59	(140)	+	1.87	(101)	+	0.06	(03)	I	4.52	(244)	+	2.55	(243)
MMS 0.250	60	5.02	(301)	+	4.65	(279)	+	0.32	(19)	+	9.98	(599)	+	2.80	(594)
MMS 0.375	60	7.95	(477)	+	9.27	(556)	+	0.63	(38)	+	17.85	(1071)	+	2.90	(1061)

*Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988,1995) por comparación con el testigo correspondiente: -, negativo; +, positivo; i, no concluyente; m, factor de multiplicación por la tasa de resultados negativos ($P < 0.05$).

En el cuadro III(A) y gráfica 2 se compara el testigo VitC+FeSO₄ contra los cotratamientos de VitC+FeSO₄+MMS (0.125, 0.250 y 0.375 mM), obteniéndose resultados positivos (+) en todos los tipos de manchas, lo que muestra el aumento en la tasa de mutación inducida por el MMS.

En el cuadro III(B y D) y gráfica 2 se comparan los testigos MMS contra los cotratamientos MMS+VitC+FeSO₄ en las concentraciones 0.125 y 0.350 mM, dando resultados negativos (-) en todos los tipos de manchas, lo que indica que para esas concentraciones el MMS en presencia de la VitC+FeSO₄ no provocó ningún incremento en la tasa de mutación con respecto al MMS (0.125 y 0.350 mM). Para la concentración de 0.250 mM se comparó el cotratamiento contra el testigo MMS (0.250 mM), debido a que el cotratamiento presentó valores menores a los del testigo, obteniéndose resultados débiles positivos (w) en todos los tipos de manchas, con excepción de las manchas gemelas en cuyo caso se obtuvo un resultado negativo (-). A los valores (w) se les realizó la prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon, arrojando resultados significativos (Cuadro III(C), Gráfica 2), lo que muestra que en esta concentración el cotratamiento provocó una disminución estadísticamente significativa en la genotoxicidad con respecto al testigo MMS (0.250 mM).



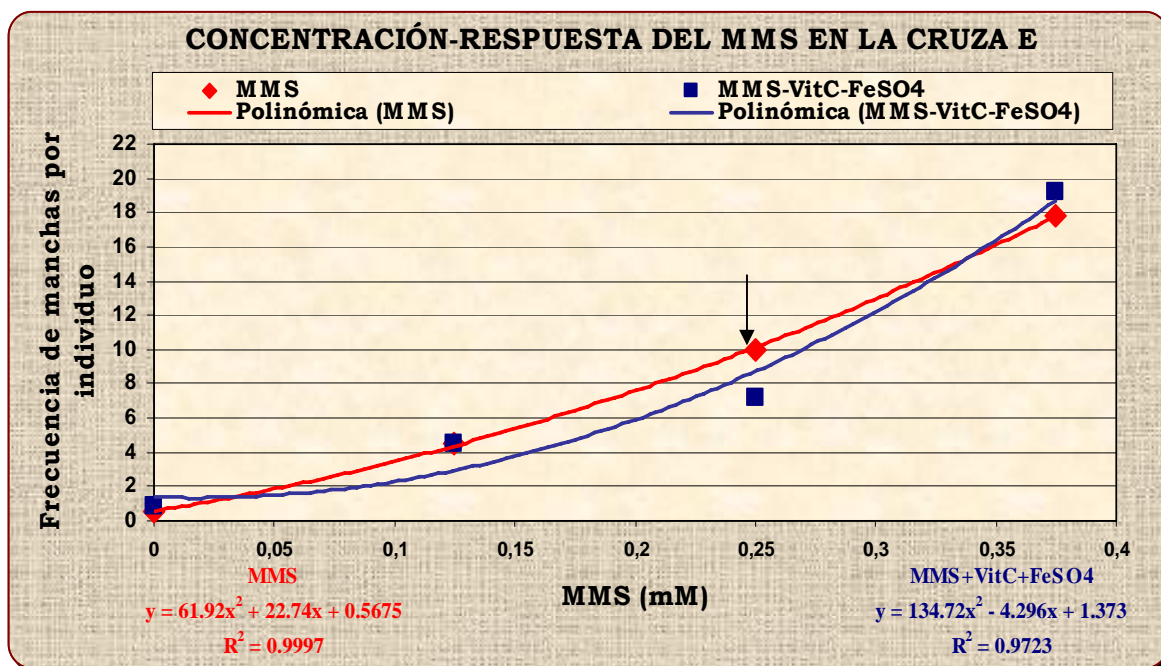
Gráfica 2. Frecuencia de los diferentes tipos de manchas/individuo para los testigos: agua, MMS (0.125, 0.250 y 0.375 mM), VitC+FeSO₄, y los cotratamientos VitC+FeSO₄+MMS (0.125, 0.250 y 375 mM) (Cruza E). ☆ Resultados estadísticamente significativos (P < 0.05).

Cuadro III. Resumen de resultados obtenidos de la comparación de los cotratamientos con sus respectivos testigos, obtenidos con SMART para la craza E y su diagnóstico estadístico*, después de tratamiento crónico a larvas ($72 \pm 4h$) con metil-metanosulfonato (MMS), vitamina C (VitC) y sulfato ferroso ($FeSO_4$).

Tratamiento (Concentración mM)	Número de Individuos	<i>Manchas por Individuo (número de manchas) análisis estadístico*</i>									
		Manchas pequeñas (1-2 células) m=2		Manchas grandes (> 2 células) m=5		Manchas gemelas m=5		Manchas totales m=2		Manchas con clones <i>mwh</i>	
Cruza Estándar (E)											
A VitC(5.6) + $FeSO_4$ (0.2)	59	0.80	(47)	0.07	(4)	0.00	(0)	0.86	(51)	1.59	(51)
MMS 0.125 + VitC + $FeSO_4$	60	2.83	(170) +	1.62	(97) +	0.03	(2) i	4.48	(269) +	2.44	(268)
MMS 0.250 + VitC + $FeSO_4$	60	3.67	(220) +	3.32	(199) +	0.20	(12) +	7.18	(431) +	2.72	(431)
MMS 0.375 + VitC + $FeSO_4$	60	8.22	(493) +	10.87	(652) +	0.13	(08) +	19.22	(1153) +	2.93	(1151)
B MMS 0.125	55	2.59	(140)	1.87	(101)	0.06	(03)	4.52	(244)	2.55	(243)
MMS 0.125 + VitC + $FeSO_4$	60	2.83	(170) -	1.62	(97) -	0.03	(2) -	4.48	(269) -	2.44	(268)
C MMS 0.250 + VitC + $FeSO_4$	60	3.67	(220)	3.32	(199)	0.20	(12)	7.18	(431)	2.72	(431)
MMS 0.250	60	5.02	(301) +	4.65	(279) +	0.32	(19) -	9.98	(599) +	2.80	(594)
D MMS 0.375	60	7.95	(477)	9.27	(556)	0.63	(38)	17.85	(1071)	2.90	(1061)
MMS 0.375 + VitC + $FeSO_4$	60	8.22	(493) -	10.87	(652) -	0.13	(08) -	19.22	(1153) -	2.93	(1151)

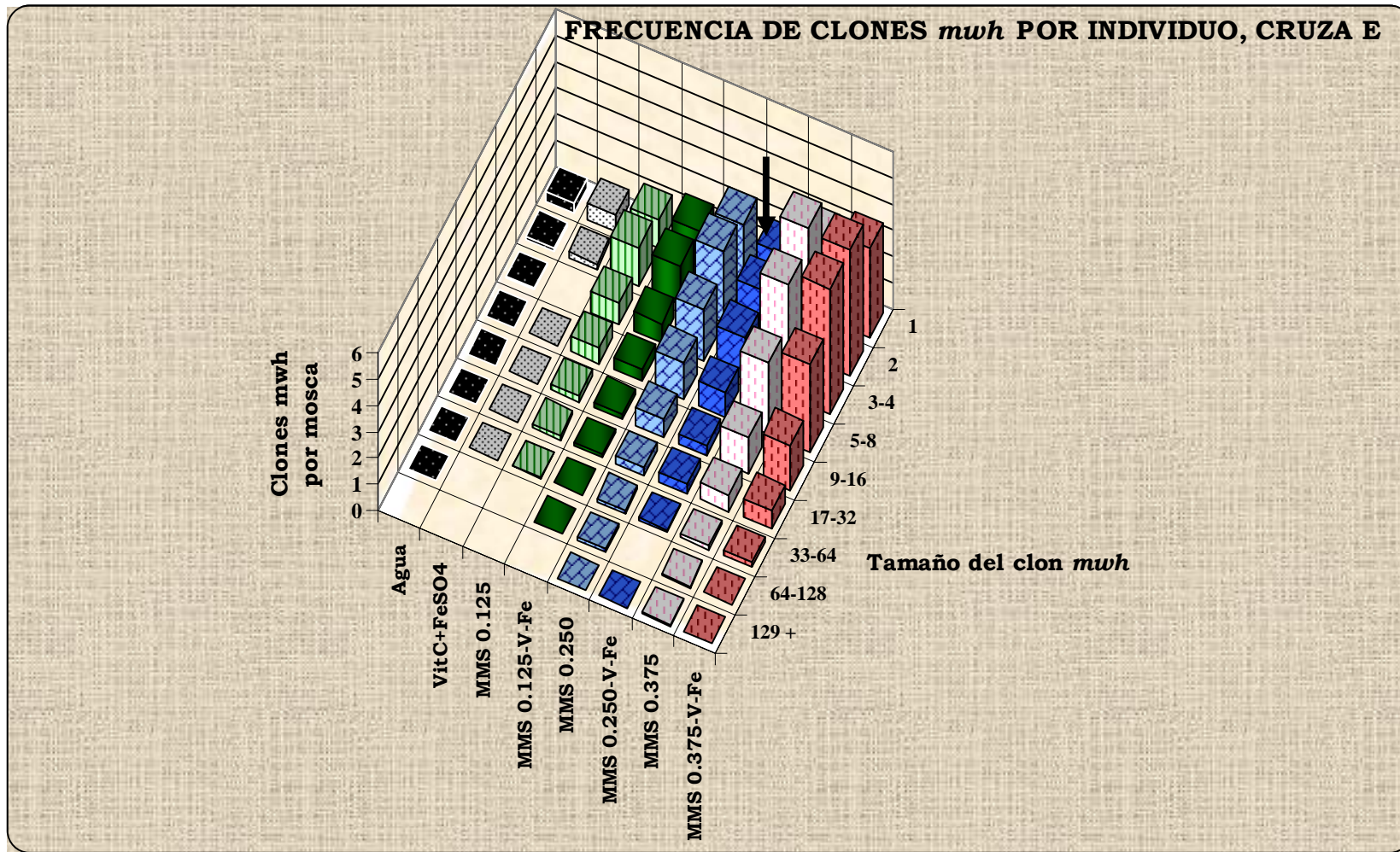
*Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988,1995) por comparación con el testigo correspondiente: -, negativo; +, positivo; factor de multiplicación por la tasa de resultados negativos ($P < 0.05$).

Por otra parte, el MMS produjo una clara concentración-respuesta polinomial con valores de $R^2 = 0.9997$. De igual forma, se observa esta concentración-respuesta para los cotratamientos con MMS+VitC+FeSO₄ con un $R^2 = 0.9723$ (Gráfica 3).



Gráfica 3. Regresión polinómica entre la frecuencia de manchas/individuo obtenidas en los testigos MMS (0.125, 0.250 y 0.375 mM) y con los cotratamientos MMS+VitC+FeSO₄ (Cruza E), donde se muestra una concentración-respuesta polinomial (ver ecuaciones). En la concentración 0.250 mM (↓) el cotratamiento provocó una disminución significativa con respecto al testigo MMS.

En la gráfica 4 se observa la distribución de tamaños de clones *mwh* por individuo para cada testigo y co-tratamiento de la cruza E. Se observa que el tratamiento VitC+FeSO₄ aumentó las manchas pequeñas (1-2 células) en la tasa de mutación espontánea; el claro efecto genotóxico del MMS en sus tres concentraciones con respecto al agua y a la VitC+FeSO₄, y que solamente el cotratamiento MMS (0.250mM)+VitC+ FeSO₄ mostró una disminución estadísticamente significativa con respecto a su testigo MMS (0.250mM).



Gráfica 4. Frecuencia del tamaño del clon *mwh*/individuo, cruz a E, en las diferentes concentraciones (cotratamientos y testigos). (↓) Disminución estadísticamente significativa con respecto al testigo MMS ($P < 0.05$).

CRUZA BIOACTIVACIÓN ELEVADA (BE)

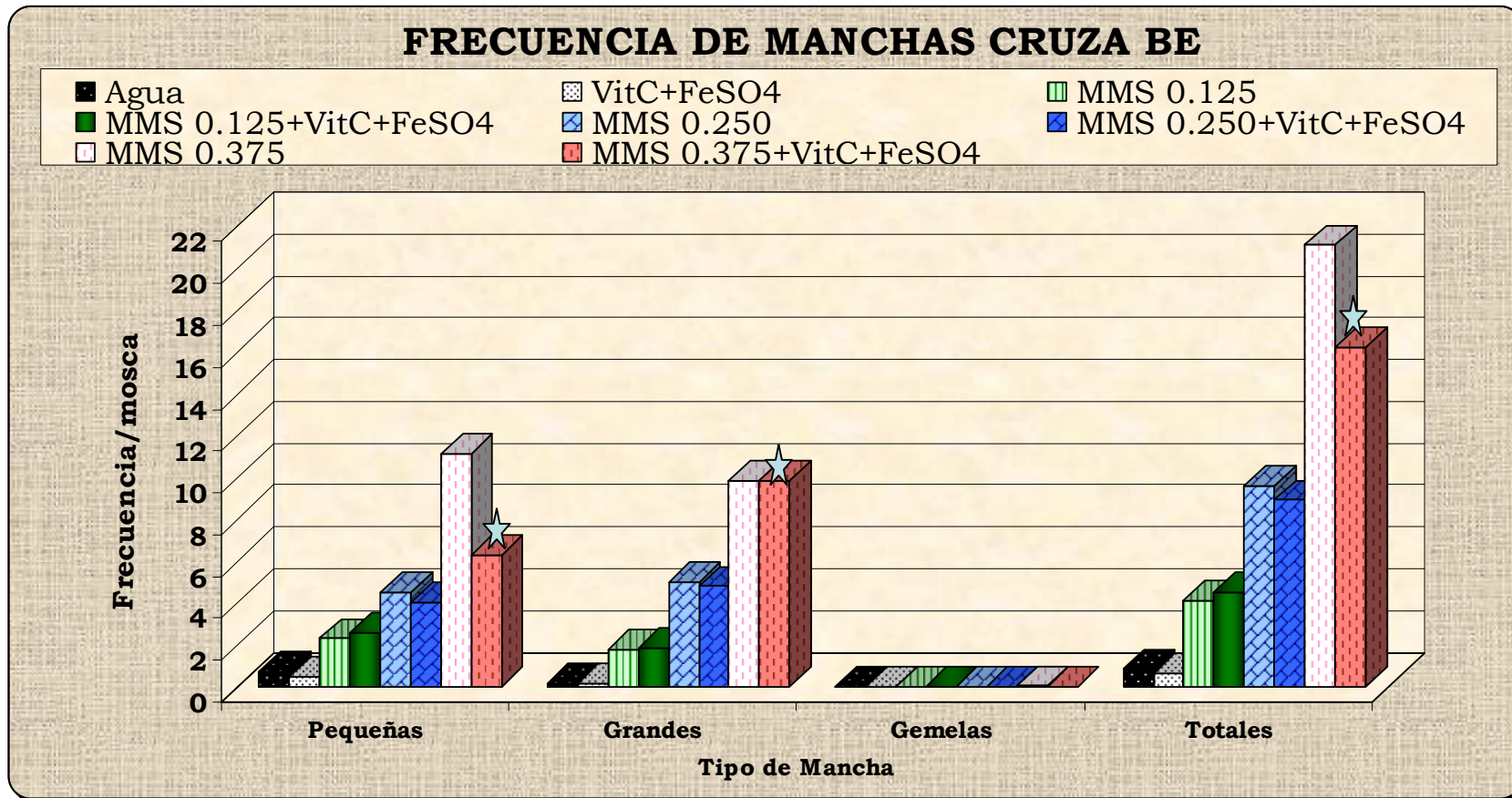
En los cuadros IV-V y gráfica 5 se muestran los resultados del estadístico χ^2 de la prueba SMART para PC (Frei y Wügler, 1995) comparando las frecuencias y el número de manchas por individuo en cada uno de los cotratamientos y testigos.

En el cuadro IV(A) y gráfica 1(BE), se muestra la comparación entre la frecuencia de manchas totales para los testigos agua, VitC, FeSO₄ y VitC+ FeSO₄, obteniéndose una disminución significativa en la tasa basal de mutación para los tres testigos.

Por otra lado, la comparación del testigo agua con las diferentes concentraciones de MMS, muestran resultados positivos (+) en todos los tipos de manchas para las tres concentraciones de este mutágeno (Cuadro IV(B), Gráfica 5), lo que señala el aumento estadísticamente significativo en la tasa de mutación inducida por dicho compuesto.

En el cuadro V(A) y gráfica 5 se compara el testigo VitC+FeSO₄ contra los cotratamientos de VitC+FeSO₄+MMS (0.125, 0.250 y 0.375 mM), obteniéndose resultados positivos (+) en todos los tipos de manchas, lo que indica el aumento estadísticamente significativo en la tasa de mutación inducida por el MMS.

Las concentraciones de MMS de 0.125 y 0.250mM en todos los tipos de manchas (Cuadro V (B y C), Gráfica 5) arrojaron resultados negativos (-) al realizar la comparación de los testigos MMS contra los cotratamientos, señalando que el MMS en presencia de la VitC+FeSO₄ no provocó ningún incremento en la tasa de mutación con respecto al MMS (0.125 y 0.250mM). Para la concentración de 0.375mM de MMS se obtuvieron resultados positivos (+) para las manchas pequeñas y débiles positivos (w) para manchas totales (Cuadro V(D), Gráfica 5). A los valores (w) se les realizó la prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon, obteniéndose resultados significativos, lo que muestra que en esta cruzada la mayor concentración de MMS+VitC+FeSO₄ presentó una disminución estadísticamente significativa de la genotoxicidad con respecto a su testigo MMS (0.375 mM).



Gráfica 5. Frecuencia de los diferentes tipos de manchas/individuo para los testigos: agua, MMS (0.125, 0.250 y 0.375 mM), VitC+FeSO₄, y los cotratamientos VitC+FeSO₄+MMS (0.125, 0.250 y 0.375 mM) (Cruza BE). ☆ Resultados estadísticamente significativos (P < 0.05).

Cuadro IV. Resumen de resultados obtenidos con SMART para la cruza BE y su diagnóstico estadístico*, después de tratamiento crónico a larvas ($72 \pm 4h$) con metil-metanosulfonato (MMS), vitamina C (VitC) y sulfato ferroso ($FeSO_4$).

Tratamiento (Concentración mM)	Número de Individuos	<i>Manchas por Individuo (número de manchas) análisis estadístico*</i>												
		Manchas pequeñas (1-2 células) m=2		Manchas grandes (> 2 células) m=5		Manchas gemelas m=5		Manchas totales m=2		Manchas con clones <i>mwh</i>				
Cruza Bioactivación Elevada (BE)														
A Agua desionizada	60	0.72	(43)		0.17	(10)		0.00	(0)		0.88	(53)	1.87	(53)
VitC(5.6)	59	0.47	(28)	-	0.15	(9)	-	0.00	(0)	i	0.63	(37)	-	1.92 (37)
$FeSO_4$ (0.2)	60	0.62	(37)	-	0.13	(8)	-	0.00	(0)	i	0.75	(45)	-	1.53 (49)
VitC(5.6) + $FeSO_4$ (0.2)	60	0.52	(31)	-	0.18	(11)	-	0.00	(0)	i	0.70	(42)	-	2.17 (42)
B Agua desionizada	60	0.72	(43)		0.17	(10)		0.00	(0)		0.88	(53)	1.87	(53)
MMS 0.125	60	2.33	(140)	+	1.80	(108)	+	0.00	(0)	-	4.13	(248)	+	2.50 (248)
MMS 0.250	60	4.52	(271)	+	5.05	(303)	+	0.05	(3)	-	9.62	(577)	+	2.80 (576)
MMS 0.375	60	11.17	(670)	+	9.88	(593)	+	0.07	(4)	-	21.12	(1267)	+	2.64 (1259)

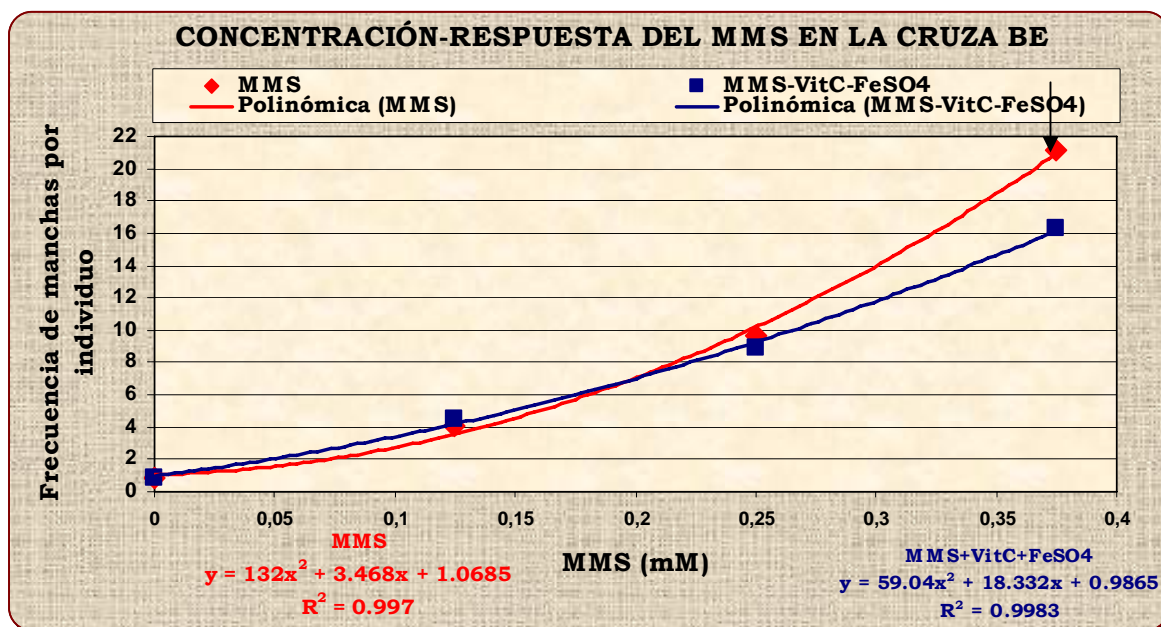
*Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würigler (1988,1995) por comparación con el testigo correspondiente: -, negativo; +, positivo; i, no concluyente; m, factor de multiplicación por la tasa de resultados negativos ($P < 0.05$).

Cuadro V. Resumen de resultados obtenidos de la comparación de los cotratamientos con sus respectivos testigos, obtenidos con SMART para la craza BE y su diagnóstico estadístico*, después de tratamiento crónico a larvas ($72 \pm 4h$) con metil-metanosulfonato (MMS), vitamina C (VitC) y sulfato ferroso ($FeSO_4$).

Tratamiento (Concentración mM)	Número de Individuos	<i>Manchas por Individuo (número de manchas) análisis estadístico*</i>									
		Manchas pequeñas (1-2 células) m=2		Manchas grandes (> 2 células) m=5			Manchas gemelas m=5		Manchas totales m=2		Manchas con clones <i>mwh</i>
Cruza Bioactivación Elevada (BE)											
A VitC(5.6) + $FeSO_4$ (0.2)	60	0.52	(31)	0.18	(11)	0.00	(0)	0.70	(42)	2.17	(42)
MMS 0.125 + VitC + $FeSO_4$	60	2.60	(156) +	1.88	(113) +	0.03	(2) i	4.52	(271) +	2.42	(270)
MMS 0.250 + VitC + $FeSO_4$	66	4.09	(270) +	4.82	(318) +	0.03	(2) i	8.94	(590) +	2.94	(590)
MMS 0.375 + VitC + $FeSO_4$	60	6.35	(381) +	9.90	(594) +	0.02	(1) i	16.27	(976) +	3.12	(974)
B MMS 0.125	60	2.33	(140)	1.80	(108)	0.00	(0)	4.13	(248)	2.50	(248)
MMS 0.125 + VitC + $FeSO_4$	60	2.60	(156) -	1.88	(113) -	0.03	(2) i	4.52	(271) -	2.42	(270)
C MMS 0.250 + VitC + $FeSO_4$	66	4.09	(270)	4.82	(318)	0.03	(2)	8.94	(590)	2.94	(590)
MMS 0.250	60	4.52	(271) -	5.05	(303) -	0.05	(3) i	9.62	(577) -	2.80	(576)
D MMS 0.375	60	6.35	(381)	9.90	(594)	0.02	(1)	16.27	(976)	3.12	(974)
MMS 0.375 + VitC + $FeSO_4$	60	11.17	(670) +	9.88	(593) +	0.07	(4) -	21.12	(1267) +	2.64	(1259)

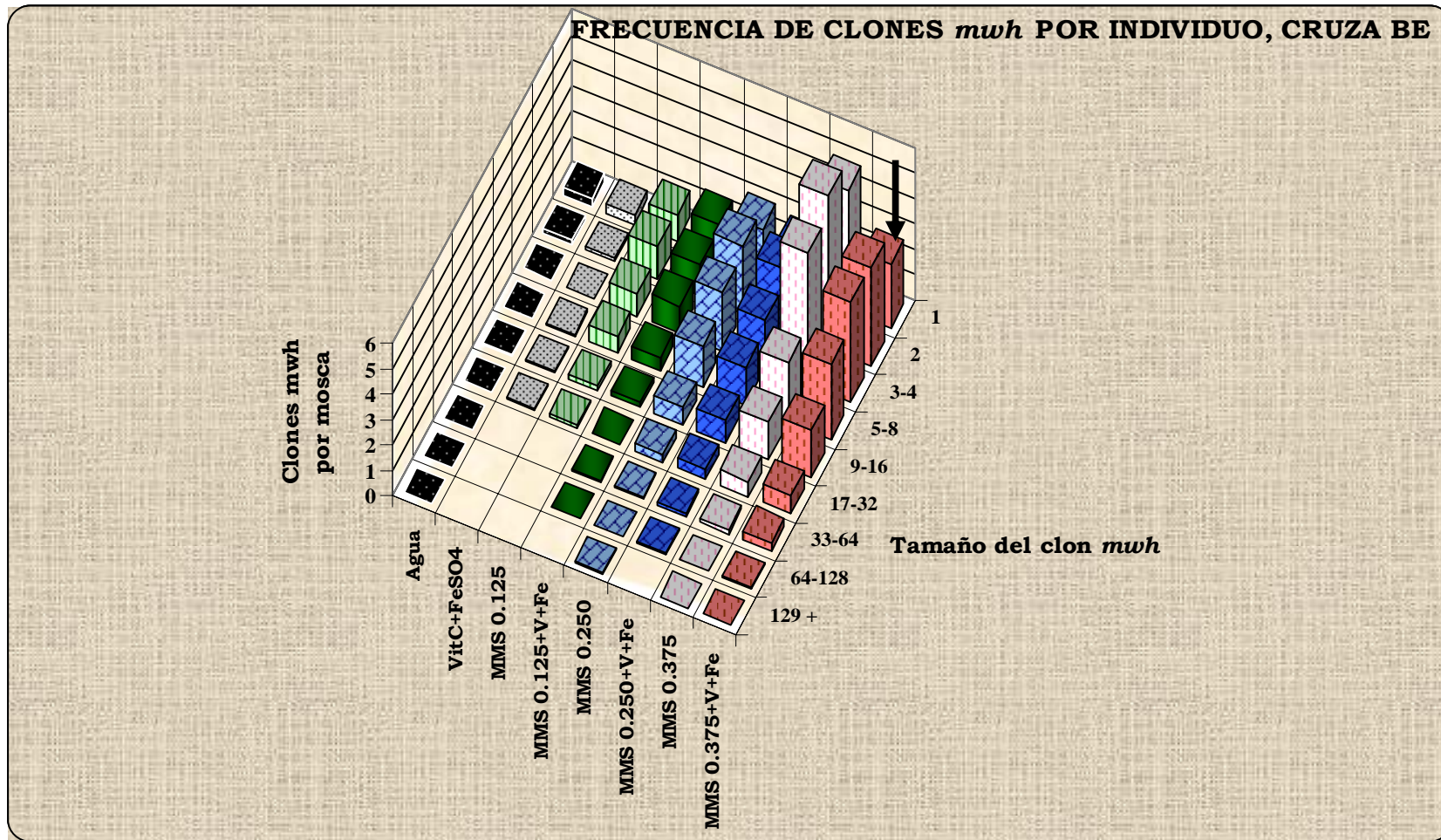
*Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würigler (1988,1995) por comparación con el testigo correspondiente: -, negativo; +, positivo; i, inconcluso; m, factor de multiplicación por la tasa de resultados negativos ($P < 0.05$).

Además, este mutágeno provocó una clara concentración-respuesta polinomial con valores de $R^2 = 0.997$. De igual forma, se observa esta concentración-respuesta para los cotratamientos con MMS+VitC+FeSO₄ con un $R^2 = 0.9983$ (Gráfica 6).



Gráfica 6. Regresión entre la frecuencia de manchas/individuo y el tratamiento con diferentes concentraciones de MMS (0.125, 0.250 y 0.375 mM) (Cruza BE) en donde se observa la concentración-respuesta polinomial (ver ecuaciones). En la concentración 0.375 mM (↓) el cotratamiento provocó una disminución significativa con respecto al testigo MMS.

En la gráfica 7 se muestra la distribución de tamaños de clones *mwh* por individuo para cada testigo y co-tratamiento de la cruza BE. Se observa que la VitC+FeSO₄ no tuvo efecto; el MMS en sus tres concentraciones aumenta significativamente la frecuencia de manchas con respecto al agua y a la VitC+FeSO₄; únicamente la mayor concentración (0.375 mM) de MMS+VitC+FeSO₄ provocó una disminución significativa en la frecuencia de manchas pequeñas, que se refleja en totales, en comparación con el testigo MMS.



Gráfica 7. Frecuencia del tamaño del clon *mwh*/individuo, craza BE, en las diferentes concentraciones (cotratamientos y testigos). (↓) Disminución estadísticamente significativa con respecto al testigo MMS ($P < 0.05$).

DISCUSIÓN

TESTIGOS VitC+FeSO₄ Y AGUA

Las frecuencias de manchas en el testigo agua, que es la tasa de mutación espontánea para los marcadores *mwh* y *flr³*, coincidieron con las frecuencias registradas para el testigo histórico agua, obtenido en el Laboratorio de Genética Toxicológica de la FES Iztacala, (resultados de 34 experimentos independientes).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de manchas totales para los testigos VitC, FeSO₄ y VitC+FeSO₄ con respecto al testigo agua para la craza E, sin embargo para la craza BE se observó una disminución significativa.

La genotoxicidad observada para el testigo VitC puede ser explicada por el efecto pro-oxidante que presenta bajo ciertas condiciones. Duarte y cols. (2007), sugieren que el daño al ADN es causado por este proceso ya que como resultado hay producción de H₂O₂; su estudio, en líneas celulares humanas (GM5399 y HDFs), muestra que este evento ocurre en una dosis-respuesta a concentraciones menores de ≤100 μM y mencionan que a 1 mM de VitC induce daño al ADN equivalente al inducido por 56 μM de H₂O₂ *in vitro*.

El aumento significativo en el testigo FeSO₄, puede deberse a que el hierro en el ambiente reductivo celular, presenta efectos dañinos al reaccionar no-enzimáticamente con peróxidos como el de hidrógeno, produciendo OH•, vía reacción de Fenton (De Freitas y Meneghini, 2001; Ames, 2001; Griffiths y Lunec, 2001). Este radical es un compuesto extremadamente reactivo y se estima que pasan sólo nanosegundos desde que se forma hasta reaccionar con lo primero que colisione: lípidos, proteínas o ADN (Bergendi y cols., 1999).

Por otra parte, para que la VitC presente una actividad pro-oxidante y cause daño al ADN, requiere la presencia de iones metálicos (Cu²⁺ y/o Fe³⁺) para la

generación de ROS, como los radicales OH^\bullet (Franke y cols., 2005; Fenech y Ferguson, 2001). Mistry y cols. (1999), mostraron la actividad pro-oxidante de la VitC con el aumento del daño oxidativo en el ADN *in vitro*.

Por último, Rehman y cols. (1998), reportaron que la suplementación con hierro (14 mg/día) y VitC (60 y 260 mg/día) en individuos sanos, aumenta el daño oxidativo al ADN, indicando un factor de riesgo en el desarrollo del cáncer. Franke y cols. (2005), sugieren que el postratamiento con VitC (60 y 260 mg/día) inducen un incremento considerable en el daño al ADN generado por el FeSO_4 en relación al daño a las 48 h. En contraste a que esperaban protección por el postratamiento con VitC, el daño no fue reducido por la habilidad de esta vitamina para atrapar los OH^\bullet generados por los iones fierro, sino que por el contrario indujeron daño al ADN y aumentaron la genotoxicidad del FeSO_4 .

Es posible que la disminución estadísticamente significativa en la frecuencia de manchas de la cruz BE para estos testigos, se haya debido a una sobreproducción de ROS por el desacoplamiento que sufren los citocromos (CYP) P450 en presencia de algunos xenobióticos, que pueden causar la transferencia de electrones a los CYPs para volverlo incompatible con la oxidación del sustrato. Esta desviación del ciclo de los CYPs consume NADPH y produce una gran cantidad de ROS (Boelsterli, 2003); si se considera que esta producción de ROS por los CYPs puede adicionarse a la ya reportada actividad pro-oxidante de la VitC, además de la generación de ROS por parte del FeSO_4 , y en el caso de la mezcla a la interacción entre ambos, entonces podría existir una saturación de los sistemas de reparación que daría como resultado, la entrada a apoptosis y por lo tanto a una disminución en el número de células dañadas.

MMS

Los resultados confirman que el MMS es un poderoso genotóxico capaz de inducir daño al ADN, lo que concuerda con trabajos previos *in vitro* (Franke y cols., 2005; Calleja y cols., 1999; Horváthová y cols., 1998) como *in vivo* (Vega, 2006; Dueñas-García y cols., 2005; El Hamss y cols., 2003; Kaya, 2003; Heres-Pulido, 2001; Kaya y cols., 2000; Lehmann y cols., 2000; Santos y cols., 1999; Rodríguez-Arnaiz y cols., 1996; Graf y cols., 1995). Este daño se explica, por la naturaleza electrofílica y nucleofílica del ADN (Jenkins y cols., 2005) que lo hace susceptible a la alquilación en numerosos sitios, incluyendo los enlaces fosfodiéster y bases nitrogenadas (Shelby y Tindall, 1997 citado en El Hamss y cols., 2003). Además, es evidente que este compuesto tiene un gran incremento en su actividad mutagénica en tratamientos crónicos (48 hrs) (Santos y cols., 1999) en comparación con los tratamientos agudos (Heres-Pulido, 2001; Rodríguez-Arnaiz y cols., 1996).

El MMS aumentó la incidencia de las manchas grandes y totales debido a su acción directa, lo que también explica una disminución en manchas pequeñas, pues este agente produce las alquilaciones a corto plazo (Jenkins y cols., 2005, Frei y Würigler, 1995) y por lo tanto al final del tercer estadio el número de eventos genotóxicos disminuye.

Rodríguez-Arnaiz y cols. (1996), trataron crónicamente larvas de la craza E con MMS (2 mM) y obtuvieron un porcentaje recombinogénico de 92.9%, lo cual explica la presencia de manchas gemelas en el presente trabajo. Por otra parte, este compuesto produjo una concentración-respuesta polinomial en ambas cruzas (0.125, 0.250, 0.375 mM) (Gráficas 3 y 6). Esta regresión coincide con lo obtenido al someter larvas de tercer estadio a diferentes concentraciones de este mutágeno (Kaya y cols., 2000; Rodríguez-Arnaiz y cols., 1996).

Para el testigo MMS, la ausencia de diferencias en la frecuencia de manchas entre las cruzas E y BE, se esperaba por su efecto directo, por lo que se comprueba

que las diferencias en las enzimas CYP450 entre ambas cruza no juegan un papel en este metabolismo (Dueñas-García y cols., 2005). Lo anterior explica el que tampoco existieran diferencias estadísticamente significativas en los cotratamientos.

COTRATAMIENTOS MMS 0.125, 0.250 Y 0.375 mM + VitC+FeSO₄

Existe una considerable controversia en el papel que tiene la VitC en la prevención del daño al ADN; numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* han reportado los efectos antioxidantes (Cooke y cols., 2002, 1998; Halliwell, 1999) y antimutagénicos (Konopacka y cols., 1998) de esta vitamina. No obstante, otros autores han demostrado que bajo ciertas condiciones, la VitC funciona como pro-oxidante y puede incrementar el daño a esta macromolécula (Lutsenko y cols., 2002; Fraga y Oteiza, 2002); se sabe que tiene un potencial para incrementar la producción de OH• vía la reacción de Fenton, dependiendo tanto de las dosis como de la presencia de metales de transición, como el hierro. Esto puede ser amplificado por la reacción dirigida de la VitC con ciertos compuestos como el MMS (Tavares y cols., 1998).

Debido a lo anterior se esperaba, que la VitC en presencia de iones metálicos aumentara el daño ocasionado por el MMS. Sin embargo, los resultados obtenidos indican que la mezcla VitC+FeSO₄ no aumenta el daño producido por el MMS y produjeron una disminución estadísticamente significativa en la frecuencia de manchas pequeñas y grandes, que se refleja en totales, en el cotratamiento de 0.250 mM en la cruza E y en el co-tratamiento de 0.375 mM para la cruza BE. Esta disminución podría explicarse mediante dos hipótesis (1) que su acción antioxidante reduzca la inducción de mutaciones por el MMS; (2) que su acción pro-oxidante aumente los sistemas de reparación del ADN que eliminan el daño.

Kaya y cols. (2003), reportaron que el co-tratamiento de VitC (17 mM) con MMS (0.1 mM), en *D. melanogaster* (40 individuos/tratamiento) disminuye el efecto genotóxico de este agente alquilante; mencionan que los antioxidantes pueden

reducir la inducción de mutaciones por químicos, como el MMS, por diferentes caminos:

- 1) Competencia con los sitios nucleofílicos del ADN por un mutágeno electrofílico.
- 2) Inhibición de la bioactivación promutagénica por bloqueo del proceso oxidativo.
- 3) Reacción con los metabolitos electrofílicos de un promutágeno.

Los mecanismos 2 y 3 están involucrados cuando hay promutágenos de por medio, mientras que el mecanismo 1, concierne a los mutágenos directos como el MMS.

La VitC contribuye a la defensa natural antioxidante en las células (García y cols., 2006). La mayoría de estudios previos muestran los efectos de la VitC como atrapador de radicales libres, protegiendo a la célula de mutaciones. Sin embargo, de acuerdo a lo reportado por este autor, este efecto protector no solo funciona contra ROS, sino también contra mutágenos directos. Bajo condiciones fisiológicas la VitC compite efectivamente con la alquilación de sitios nucleofílicos en el ADN, ARN y proteínas (Vijayalaxmi y Venu, 1999), de esta manera, evita la unión de grupos alquilo por mutágenos. Por lo tanto, la acción antígenotóxica de la mezcla VitC+FeSO₄, para las concentraciones de MMS mencionadas anteriormente, podría estar relacionada con la habilidad de bloquear enlaces covalentes al ADN celular.

De manera similar, Franke y cols. (2005) reportaron en células sanguíneas de ratas *in vivo* que el daño provocado por el MMS al ADN es significativamente reducido en bajas dosis de VitC (1 mg/ kg) pero no en altas dosis (30 mg/kg). Estos autores argumentan que es posible que el desequilibrio generado por las dosis altas de esta vitamina, no permiten la adaptación celular que ocurre en dosis bajas; sugieren que la protección obtenida contra el MMS se debe a la reducción de su habilidad para alquilar al ADN. Sin embargo, tomando en cuenta que el MMS no es dependiente del metabolismo genotóxico, esta antígenotoxicidad pudiera ser mediada mayormente por competencia.

Tavares y cols. (1998), encontraron en células de médula ósea de ratas wistar *in vivo* que la VitC actúa como un atrapador de radicales libres disminuyendo así el daño provocado por la doxorubicina, concluyendo que la VitC parece actuar en el proceso desmutagénico y por lo tanto es efectiva en tratamientos simultáneos con un compuesto mutagénico, de esta manera actúa en la inactivación o destrucción de especies mutagénicas. Horváthova y cols. (1998), reportaron que el MMS induce daño oxidativo en baja proporción, lo que pudo haber aumentado el efecto antioxidante de la VitC.

La otra hipótesis para explicar la reducción en la frecuencia de manchas en los cotratamientos mencionados, se relaciona con la activación de los mecanismos de reparación por la actividad pro-oxidante de la VitC.

Rehman y cols. (1998), reportaron en individuos sanos bajo suplementación de hierro (14 mg/día) y VitC (60 y 260 mg/día), que dicha mezcla causa elevaciones transitorias en los niveles de hidroxilación (productos de daño oxidativo a pirimidinas). Esto sugiere que el supuesto efecto pro-oxidante de esta mezcla acelera el daño al ADN, llevando a un aumento la respuesta del sistema de reparación, que llega a ser ineficiente porque se satura el sistema.

En otro estudio, Konopacka y cols. (1998) encontraron que el pretratamiento con VitC (50-100 mg/kg/día) en ratones expuestos a rayos gamma (2 Gy), protegió en contra de la inducción de micronúcleos (ensayo cometa) y alteró la habilidad celular para la reparación del ADN.

Por otro lado, una parte de la literatura sugiere la existencia de un efecto “filo de navaja, cuello de botella o umbral” en el cual las dosis bajas son pro-oxidantes, y las dosis normales o altas son antioxidantes. En algunas condiciones las células utilizan fisiológicamente las propiedades pro-oxidantes a favor de la generación de radicales libres especializados, que estarían implicados en procesos altamente específicos (García y cols, 2006). Se ha hipotetizado que el efecto de protección antioxidante de la VitC deriva de su capacidad de atrapar las ROS antes de que ocurra el daño a las macromoléculas (Sies y cols., 1992 citado en Cooke y cols., 2002)

sin embargo, estudios recientes han sugerido que la reducción en el daño a dosis normales-altas, podría derivar de una respuesta celular adaptativa al estrés oxidativo (Rehman y cols., 1998) y nuevamente se ha relacionado con la inducción de los sistemas de reparación del DNA (Cooke y cols., 2002; Podmore y cols., 1998; Griffiths y Lunec 2001; Halliwell, 1999).

BER es uno de los sistemas de reparación más importantes para remover los daños provocados por el MMS. Jenkins y cols. (2005), reportaron que BER contribuye a determinar el umbral genotóxico mediado por la reparación de los aductos formados por agentes alquilantes como es el MMS y considerando que a determinadas concentraciones de esta vitamina se estimula la reparación BER, se plantea que la interacción entre el MMS, la VitC y el FeSO₄ pudo reparar el daño de manera eficiente. En caso de una saturación de los sistemas de reparación, la falta de enzimas suficientes produce rompimientos dobles en el ADN y como resultado, la entrada a apoptosis. Cualquiera de estos dos eventos podrían explicar la disminución en la frecuencia de manchas en algunos de los cotratamientos.

TAMAÑO DEL CLON *mwh*

La distribución exponencial del tamaño del clon involucra el número de ciclos de divisiones de las células imagales del ala en condiciones normales (Frei y Würzler, 1995). El encontrar clones *mwh* de manchas grandes (de 17-32 células) en MMS sólo y en los cotratamientos (E y BE) corrobora que el MMS produjo alquilaciones de manera más temprana en el desarrollo de la larva por su naturaleza directa.

CONCLUSIONES

- * Se comprueba el efecto directo del MMS, ya que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las cruza E y BE.
- * El daño provocado por el MMS es dependiente de la concentración y polinomial.
- * Se encontró un aumento estadísticamente significativo en los testigos VitC, FeSO₄ y VitC+FeSO₄ para la cruza E, sin embargo, para la cruza BE se observó una disminución. Se propone que el aumento de frecuencias en los testigos sea por efecto pro-oxidante (cruza E) y que la disminución (cruza BE) sea por inducción del sistema de reparación y apoptosis.
- * La mezcla MMS+VitC+FeSO₄, disminuyó significativamente las frecuencias de manchas en las concentraciones 0.250 mM y 0.375 mM de MMS para las Cruzas E y BE respectivamente. Se propone que esta disminución se deba a: (1) la acción antioxidante de la VitC que reduzca la inducción de mutaciones por el MMS; (2) una competencia por parte de la VitC con los sitios nucleofílicos del ADN por el MMS; (3) la acción pro-oxidante de la VitC que en presencia del FeSO₄ aumente los sistemas de reparación del ADN que eliminan deficientemente el daño.

RECOMENDACIONES

Se propone evaluar en las larvas de *D. melanogaster* un indicador de oxidación del ADN como el 8-oxo-dG y el 8-oxo-dA con VitC, en presencia y ausencia del fierro, así como las interacciones con el MMS, para medir el daño al ADN.

REFERENCIAS

- Ames B.N. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer, *Mutat. Res.* 475 (2001) 7-20.
- Amorós M. Estudio de mutantes del cromosoma III de *Drosophila melanogaster*: el gen *ash-2* como regulador de diferenciación celular, Tesis de doctorado (Biología). Fac. Biología. Univ. de Barcelona. España (2001) 153 pp.
- Ballester M. Antioxidantes, radicales libres y salud. Un enfoque químico-orgánico-físico, *Med. Clin.* 107 (1996) 509-515.
- Bergendi L., L. Beneš, Z. Ďurčková, M. Ferenčík. Chemistry, physiology and pathology of free radicals, *Life Sciences.* 65 (1999) 1865-1874.
- Blanco A. Química Biológica, El Ateneo, Argentina, 6th edición (1999) 541-542.
- Boccio J., J. Salgueiro, A. Lysionek, M. Zubillaga, C. Goldman, R. Weill, R. Caro. Metabolismo del hierro: conceptos actuales sobre un micronutriente esencial. Volúmen 53- Número 2. ALAN. [En línea] (Fecha de acceso 21 de enero del 2008; fecha de actualización 21 de enero del 2008). Disponible en: http://www.alanrevista.org/ediciones/2003-2/metabolismo_hierro_micronutriente_esencial.asp
- Boelsterli U.A. Mechanistic toxicology, Taylor and Francis, Great Britain (2003) 99-101.
- Calléja F., J.G. Jansen, H. Vrieling, F. Laval, A.A. van Zeeland. Modulation of the toxic and mutagenic effects induced by methyl methanesulfonate in Chinese hamster ovary cells by overexpression of the rat N-alkylpurine-DNA glycosylase, *Mutat. Res.* 425 (1999) 185-194.
- Chang M., M. Bellaoui, Ch. Boone, G.W. Brown. A genome-wide screen for methyl methanesulfonate sensitive mutants reveals genes required for S phase progression in the presence of DNA damage, *Genetics.* 99 (2002) 16934-16939.
- Cooke M.S., M.D. Evans, I.D. Podmore, K.E. Herbert, N. Mistry, P. Mistry, P.T. Hickenbotham, A. Hussieni, H.R. Griffiths, J. Lunec. Novel repair action of vitamin C upon in vivo oxidative DNA damage, *FEBS Letters.* 363 (1998) 363-367.
- Cooke S. M., N. Mistry, J. Ahmad, H. Waller, L. Langford, R. J. Bevan, M. D. Evans, G. N. D. Jones, K. E. Herbert, H. R. Griffiths, J. Lunec. Deoxycytidine glyoxal lesion induction

and evidence of repair following vitamin C supplementation *in vivo*, Free Radic. Biol. Med. 34 (2002) 218-225.

CSIC, Ministerios de Ciencia y Tecnología. Instituto Del Frío. Desarrollo y aplicación de nuevos compuestos bioactivos en formulaciones de base láctea enriquecidas con hierro. [En línea] (Fecha de acceso 2 de noviembre del 2007). Disponible en: <http://www.if.csic.es/proyectos/AGL2000-1542/introduccion.htm>.

Cullinton B.J. The complete genome sequense of *Drosophila melanogaster* will be a powerful tool for using fly biology to study human medicine (2000). Genome News Network. [En línea] [Fecha de acceso 24 de enero del 2008; fecha de actualización 24 de enero del 2008]. Disponible en: http://www.genomenewsnetwork.org/articles/03_00/article_fly_3_24.shtml.

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

Danielson P.B., R.J MacIntyre, J.C. Fogleman. Molecular cloning of a family of xenobiotic-inducible drosophilid cytochrome p450s: evidence for involvement in host-plant allelochemical resistance, PNAS. 94 (1997) 10797-10802.

De Buendía G.P. Search for DNA repair pathways in *Drosophila melanogaster*, Mutat. Res. 407 (1998) 67-84.

De Freitas J.M., R. Meneghini. Iron and its sensitive balance in the cell, Mutat. Res. 475 (2001) 153-159.

DIS, *Drosophila information service since 1934, Drosophila melanogaster* [En línea] (Fecha de acceso 28 de enero del 2008; fecha de actualización 28 de enero del 2008). Disponible en: <http://www.ou.edu/journals/dis/>

Duarte T.L., G.M. Almeida, G.D. Jones. Investigation of the role of extracellular H₂O₂ and transition metal ions in the genotoxic action of ascorbic acid in cell culture models, Toxicol. Lett. 170 (2007) 57-65.

Dueñas-García I.E., V. Vega-Contreras, J.C. Gómez-Luna, L.F. Sánchez-Santos, L. Castañeda-Partida, A. Durán-Díaz, M.E. Heres-Pulido. Toxicity parameters of 4-nitroquinoline-1-oxide, urethane and methyl methanesulfonate in the *flare* and *Oregon-flare* strains of *Drosophila melanogaster*, Dros. Inf. Serv. 88 (2005) 83-89.

El Hamss R., M. Idaomar, A. Alonso-Moraga, A. Muñoz. Antimutagenic properties of bell and black peppers, Food. Chem. Toxicol. 41 (2003) 41-47.

- Erichsen K., R.J. Ulvik, T. Grimstad, A. Berstad, R.K. Berge, T. Hausken. Effects of ferrous sulphate and non-ionic iron-polymaltose complex on markers of oxidative tissue damage in patients with inflammatory bowel disease, *Aliment. Pharmacol.* 22 (2005) 831-838.
- Fahey, J.W., P. Talalay. Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of phase II detoxication enzymes, *Food Chem. Toxicol.* 37 (1999) 973-979.
- Fenech M., L. Ferguson. Vitamins/minerals and genomic stability in humans, *Mutat. Res.* 475 (2001) 1-6.
- Fenech M. Micronutrients and genomic stability: a new paradigm for recommended dietary allowances (RDAs), *Food Chem. Toxicol.* 40 (2002) 1113-1117.
- Ferguson L.R., M. Philpott, N. Karunasinghe. Dietary cancer and prevention using antimutagens, *Toxicology.* 198 (2004) 147-159.
- Forellat M., H. Gautier, N. Fernández. Metabolismo del hierro, *Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter.* 16 (2000) 149-60.
- Fraga C.G., P.I. Oteiza. Iron toxicity and antioxidant nutrients, *Toxicology.* 180 (2002) 23-32.
- Franke R.S., D. Prá, J. da Silva, B. Erdtmann, J.A. Pêgas. Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO₄ and CuSO₄ in mouse blood cells *in vivo*, *Mutat. Res.* 583 (2005) 75-84.
- Frei H., F.E. Würzler. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*, *Mutat. Res.* 334 (1995) 247-258.
- Frei H., F.E. Würzler. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result, *Mutat. Res.* 203 (1988) 297-308.
- Friedberg E.C., G.C. Walker, W. Siede. DNA repair and mutagenesis, ASM Press. Washington D.C. (1995) 698 pp.
- García G.A., C. Cobos, C. A. Rey, O.R. Mejía, C.A. Casariego, D. Clavijo, A. García, S. Hernández, S.A. Báez. Biología, patobiología y bioclínica de la actividad de oxidorreducción de la vitamina C en la especie humana, *Universitas Médica.* 47 (2006) 349-363.

- Gastell P.L., J.L. Pérez. Métodos para medir el daño oxidativo, Rev. Cubana Med. Milit. 29 (2000) 192-198.
- Glaab E. W., K.R. Tindall, T.R. Skopek. Specificity of mutations induced by methyl methanesulfonate in mismatch repair-deficient human cancer cell lines Mutat. Res. 427 (1999) 67-78.
- 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. 51 (1995) 168-173.
- Graf U., F.E. Würzler, A.J. Katz, H. Frei, H. Huon, C.B. Hall, P.G. Kale. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, Environ. Mutagen. 6 (1984) 153-88.
- Graf U., M.A. Spanó, J.G. Rincón, S.K. Abraham, H.H. De Andrade. 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, Environ. Mutagen. 16 (1996) 1-7.
- Graf U., S.K. Abraham, J. Guzmán-Rincón, F.E. Würzler. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*, Mutat. Res. 402 (1998) 203-209.
- Griffiths H.R., J. Lunec. Ascorbic acid in the 21st century – more than a simple antioxidant, Environ Toxicol Pharmacol. 10 (2001) 173-182.
- Guzmán-Rincón J., U. Graf. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor: Butterworth, F.M., Corkum, L.D. and Guzman-Rincon, J. Biomonitoring and biomarkers as indicators of Environmental Change: A handbook. Plenum Press Publishes, New York. (1995) 169-181.
- Halliwell, B. Vitamin C: poison, prophylactic or panacea?, Trends. Biochem. Sci. 24 (1999) 255-259.
- Heres-Pulido M.E. Efecto de los nitratos de plomo y de calcio sobre la acción mutagénica y recombinogénica del metil metanosulfonato en *Drosophila melanogaster*. Tesis de maestría en ciencias (Biología). Fac. Ciencias, UNAM México. (2001) 174 pp.
- Horváthová E., D. Slamenová, L. Hlincíková, T.K. Mandal, A. Gábelová, A.R. Collins. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay, Mutat. Res. 409 (1998) 163-171.

IUPAC Compendium of Chemical Terminology 2003. Fenton reaction. [En línea] (Fecha de acceso 21 de noviembre del 2007). Disponible en: <http://www.iupac.org/goldbook/FT06786.pdf>

Jenkins G.J.S., S.H. Doak, G.E. Johnson, E. Quick, E.M. Waters, J. M. Parry. Do dose response thresholds exist for genotoxic alkylating agents?, *Mutagenesis*. 20 (2005) 389-398.

Kaya B., A. Creus, A. Velásquez, A. Yanikoglu, R. Marcos. Genotoxicity is modulated by ascorbic acid studies using the wing spot test in *Drosophila*, *Mutat. Res.* 520 (2002) 93-101.

Kaya B., A. Creus, A. Velásquez, A. Yanikoğlu, R. Marcos. Induction o fan adaptative response in *Drosophila* imaginal discs cells exponed *in vivo* to low doses of alkylating agents, *Mutagenesis*. 15 (2000) 337-340.

Kaya, B.. Anti-genotoxic effect of ascorbic acid on mutagenic dose of three alkylating agents, *Turk. J. Biol.* 27 (2003) 241-246.

Kitts D.D. An evaluation of the multiple effects of the antioxidant vitamins, *TIFS*. 81 (1997) 198-203.

Konopacka M., M. Widel, J. Rzeszowska-Wolny. Modifying effect of vitamins C, E and beta-carotene against gamma-ray-induced DNA damage in mouse cells, *Mutat. Res.* 417 (1998) 85-94.

Lehman M., U. Graf, M.L. Reguly, H.H. Rodríguez de Andrade. Interference of tannic acid on the genotoxicity of mitomycin C, methylmethanesulfonate, and nitrogen mustard in somatic cells of *Drosophila melanogaster*, *Environ. Mol. Mutagen.* 36 (2000) 195-200.

Lutsenko E., J.M. Cárcamo, D.W. Golde. Vitamin C Prevents DNA Mutation Induced by Oxidative Stress, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 16895-16899.

Meneghini R. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage, *Free. Rad. Biol. Med.* 23 (1997) 783-792.

Mistry N., M.D. Evans, H.R. Griffiths, H. Kasai, K.E. Herbert, J. Lunec. Immunochemical detection of glyoxal DNA damage, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 1267-1273.

Mitchell I., R.D. Combes, Mutation tests with the fruit fly *Drosophila melanogaster*, In: Venitt S, Parry JM (Eds.), *Mutagenicity testing; a practical approach*, IRL Press, Oxford. (1984) 149-185.

- Murray R.K., D.K. Granner, P.A. Mayes y V.W. Rodwell. Bioquímica de Harper. Manual moderno. México 14 (1997) 719-750.
- Naidu A.K.. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview, Nutr. J. 2 (2003) 1-10.
- NIH National Institutes of Health, Division of Occupational Health and Safety. Methyl methane-sulfonate. [En línea] (Fecha de acceso 25 de septiembre del 2007). Disponible en: http://dohs.ors.od.nih.gov/pdf/Methyl%20methane-sulfonate%20REVISED_2_.pdf
- Odin A.P. Vitamins as antimutagens: Advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action, Mutat. Res. 386 (1997) 39-67.
- Ophardt Ch., Electron Transport. Elmhursts College. [En línea] Fecha de actualización 2003 (fecha de acceso 21 de enero del 2008). Disponible en: <http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/596electtransport.html>
- Osaba L., A. Aguirre, A. Alonso, U. Graf. Genotoxicity testing of six insecticides in two crosses of the *Drosophila* wing spots test, Mutat. Res. 439 (1999) 49-61.
- Park S., H. S. Han, Ch.H. Park, E.R. Hah, S.J. Lee, H.K. Park, S.H. Lee, W.S. Kim, Ch.W. Jung, K. Park, H.D. Riordan, B.F. Kimler, K. Kim, J.H. Lee. l-Ascorbic acid induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells via hydrogen peroxide-mediated mechanisms, Int. J. Biochem. Cell. Biol. 36 (2004) 2180-2195.
- Pinto L.A., C.G. Regis, D. de Oliveira, A. Machado-Silva, C.R. Machado. *Escherichia coli* as a model system to study DNA repair genes of eukaryotic organisms, Genet. Mol. Res. 2 (2003) 77-91.
- Podmore I.D., H.R. Griffiths, K.E. Herbert, N. Mistry, P. Mistry, J. Lunec. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties, Nature. 392 (1998) 559.
- Primers in Biology*. The Cell Cycle: Principles of Control: Online Resources. [En línea] (Fecha de acceso 28 de enero del 2008; fecha de actualización 28 de enero del 2008). Disponible en: <http://www.new-science-press.com/browse/cellcycle/illustrations/2/>
- Proteggente A.R., A. Rehman, B. Halliwell, C.A. Rice. Potential problems of ascorbic acid and iron supplementation: Prooxidant *effect in vivo?*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 277 (2000) 535-540.

- Rehman A., C.S. Collis, M. Yang, M. Kelly, A.T. Diplock, B. Halliwell, C.R. Evans. The effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage to DNA in healthy volunteers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246 (1998) 293-298.
- Rietjens C.M., M.G. Boersma, L. de Haan, B. Spenkelink, H.M. Awad, N.H.P. Cnubben, J.J. van Zanden, H. van der Woude, G.M. Alink, J.H. Koeman. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 11 (2002) 321-333.
- Rodríguez-Arnáiz R., P. O Soto., J.C Gaytán-Oyarzún, U. Graf. Analysis of mitotic recombination induced by several mono and bifunctional alkylating agents in the *Drosophila* wing-spot test, *Mutat. Res.* 351 (1996) 133-145.
- Rubin G. M., M. D Yandell., J. R. Wortman and G. L. Gabor Miklos, Comparative genomics of the eukaryotes, *Science.* 287 (2000) 2204-2215.
- Sánchez-Lamar A., A. Fonseca-López, G. Capiro-Trujillo. Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba, *Rev. Cubana Farm.* 34 (2000) 34-43.
- Saner C. B. Weibel, F. Würigler, C. Sengstag. Metabolic of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*, *Environ. Mol. Mutagen.* 27 (1996) 46-58.
- Santos H.J., U. Graf, M.L. Reguly and H.H. Rodríguez de Andrade. The synergistic effects of vanillin on recombination predominate over its antimutagenic action in relation to MMC-induced lesions in somatic cells of *Drosophila melanogaster*, *Mutat. Res.* 444 (1999) 355-365.
- Seidel D.S., B.R. Sparrow, H.L. Kan, W.T. Stott, M.R. Shisler, V.A. Linscombe and B. B. Gollapudi. Profiles of gene expression changes in L5178Y mouse lymphoma cell treated with methyl methanesulfonate and sodium chloride, *Mutagenesis.* 19 (2004) 195-201.
- Sharpe, C.R., J.P. Collet, E. Belizle, J.A Hanley, J.F. Boivin. The effects of tricyclic antidepressants on breast cancer risk, *Br. J. Cancer.* 86 (2002) 92-97.
- Shelby M., Tindall K.R. Mammalian germ cell mutagenicity of ENU, IPMS and MMS, chemicals selected for a transgenic mouse collaborative study, *Mutat. Res.* 388 (1997) 99-109.
- Sies H., W. Stahl, A.R. Sundquist. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids, *Ann. NY Acad. Sci.* 669 (1992) 7-20.

- Sobol R.W., D.E. Watson, J. Nakamura, F.M. Yakes, E. Hou, J.K. Horton, J. Ladapo, B. Houten, J.A. Swenberg, K.R. Tindall, L.D. Samson, S.H. Wilson. Mutations associated with base excision repair deficiency and methylation-induced genotoxic stress. *Genetics*. 99 (2002) 6860-6865.
- Soto-Vega J. Detección de fitoquímicos, contenido de vitamina C y ácido fólico en Chironja (*Citrus sinensis x Citrus paradisi*) injertada en diferentes patrones de cítrica. Tesis de maestría en ciencias (Ciencia y tecnología de alimentos). Fac. Ciencias Agrícolas, Univ. Puerto Rico. (2005) 94 pp.
- Suh J., B.Z. Zhu, B. Frei. Ascorbate does not act as a pro-oxidant towards lipids and proteins in human plasma exposed to redox-active transition metal ions and hydrogen peroxide, *Free Radic. Biol. Med.* 34 (2003) 1306-1314.
- Tavares D.C., A.O. Cecchi, L.M.G. Antunes, C.S. Takahashi. Protective Effects of the Amino Acid Glutamine and of Ascorbic Acid Against Chromosomal Damage Induced by Doxorubicin in Mammalian Cells, *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 18(1998) 153-161.
- Vega-Contreras V. Evaluación de la interacción del brócoli (*Brassica oleracea var. italica*) con el metil metanosulfonato (MMS) en la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en ala de *Drosophila melanogaster* (cruza E y BE). Tesis de Licenciatura (Biología). FES. Iztacala. UNAM. México (2006) 77pp.
- Vijayalaxmi K.K., R. Venu. In vivo anticlastogenic effects of L-ascorbic acid in mice, *Mutat. Res.* 438 (1999) 47-51.

APÉNDICE I

ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

El oxígeno desempeña una función importante como aceptor terminal de electrones durante la respiración celular. La mayor parte del oxígeno en la célula es reducido a través de reacciones enzimáticas, sin embargo aproximadamente del 2 al 5 % escapa a esta reducción bivalente, opta por la monovalente, y de ello resulta la formación del radical $O_2^{\cdot-}$, a partir del cuál se pueden formar las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés: Reactive Oxygen Species) para agrupar a compuestos que no constituyen un verdadero radical (Gastell y Pérez, 2000).

Los radicales libres son moléculas que poseen un número impar de electrones en su órbita más externa. Son muy inestables y pueden reaccionar con otras moléculas, entregando o recibiendo un electrón (Blanco, 1999). Las ROS se forman de la siguiente manera (Gastell y Pérez, 2000):

- La reducción univalente del oxígeno (O_2) produce el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) cuya fuente más importante es la NADPH oxidasa durante la respiración.
- A través de la enzima superóxido dismutasa, se genera el peróxido de hidrógeno (H_2O_2)* vía reacción de Fenton, y forma el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) que es miles de veces más reactivo que el $O_2^{\cdot-}$ y deriva fácilmente a la formación de nuevos radicales libres.

Los efectos nocivos de estos radicales se ejercen sobre diferentes componentes de las células, como el ADN, las proteínas, los lípidos, los carbohidratos y diversas enzimas: a) producen ruptura de ADN y modificaciones químicas de sus bases nitrogenadas; b) oxidan grupos sulfhidrilos de proteínas (se forman enlaces -S-S-),

* No es un verdadero radical, sin embargo se considera como ROS por su alta capacidad oxidante vía reacción de Fenton.

alterando la estructura de la molécula; c) atacan a los ácidos grasos insaturados de lípidos los componentes de las membranas celulares (formación de peróxidos), provocando la inestabilidad de las membrana celulares (Blanco, 1999).

Debido a lo anterior, existen mecanismos de defensa que neutralizan a ROS, como los antioxidantes (Cuadro VI), que al colisionar con ellos le ceden un electrón, que se oxida a su vez y se transforma en un ROS débil, no tóxico (Blanco, 1999).

Antioxidante	Acción
Enzimas	<ul style="list-style-type: none"> * Citocromo oxidasa: Encargada de evitar la reducción univalente del oxígeno. * Superóxido dismutasa: Especializada en captar el radical anión superóxido para convertirlo en peróxido de hidrógeno. * Catalasa y peroxidasas, glutatión peroxidasa: Neutralizan peróxidos.
Atrapadores	<ul style="list-style-type: none"> * Vitamina E: Neutraliza al OH^\bullet por su ubicación en las membranas donde su protección es particularmente importante. * Vitamina C: Por su carácter reductor, reacciona rápidamente en el $\text{O}_2^{\bullet-}$ y con el OH^\bullet, también es captor del oxígeno <i>singulete</i> ($^1\text{O}_2$)* y del ión hipoclorito. Además reestablece a la vitamina E, al reaccionar con el radical tocoferil. * Glutatión: Además de captar el H_2O_2 como sustrato de la glutatión peroxidasa, también capta al $^1\text{O}_2$ y al OH^\bullet.

Cuadro VI. Primera línea de defensa antioxidante.

**Singulete*: un átomo de oxígeno ($^1\text{O}_2$) derivado del oxígeno molecular (O_2).

APÉNDICE II

Drosophila melanogaster

Drosophila melanogaster (literalmente "amante del rocío, de vientre negro") (Figura 13), también llamada mosca del vinagre o mosca de la fruta, es un insecto díptero. Posee un reducido número de cromosomas (4 pares), breve ciclo de vida (10 a 12 días a 25°C) (Amorós, 2001). Aproximadamente el 61% de los genes de enfermedades humanas que se conocen tienen una contrapartida identificable en su genoma (Culliton, 2000) y el 25.2% de sus proteínas son similares, en 80% de su secuencia, a las de mamíferos (Rubin y cols., 2000). A nivel genético, *D. melanogaster* es uno de los organismos más extensamente estudiados (DIS, 2008). Las principales ventajas como organismo modelo se centran fundamentalmente en un tiempo de generación corto, una abundante descendencia y un fácil mantenimiento debido a sus reducidas dimensiones (Amorós, 2001).



Figura 13. *Drosophila melanogaster*

Presenta cuatro estadios que son: huevo (1 día), larva (4 días), pupa (5 días) y adulto (Figura 14). Llega a consumir de tres a cinco veces su peso, durante el estadio larvario, debido a la continua ingestión de alimento. La metamorfosis ocurre en la pupa, donde se forman las estructuras adultas (antenas, ojos, alas etc.) a partir de

tejidos embrionarios llamados discos imagales (Figura 15). El par de discos imagales de las alas consisten en aproximadamente 30,000 células en la pupa temprana, cuando inicia la diferenciación del ala. La madurez sexual del macho se da entre las seis y ocho horas, después de haber emergido del pupario, mientras que en la hembra tarda de diez a doce horas. La hembra fecundada por un macho puede depositar hasta 50-75 huevos en un día, posteriormente disminuye su producción (Graf, 1995; Mitchel y Combes, 1984).

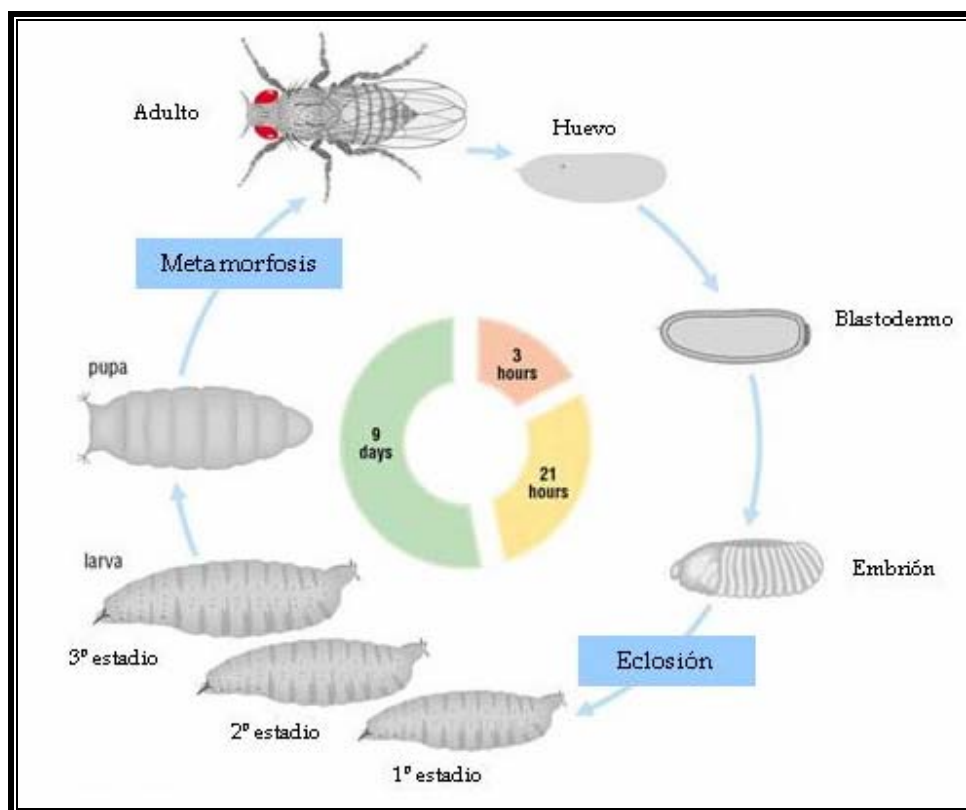


Figura 14. Ciclo vital de *Drosophila melanogaster* (Modificado de *Primers in Biology*, 2008).

Otra característica importante de este insecto, es la similitud que presenta en las enzimas CYP450 con las encontradas en la fracción S9 del hígado de mamíferos. Danielson y cols. (1998,1997), han probado que la familia CYP6 de *D.melanogaster* muestra una fuerte homología como la familia CYP3 de vertebrados.

Para investigar *in vivo*, los efectos de agentes químicos, se cuenta actualmente con líneas construidas con marcadores genéticos específicos. Este eucarionte ha sido utilizado en Genética Toxicológica debido a que presenta sensibilidad en la etapa de diferenciación celular, es decir, en las células de los discos imagales, en las cuales los mutágenos pueden ser activados (Graf y cols., 1996).

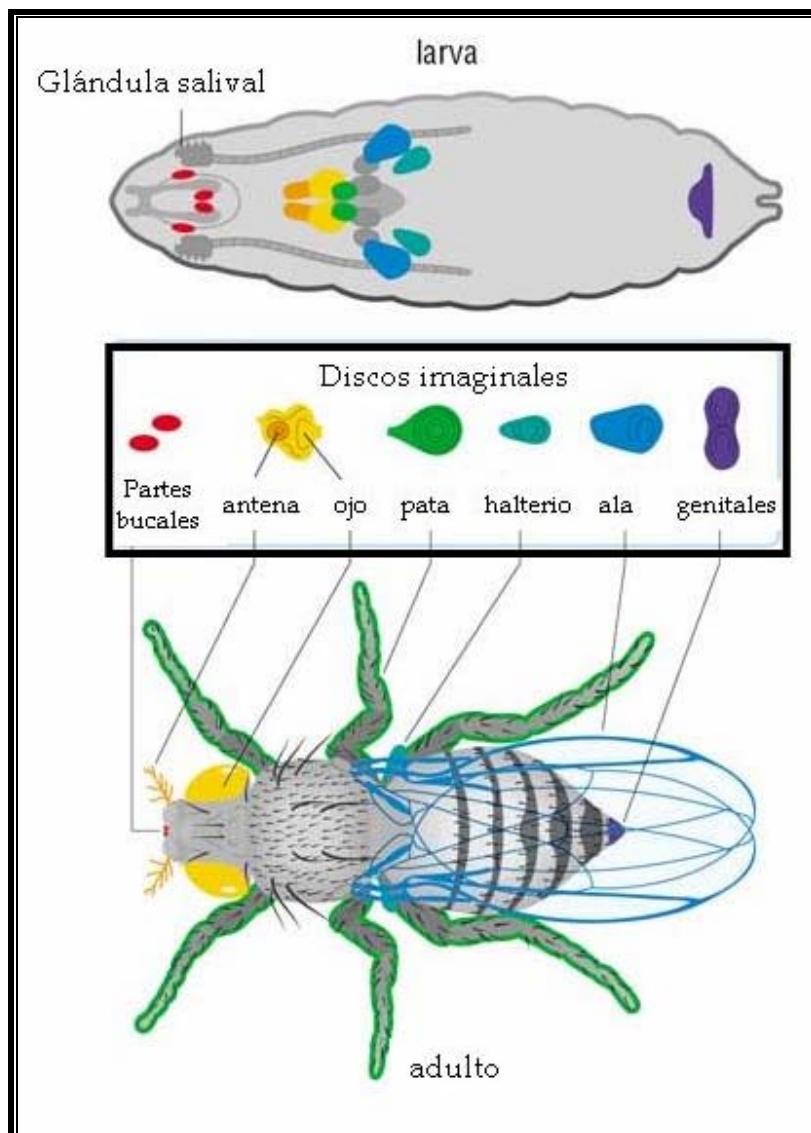


Figura 15. Morfología, localización y estructuras del adulto a las que darán lugar los discos imagales de *Drosophila melanogaster* (Modificado de *Primers in Biology*, 2008).

APÉNDICE III

PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICAS (SMART) EN ALA DE *D. MELANOGASTER*

La prueba SMART brinda la posibilidad de elaborar protocolos para la evaluación genotóxica y antigenotóxica de compuestos simples o mezclas complejas, mediante cotratamientos, pretratamientos y post-tratamientos en diferentes periodos (Graf y cols., 1998). Tomando en cuenta que *D. melanogaster* tiene genes similares al del humano (Culliton, 2000) esta prueba se utiliza para predecir la posible genotoxicidad y antigenotoxicidad en mamíferos (Guzmán-Rincón y Graf, 1995; Sharpe y cols., 2002).

La pérdida de heterocigosis de genes marcadores en células de los discos imagales de las larvas se expresa como manchas o clones de tricomas en alas de los organismos adultos. Al diferenciarse, cada célula del disco imagal del ala da origen a un tricoma, que se forma por la acumulación de fibras de actina en un polo de la célula; el tricoma crece durante la metamorfosis y posterior a ésta la célula muere y sólo es observable la presencia de los tricomas en la superficie de las alas. Al exponer a las larvas a un compuesto se puede determinar su efecto mediante métodos estadísticos, comparando el tipo y frecuencia de manchas en las alas con lo obtenido en organismos no expuestos (Guzmán-Rincón y Graf, 1995; Frei y Würigler, 1995). Las dimensiones de las manchas dependen del momento de la edad larvaria en que se provocó el daño y se formó el clon. Por ejemplo, se puede decir que un compuesto causa mutaciones de manera directa o temprana en el desarrollo larval, cuando aparecen clones *mwh* de manchas grandes; cuando la frecuencia de estos clones es elevado en manchas pequeñas quiere decir que el compuesto a prueba necesitó ser metabolizado para inducir mutación y que por consiguiente el daño no fue a temprana edad larval. Otro mecanismo es la no disyunción, que provoca aneuploidía (Graf, 1995) y con efectos citostáticos.

CULTIVO

El cultivo y propagación de *D. melanogaster* se realiza en frascos de vidrio de 250 ml con 5 g de hojuela de papa y 20 ml de solución conservadora en una incubadora a 25°C, humedad relativa (HR) de 65 % y total oscuridad. La colecta de huevos se lleva a cabo en medio de levadura activada con solución de sacarosa, bajo condiciones de oscuridad, a una temperatura de 25 ° C y HR 60% durante 8 h. (Guzmán-Rincón y Graf, 1995). Las preparaciones permanentes se realizan con el montaje de alas en solución de Faure (30 g de goma arábica, 20 ml de glicerol, 50 g de hidrato cloral y 50 ml de agua).


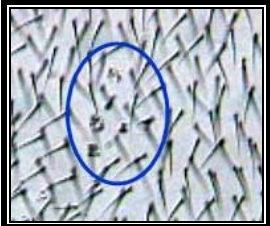

LÍNEAS Y MARCADORES

Las tres líneas de *D. melanogaster* con las que se cuenta son: “*flare³*” (*flr³/TM3, Bd^S*), “*Oregon-flare³*” (ORR (1); ORR (2); *flr³/TM3, Bd^S*) y “*multiple wing hairs (mwh)*” (*mwh/mwh*), que presentan los marcadores *mwh* (*multiple wing hairs*), *flr³* (*flare³*) y *Bd^S* (*Beaded-Serratia*) (Cuadro VII).

En (3LR) (3 *Left, Right*) TM3 (*Third Multiple 3*). El cromosoma balanceador con tres inversiones, dos paracéntricas (L y R) y una pericéntrica (L+R), que impide la formación de nuevos arreglos cromosómicos originados por recombinación produciendo así individuos heterocigotos para los marcadores letales en homocigosis, como es el caso de *flr³* y *Bd^S* (Graf y cols., 1996).

ORR (R) (“*de Oregon Resistent*”). La línea *Oregon-flr* posee el marcador *flr³* en carácter heterocigoto y presenta los cromosomas 1 y 2 de la línea Oregon. El cromosoma 2 acarrea la mutación dominante *Rst* (2) DDT localizada en la región 43E, (2-64.5), que provoca la expresión constitutiva de una proteína inductora de los genes CYP (CYP6a8 y CYP6a9 del cromosoma 1 y CYP6a2 del cromosoma 2). Estos genes 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 (Saner y cols., 1996).

Marcador	Descripción	Imágen
<i>mwh</i> (<i>multiple wing hairs</i>)	Mutación recesiva homocigótica viable localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-0.3). En homocigosis este marcador produce tricomas múltiples por célula en lugar del tricoma único de la condición silvestre.	
<i>flr³</i> (<i>flare³</i>)	Se caracteriza por una mutación que afecta la forma de los tricomas, se localiza en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-38.8) y es homocigota letal (Graf, 1995). Se mantiene la heterocigosis por efecto de un cromosoma balanceador (TM3).	
<i>Bd^S</i> (<i>Beaded-Serratia</i>)	Este marcador dominante se localiza en el brazo derecho, en el cromosoma 3 (3-92.5), es homocigoto letal y se identifica por muescas en el borde de las alas (Osaba y cols., 1999).	

Cuadro VII. Marcadores que presenta *D. melanogaster*.

CRUZAS ESTÁNDAR (E) Y BIOACTIVACIÓN ELEVADA (BE)

La craza E tiene niveles regulados de CYP450. Para esta craza se usan hembras de la línea *flare* (*flr³/TM3, Bd^S*) y machos de la línea *multiple wing hairs* (*mwh/mwh*). La craza BE tiene altos niveles constitutivos de CYP450. Para ésta se usan hembras de la línea Oregon-*flare* (ORR (1); ORR (2); *flr³/TM3, Bd^S*) y machos *mwh*.

Cada una de estas cruza produce dos tipos de genotipos: transheterocigotos *mwh flr³⁺/mwh⁺flr³* en craza E y en craza BE ORR(1)+; ORR(2)/+; *mwh, flr³⁺/mwh⁺, flr³* con alas de fenotipo silvestre; y heterocigoto *mwh flr³⁺/mwh⁺flr³⁺ TM3 Bd^S* para E y

ORR(1)/+; ORR(2)/+; *mwh*, *flr³⁺*/TM3, *Bd^S* para cruza BE, con alas de fenotipo Serratia. Por pérdida de heterocigosis (Figura 16a,b) se detectan los daños ocasionados por mutágenos como el MMS (Graf y cols., 1996). En las moscas con alas silvestre transheterocigotas se pueden producir daños como mutaciones y recombinación, mostrándose como manchas simples y gemelas. En las heterocigotas con alas Serratia, sólo se observan manchas simples causadas por mutaciones (Graf y cols., 1984).

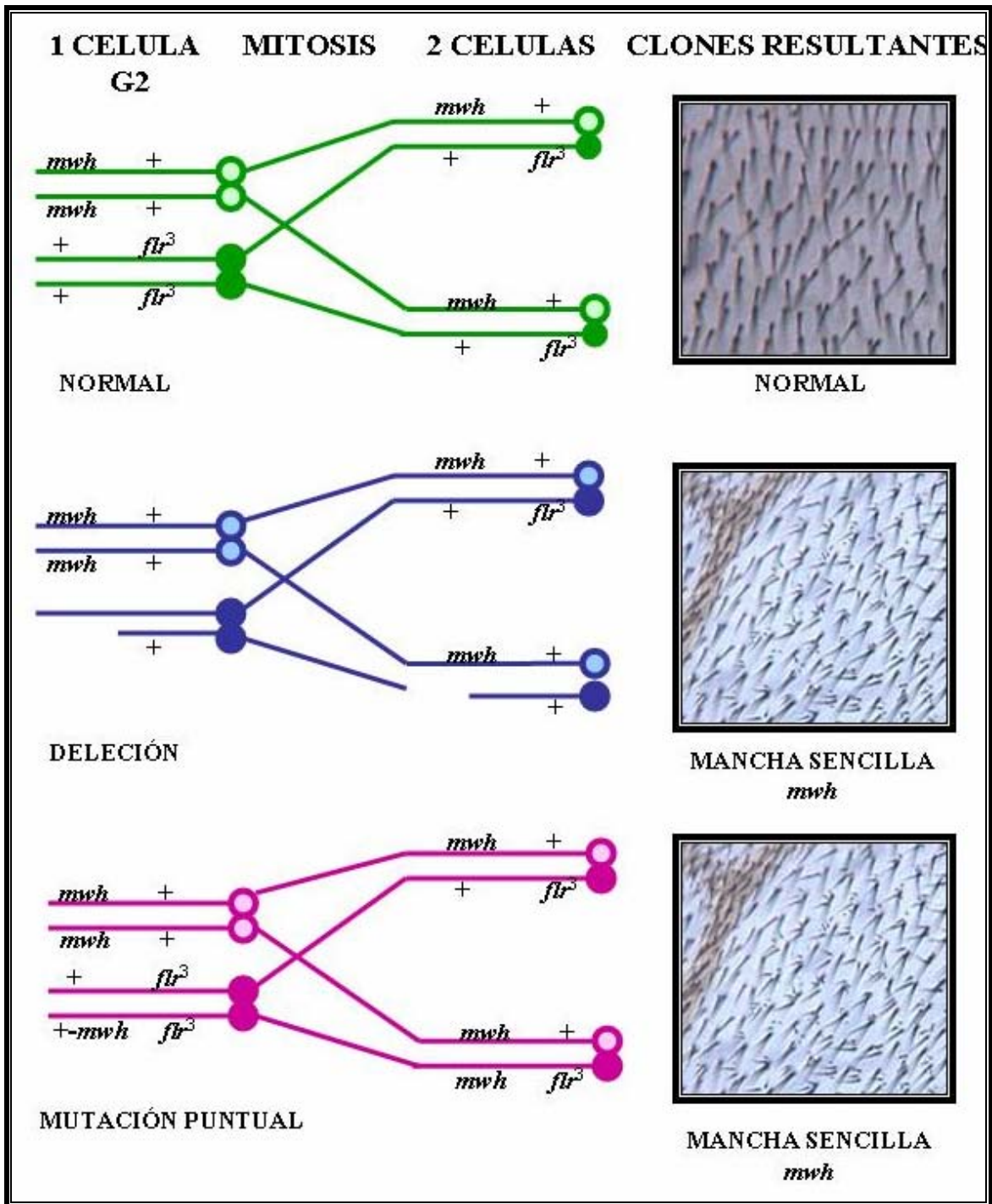


Figura 16a. Eventos que ocasionan la pérdida de heterocigosis para los marcadores *flr*³ y *mwh* en *Drosophila melanogaster*.

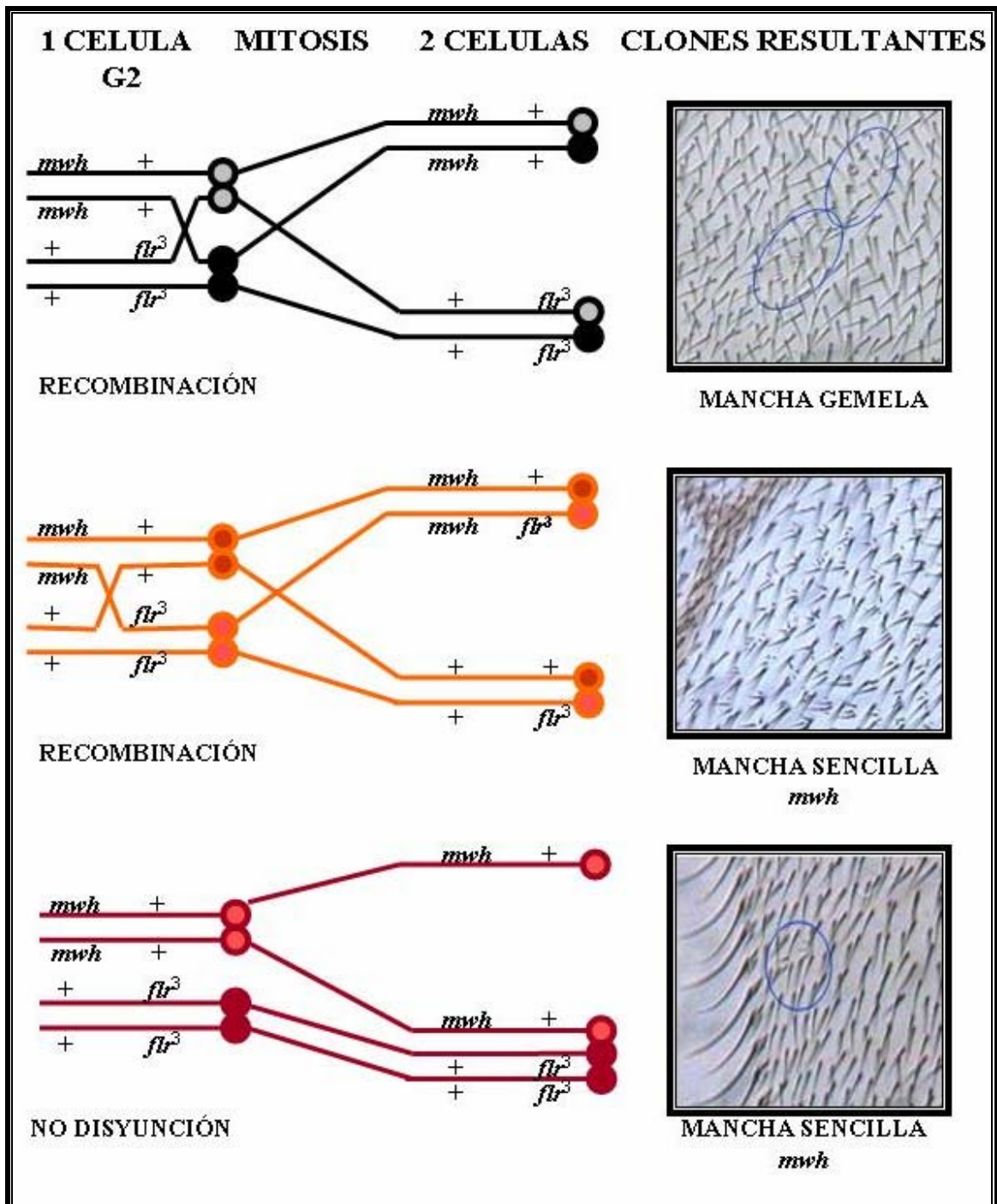


Figura 16b. Eventos que ocasionan la pérdida de heterocigosis para los marcadores *flr³* y *mwh* en *Drosophila melanogaster*.