



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

“Modulación del daño producido por el 4NQO
por parte de la Vit./FeSO₄ en función de los
niveles de CYP450 en *Drosophila melanogaster*”

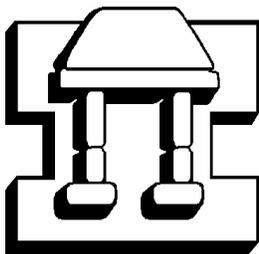
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

MARÍA DEL ROCÍO ARELLANO LLAMAS



IZTACALA

DIRECTORA DE TESIS:

M. en C. IRMA ELENA DUEÑAS GARCÍA

TLALNEPANTLA DE BAZ, EDO. DE MEX.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mi Papá José María Arellano: Porque sin tu apoyo, enseñanzas y virtudes no habría sido tan fácil llegar hasta este punto. Te quiero pa.

A mi Mamá Ángeles Llamas: Porque siempre has estado conmigo apoyándome en todo lo que he querido hacer aunque no te gustara del todo. Por decirme que estás orgullosa de mi y siempre haber creído que lograría lo que quisiera. Te adoro mamita.

A mi hermana Abril: Por ser la mejor hermana del mundo, la que me ha enseñado a enfrentar al toro por los cuernos. Con tus experiencias he aprendido más de lo que te imaginas. Te quiero nenita.

A mi hermano Esteban (Stevemaster): Por estar siempre conmigo, apoyarme, enseñarme, ser mi cómplice en tantas ocasiones, por hacerme ver la vida con objetividad y decir lo que pienso y siento acertadamente. Te quiero niño.

A Mickey: Por estar siempre que te he necesitado y ayudarme a reponerme en los ratos malos y hacer los buenos mejores. Por impulsarme a terminar con esta etapa de mi vida. Eres mi mejor amigo. Te quiero mucho.

A Vladi, Lucho, Sergio (Pingüino) y Víctor: Por todos esos momentos agradables en la FES y en Oaxaca y ofrecerme una amistad sincera.

A Sol: Por esas ocurrencias y forma tan peculiar de ser que siempre me hacían reír, relajarme y aprender.

A Vero y Navi: Por mostrarme otras perspectivas de la vida. Por todas las experiencias

A Consuelito: Por escucharme y aconsejarme en el mejor momento.

A Consuelito Vero y el Doc: Por todos esos días familiares.

A Karina: Por aguantar mis bromas, consolarme cuando lo necesité y sobre todo por resistir mi comportamiento.

A Rosa (Manzana) y Diana: Por tener los comentarios y explicaciones adecuadas y graciosas en el mejor momento.

AGRADECIMIENTOS

A Dios: Por darme la oportunidad hacer todo lo que he deseado. Te agradezco por la inmensa alegría que esta experiencia me ha dejado.

A la Maestra Irma Dueñas: Por ayudarme, enseñarme, escucharme y compartirme un pedacito de usted.

A la Maestra Maru Heres: Por hacerme amena mi estancia en el laboratorio por el simple hecho de seguirme la corriente y consecuentar mi forma de ser y brindarme su confianza.

Al Dr. Ignacio Peñalosa: Por ayudarme en todo y siempre, por demostrarme que si hay gente a la que le interesa compartir su conocimiento.

Al Dr. Ricardo Mejía: Por ser el mejor hermano mayor en quien puedo confiar. Usted es el Doc, Doc.

Al Dr. Sergio Vaca: Por hacer más llevaderas esas difíciles clases de Genética y echarle un ojo mi tesis.

A la Maestra Laura Castañeda: Por compartimos sus vivencias y sus cepas.

A mi adorada casa de estudios: UNAM que me ha permitido ver dentro de sus instalaciones la universalidad del pensamiento humano.

A mi amada carrera Biología: Por hacerme un ser mas sensible y empático con todo lo que me rodea y por no permitirme perder la capacidad de asombro.

A mi conciencia: Por alentarme cuando me faltaba aplicarme.

Así como el hierro se oxida por falta de uso, así también la inactividad destruye el intelecto.

Leonardo da Vinci.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
VITAMINA C O ÁCIDO ASCÓRBICO.....	4
Sistema Weissberger.....	9
Sistema de Udenfriend.....	9
Química Fenton.....	10
HIERRO.....	10
IMPORTANCIA DEL OXÍGENO.....	12
Reacción de Fenton-Haber-Weis.....	13
ESTRES OXIDATIVO.....	14
DAÑO AL DNA, REPARACIÓN Y APOPTOSIS.....	16
ÓXIDO-4-NITROQUINOLINA (4NQO).....	19
ANTECEDENTES.....	22
JUSTIFICACIÓN.....	24
OBJETIVO.....	26
OBJETIVO PARTICULAR.....	26
HIPÓTESIS.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	27
RESULTADOS.....	31
DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIÓN.....	46
BIBLIOGRAFÍA.....	47
ANEXO 1.....	69
METABOLISMO XENOBIÓTICO.....	69
Etapas del metabolismo y enzimas implicadas.....	70
CYP450s.....	71
Flavín-monooxigenasas.....	72
Biotransformación.....	73
ANEXO 2.....	75
OXÍGENO.....	75
ANEXO 3.....	77
DROSOPHILA MELANOGASTER Y SMART.....	77
a) Cruza Estándar (CE).....	82
b) Cruza de Bioactivación Elevada (CBE).....	83
c) Fundamento de SMART.....	83

ABREVIATURAS

DNA ácido desoxiribonucleico

Vit. C Vitamina C

DHA ácido deshidroascórbico

GSSH glutatión oxidada

ROS especies reactivas de oxígeno

NADPH nicotidamina adenosin dinucleótido,

Fe⁺² hierro valencia 2

Fe⁺³ hierro valencia 3

ATP adenosine trifosfato

SOD superóxidodismutasa

RH radical

GSH glutatión

-SH sulfhidrilo

+H protón

AB abásico

BER reparación por escisión de bases

NER reparación por escisión de nucleótidos

PARP *poli (ADP-ribosa) polimerasa*

4NQO óxido de 4nitroquinolina

UV ultra violeta

4HAQO 4hidroxiaminoquinilina

8OHdG 8hidroxiideoanosina

G: C guanina : citocina

A: T adenine : timina

SMART somatic and recombination test

DXR doxorubicin

CE cruza estándar

CBE cruza de bioactivación elevada

MV multivitamínica

BCO brócoli cultivado orgánicamente

BS Brócoli de supermercado

CYP450 citocromo P450

IDR índice diario recomendado

flr³ *flare³*

TM3 three multiple three

Bd^s beaded serratia

ORR óregon

mwh *multiple wing hair*

DIM *Drosophila instantant medium*

TW-OH tween-alcohol

8-oxoA 8-oxo adenina

MFO oxidasa function mixta

MO monoxigenasas

FAD *flavina-adenosina-dinucleótido*

MAO aminoxidasas

DAO diaminoxidasas

GST glutatión s transferasa

DIS *Drosophila information service*

“Modulación del daño producido por el 4NQO por parte de la Vit./FeSO₄ en función de los niveles de CYP450 en *Drosophila melanogaster*”

RESUMEN

El brócoli (*Brassica oleracea* var. *Itálica*) tiene propiedades quimioprotectoras atribuibles, entre otras cosas, a la vitamina C (Vit. C). Aunque ésta tiene efecto antioxidante, se ha reportado que puede actuar como un prooxidante en concentraciones excesivas de Fe⁺² que llevan a alterar el apareamiento de bases del DNA. El 1-óxido de 4-nitroquinolína (4NQO) es un mutágeno que provoca aductos de purina e incrementa las especies reactivas de oxígeno. Este trabajo pretende determinar el efecto genotóxico de la interacción 4NQO/Vit. C/ FeSO₄ en las cruzas Estándar (CE) y Bioactivación Elevada (CBE) de SMART en ala de *Drosophila melanogaster*. Se expusieron larvas de tercer estadio, de ambas cruzas, a tratamientos crónicos con 4NQO (2 mM), Vit. C (5.6 mM) y FeSO₄ (0.2 mM) y los cotratamientos 4NQO/ FeSO₄, 4NQO / Vit. C, Vit. C/ FeSO₄ y 4NQO/Vit. C/FeSO₄. Se agregaron 2 ml de cada solución en 0.5g de medio instantáneo para *D. melanogaster* (DIM). Se realizaron preparaciones permanentes de alas silvestres de ambas cruzas. Todos los compuestos se diluyeron en Tween 80-OH 5% (1:1). En la CE, que tiene niveles basales de citocromos P450, se obtuvo lo siguiente: (1) El efecto de FeSO₄ y Vit. C + FeSO₄ no fue estadísticamente diferente al testigo; (2) El testigo Vit. C aumentó significativamente la proporción de clones de 1-2 células; (3) Los cotratamientos 4NQO más Vit. C, FeSO₄ y Vit. C + FeSO₄ produjeron genotoxicidad con la siguiente jerarquía: 4NQO < 4NQO+Vit. C < 4NQO+FeSO₄ < 4NQO+Vit. C + FeSO₄; (4) Se confirma la diferencia sobre la genotoxicidad del 4NQO relacionada con los niveles de CYP450s. En La CE la Vit. C fue prooxidante. En la CBE no se obtuvieron diferencias con ninguno de los cotratamientos. Con Vit. C+FeSO₄ se moduló la genotoxicidad del 4NQO en la CE, por lo que la ausencia de daño en la CBE debe estar relacionada con los CYP450s y posiblemente los mecanismos de reparación y apoptosis. Los resultados con la mezcla Vit. C + FeSO₄ sugieren que ocurrió reacción Fenton *in vivo*.

Palabras clave: Vitamina C, CYP450s, 4NQO, Genotoxicidad

INTRODUCCIÓN

En este trabajo se reportan los hallazgos, de la tesis de investigación, “Modulación del daño producido por el 4NQO por parte de la Vit./FeSO₄ en función de los niveles de CYP450s en *Drosophila melanogaster*”, que pertenece al megaproyecto “Evaluación del efecto genotóxico del Brócoli (*Brassica oleracea* var. *Itálica*) y algunos de sus constituyentes”, dentro de la línea de investigación Genética Toxicológica¹ que lleva a cabo el Laboratorio del mismo nombre de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM. Para este campo de la toxicología, se requiere tener conocimientos en biología molecular y celular, farmacología, genética, química, bioquímica (metabolismo) y estadística, además de conocimientos profundos de la prueba de genotoxicidad y del modelo biológico utilizados.

La dieta juega un papel muy importante con respecto a la etiología y prevención del cáncer ya que impacta en todas las vías metabólicas relevantes, tales como la exposición a cancerígenos, la activación/desintoxicación de cancerígenos, la reparación y síntesis del DNA y la apoptosis. Muchos micronutrientes minerales y vitaminas actúan como sustratos y/o cofactores en reacciones clave de mantenimiento del DNA y la concentración exacta de éstos en la célula podría ser crítica. Sin embargo, los estudios que han investigado la relación entre la dieta y el cáncer, han sido complicados. En años recientes, se ha puesto mucha más atención al estudio del potencial mutagénico y/o cancerígeno de una amplia variedad de químicos presentes en la dieta (Sarvic, 1994). La importancia de estos estudios está basada en el papel que los factores antiriesgo juegan en la patogénesis de las enfermedades relacionadas con la mutagénesis. Consecuentemente, en adición a la aproximación tradicional de la prevención primaria de

¹ La genética toxicológica, como sub-especialidad de la toxicología, identifica y analiza la acción de agentes tóxicos dirigidos a los componentes del material genético de los organismos vivos. De esta manera, su principal objetivo, es el de detectar y entender las propiedades de agentes mutágenos, cuya afinidad es específica por los ácidos nucleicos, en particular por el DNA.

mutaciones y cáncer, la identificación de agentes quimiopreventivos² en la dieta representa otra estrategia efectiva en la modulación o inhibición de los procesos patológicos que resultan de la exposición a un número creciente de compuestos mutagénicos o cancerígenos presentes en el ambiente (Wattenberg 1983, 1985; Ferguson, 1994). Por el incremento en la ingesta de componentes quimiopreventivos, podría ser posible incrementar la protección contra el daño causado por compuestos genotóxicos³ y cancerígenos; sin embargo otro punto crucial que debe ser considerado es el hecho de que algunos moduladores, que ejercen efectos protectores en alguna situación dada, podrían convertirse en deletéreos cuando el mutágeno o el punto final bajo estímulo es modificado (Lehmann *et al.*, 2000).

Aunque la dieta ha sido considerada tradicionalmente la más importante fuente de vitaminas y minerales. En muchos países ha habido un incremento en la tendencia hacia la suplementación con niveles definidos de micronutrientes, ingeridos solos o como multivitamínicos (Linster y Van Schaffingen, 2007).

La evidencia epidemiológica indica que la ingesta de alimentos que son ricos en Vitamina C (Vit. C) están asociados con un riesgo reducido de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y varios tipos de cáncer. Pero la magnitud de su contribución a este efecto no está clara (Fenech y Ferguson, 2001). Tal es el caso del brócoli rico en Vit. C (4.1 mg/g), que en términos de genotoxicidad es una mezcla compleja, debido a que la interacción entre sus muchos compuestos puede tener diferentes efectos antagonistas o sinérgicos en combinación con agentes cancerígenos, y que se le relaciona con la capacidad de modificar la actividad enzimática de los Citocromos P450 (CYP450s) (Verhoeven *et al.*, 1997).

² Quimiopreventivo: sustancias químicas, naturales o sintéticas utilizadas con el fin de impedir o revertir la carcinogénesis.

³ El término “genotóxico” fue introducido en 1973 para abarcar “cambios hereditarios letales o transmisibles tanto en células somáticas como germinales” (Ehrenberg *et al.*, Ambio Special Report 1973). El término “Genotóxico” es un tanto más amplio que el término “Mutagénico”, pero no puede hacerse una clara distinción entre mutagénico y genotóxico. Ambos términos son ampliamente utilizados.

Comprender el mecanismo de acción quimioprotectora de los factores químicos de la dieta es extremadamente importante. Esto nos ayuda a relacionar la información obtenida en los estudios de laboratorio con situaciones humanas, estudios epidemiológicos y en el desarrollo de biomarcadores útiles para efectos de salud.

Un punto de atención ha sido el papel natural que llevan a cabo algunos antioxidantes en contra de la generación de tumores. Además de aceptarse ampliamente que la dieta rica en frutas y verduras protege contra el cáncer y otras enfermedades degenerativas en humanos (Block *et al.*, 1992; Hyrayama, 1994; Gillman *et al.*, 1995). Contrariamente, muchos estudios epidemiológicos han mostrado correlación inversa entre la ingesta de ciertos antioxidantes y el desarrollo del cáncer (Block, 1992; Byers y Perry, 1992; Ames *et al.*, 1995). Además ha existido mucho interés en estudiar los efectos de la Vit. C como protector del estrés oxidativo, desde que se pudo incorporar fácilmente y en dosis controladas en la dieta humana (Cárdenas *et al.*, 1997).

De tal forma que, existen reportes que sugieren que la Vit. C reduce exitosamente tanto el efecto clastogénico⁴ producido por muchos agentes químicos como los efectos de la radiación en ensayos *in vivo* (Hoda y Sinha 1991; Ghaskadbi *et al.*, 1992; Sarma y Kesavan 1993; Khan y Sinha 1996), y otros que han reportado que afecta las macromoléculas, y que podría ejercer efectos geno y citotóxicos⁵ (Shamberger, 1984).

VITAMINA C O ÁCIDO ASCÓRBICO

La Vit. C (Fig. 1) está presente en casi todos los alimentos de origen vegetal. Es un nutriente esencial en los humanos, primates y muchos otros animales debido

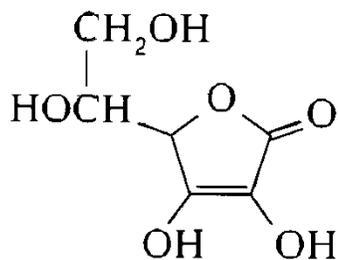
⁴ Clastogénico: Agente físico o químico capaz de inducir rupturas en los cromosomas y como consecuencia aberraciones.

⁵ Citotóxico: Agente o proceso que es dañino para la célula, lo cual significa que suprime las funciones de la célula o provoca su muerte.

a la ausencia de L-gulonolactona oxidasa (enzima que cataliza una de las etapas en la biosíntesis) (Linster y Van Schaffingen, 2007). La definición del requerimiento mínimo de Vit. C en humanos varía: Está definido como 40-60 mg/día para combatir las deficiencias de la dieta (Levine *et al.*, 1995, *Food Standards Agency* del Reino Unido, Organización Mundial de la Salud). Según este organismo no se deben exceder los 2000 mg/día, 400 mg/día (Linus Pauling Institute), 1.000 mg/día (Profesor Roc Ordman, para la investigación de los radicales libres), 3.000 mg/día (hasta 300.000 mg para enfermos), (Fundación para la vitamina C).

Bajo condiciones fisiológicas, la Vit. C existe predominantemente en su forma reducida, como el ácido ascórbico, también se pueden encontrar trazas de su forma oxidada, o deshidro-ascorbato (DHA). Hay dos mecanismos conocidos de transporte de Vit. C a la célula. Un sistema universal, presente en todas las células, la transporta como DHA por la vía facilitada de los transportadores de glucosa. Una vez adentro, el DHA es rápidamente reducido y se acumula como ácido ascórbico. En el segundo sistema de transporte, funcional en células especializadas, es en el que la Vit. C es transportada directamente por la vía sodio-dependiente con co-transportadores.

Figura 1. Estructura molecular de la Vitamina C o Ácido Ascórbico



La vitamina C es una molécula hidrosoluble que se encuentra intra y extracelularmente en la mayor parte de los sistemas biológicos. Reacciona directamente con los radicales libres y se convierte en DHA. El DHA se regenera

por la deshidroascorbato reductasa que utiliza glutatión reducido y lo oxida a GSSG. Otra función importante del ácido ascórbico es restaurar las propiedades antioxidantes de la vitamina E (Chen *et al.*, 2003; Stahl y Sies, 1997).

Es un poderoso antioxidante en el plasma y en la célula, extinguidor de especies reactivas de oxígeno (ROS, Reactive Oxygen Species, por sus siglas en inglés⁶) y de nitrógeno. Intracelularmente puede prevenir la muerte celular e inhibir mutaciones inducidas por estrés oxidativo.

Durante el proceso de extinción de radicales libres, el ascorbato dona un electrón transformándose en el intermediario inestable, ascorbil, que puede revertirse a ascorbato. El radical ascorbato puede donar un segundo electrón y ser convertido a DHA y éste a su vez, puede ser reducido hasta ser otra vez Vit. C o ser irreversiblemente hidrolizado a ácido 2,3-diceto-gulónico, el cual después es metabolizado hasta ácido treónico y oxálico (Fig. 2). En células tratadas con Vit. C y expuestas a peróxido de hidrógeno (H₂O₂), la Vit. C es convertida a DHA, alternativamente, el DHA intracelular puede ser transportado a los organelos.

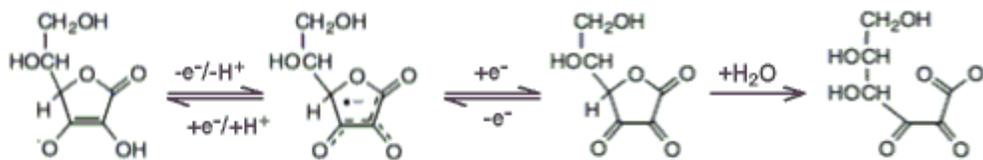


Figura 2. Metabolismo de la Vit. C

El farmacóforo⁷ de la Vit. C es el ion ascorbato, el cual realiza muchas funciones importantes; la mayoría de las enzimas que utilizan la Vit. C como

⁶ Ver apartado Importancia del oxígeno.

⁷ Farmacóforo: Parte de la molécula que produce los efectos fisiológicos específicos de un medicamento. *pharmak(o)*- φάρμακον gr. 'medicamento', 'veneno' + *-phor(o)*- -φορος gr. 'que lleva'

cofactor, están localizadas en el retículo endoplásmico como las prolil y lisil hidrolasas, las cuales catalizan la producción de entrecruzamientos de colágeno a través de modificaciones después de la translocación y plegamientos (Suberlich, 1994). También interviene de manera importante en la absorción del hierro a través de su capacidad reductora. La importancia del ascorbato como un antioxidante en fases acuosas ha sido establecida por muchas décadas, y químicamente se le ha reconocido como un acarreador de especies reactivas de oxígeno ha sido bien descrita. Además, modula el estado redox manteniendo los compuestos sulfhidrilo, incluyendo al glutatión, en su estado reducido. Se ha sugerido que *in vitro* repara hidroperóxidos de proteína, por una aparente regeneración de los aminoácidos por reducción (Fenech y Ferguson, 2001).

Como se mencionó, el ascorbato existe predominantemente en la sangre y en el cuerpo en su forma oxidada, DHA, donde comprende sólo 5-7% del total de la Vit. C., comparado con estos en tejido son más elevados (6-8 mM en leucocitos), donde es transportado por un gradiente de concentración (Ek *et al.*, 1995). El transporte de DHA está mediado por muchas isoformas del transportador de glucosa, donde la forma oxidada es transportada más rápido que la forma reducida (Vera *et al.*, 1993). De esta manera el DHA en plasma es mantenido a niveles bajos. En apoyo a esto, el acarreo de Vit. C como DHA es promovido por la insulina e inhibido por la hiperglicemia (Cunningham, 1998). La reducción enzimática y no enzimática de DHA hacia Vit. C ocurre en todos los tipos celulares mayormente en el retículo endoplásmico (Bode, 1997). Se han propuesto muchos candidatos para esta catálisis, entre ellos la NADPH oxidoreductasa, con la concomitante generación de equivalentes oxidantes dentro del lumen.

La Vit. C tiene una potente actividad prooxidante en presencia de iones metálicos, donde actúa como un agente reductor promotor de la reacción Fenton. Así, las bajas concentraciones de ascorbato incrementan la actividad

del radical oxígeno, mientras que las altas concentraciones acarrearán radicales hidroxil ($\cdot\text{OH}$), oxígeno singulete ($\cdot\text{O}$) y peróxidos lipídicos. A través del acarreo de peróxidos lipídicos, la Vit. C es un inductor potente de la apoptosis (Sakagami *et al.*, 2000), este mecanismo de acción parece reflejar un proceso de señalización y actúa como un activador de la cascada de caspasas más que en la regulación de la expresión de los genes. Lo anterior tendría que ser probado ante el daño oxidativo *in vivo* y la mejoría por suplementación con dosis prolongadas de Vit. C. La dosis de ascorbato, que es protectora *in vitro*, podría no serlo *in vivo* (Griffiths y Lunec 2001). La existencia fisiológica y relevante de la naturaleza prooxidante de la Vit. C ha sido cuestionada, pero la evidencia del incremento en los niveles de productos de la oxidación del DNA en sujetos con suplementos de Vit. C lleva a aceptar la hipótesis de que ésta puede actuar como prooxidante *in vivo* (Podmore *et al.*, 1998; Rehman *et al.*, 1998).

La Vit. C tiene un gran número de interacciones conocidas con los iones metálicos. Estas interacciones involucran reacciones redox que incluyen 1) catálisis del ion metálico de la oxidación del ácido ascórbico con formación de peróxido de hidrógeno concomitante y generación de radical hidroxil (sistema Weissberger) (Weissberger *et al.*, 1943; Khan y Martell, 1967) 2) activación del oxígeno molecular hasta llegar a la oxidación de la mitad de los aromáticos endógenos (sistema de Udenfriend) (Udenfriend *et al.*, 1953; Brodie *et al.*, 1953) 3) reacciones de reducción del Fe^{+3} a Fe^{+2} facilitando que se involucre en la activación de los peróxidos (reacciones Fenton) (Childs *et al.*, 2001).

Sistema Weissberger

La catálisis del ion metálico en la oxidación del ácido ascórbico, ha sido un proceso establecido para la formación de peróxido de hidrógeno. La reacción fue estudiada en detalle inicialmente por Weissberger *et al.*, en 1943 y subsecuentemente por Khan y Martell (1967), aunque la reacción entre el ácido ascórbico y el oxígeno procede lentamente en ausencia de iones metálicos, la introducción de iones metálicos redox activados en cantidades catalíticas generalmente incrementa la velocidad de reacción. La constante para la autooxidación del ácido ascórbico está reportada como $5.87 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ (Khan y Martell, 1967). La constante catalítica en presencia de Fe^{+3} es incrementada a $6.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$. Es muy importante que en presencia de quelantes del ion metálico, diferentes a la Vit. C, la reacción procede a formar Fe^{+2} el cual podría reaccionar rápidamente con peróxido de hidrógeno para generar $\cdot\text{OH}$ (Khan y Martell 1967). Esta generación del tóxico $\cdot\text{OH}$ a partir de un sistema simple que contiene iones metálicos, ácido ascórbico y oxígeno tiene consecuencias potencialmente deletéreas debido a la naturaleza ubicua de estos componentes en tejidos enfermos. Bajo estas condiciones es imperativo restringir la ingesta de Vit. C hasta los niveles de ingesta diaria recomendada.

Sistema de Udenfriend

En modelos químicos, el sistema Udenfriend ha demostrado hidroxilar compuestos aromáticos, hidrocarburos saturados transformándolos en alcoholes, y olefinas a epóxidos (Khan y Martell, 1967). Se ha distinguido del sistema Weissberger en el mecanismo y tipo de oxidación de los productos generados (Khan y Martell, 1967) El sistema Underfriend involucra al ácido ascórbico como un complejo donador de dos electrones al metal de transición, como el Fe^{+2} (Udenfriend *et al.*, 1953). Se ha especulado que en la presencia de oxígeno molecular el complejo entre Fe^{+2} y ácido ascórbico

resulta en la formación de una especie reactiva de oxígeno especulando que sea el $\cdot\text{OH}$ (Kasai y Nishimura, 1991). El mecanismo propuesto muestra la oxidación del ácido ascórbico a ácido deshidroascórbico, por la transferencia de un electrón hacia el Fe^{+2} y subsecuentemente hidroxilación del compuesto aromático (Martell y Taqui, 1973). Se ha mostrado que esta reacción se incrementa cuando el hierro está acoplado con un quelante, por ejemplo en complejos hierro-citrato encontrados en los biofluidos (Parkes *et al.*, 1991).

Química Fenton

La reacción Fenton involucra la reducción de peróxido de hidrógeno catalizada por un metal para generar especies oxidantes poderosas. Los metales de transición tienen estados de oxidación variantes y por eso son capaces de catalizar reacciones de oxidación y reducción. En la sangre, el hierro circulante está fuertemente unido a la proteína transferrina, la cual reduce su potencial de reducción, y subsecuentemente su reactividad con el peróxido de hidrógeno. En las enfermedades crónico inflamatorias el depósito de un ion metálico de baja masa molecular puede resultar en i) vascularización comprometida, ii) la activación de la hemoxigenasa y iii) liberación de las proteínas fuente vía superóxido (Halliwell y Gutteridge, 1999). El sistema Fenton puede generar radicales hidroxil a partir de un ion metálico provocando la activación del peróxido de hidrógeno (Srivastava *et al.*, 1989). El ácido ascórbico puede entonces reciclar el Fe III a Fe^{+2} favoreciendo la generación de $\cdot\text{OH}$ por ciclos Fenton subsecuentes.

HIERRO

El hierro, ha sido un metal esencial, íntimamente relacionado a la vida y se ha encontrado en sitios catalíticos de muchas proteínas vitales. La deficiencia de

hierro lleva a la anemia, especialmente durante los períodos de crecimiento como en la infancia, adolescencia y embarazo (de Freitas y Meneghini 2000). Este metal, en forma activa redox, representa un sistema catalítico transportador de electrones potencialmente peligroso; está involucrado en reacciones redox en la célula, y los niveles altos de hierro incrementan la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo a través de la iniciación de reacciones tipo Fenton (Dabbagh *et al.*, 1994; Iyer y Struhul, 1996; Galaris y Evangelou, 2002). Aun así, los organismos y las células tienen varios mecanismos desarrollados para reducir la sobrecarga de hierro tales como una alta regulación del transporte del hierro transmembranal, quelantes intracelulares y enzimas que destruyen las especies reactivas de oxígeno. Un desbalance en estos sistemas puede generar mutaciones, cáncer, inflamación, diabetes, y enfermedades hepáticas, cardíacas y neurológicas (Fraga y Oteiza, 2002; Fenech y Ferguson, 2001).

Así, no es sorprendente que la naturaleza maneje el hierro con sumo cuidado; usualmente el metal está impedido a reaccionar con peróxidos al encontrarse escondido dentro de proteínas o de otras estructuras formando complejos, que impiden que participe en reacciones de transferencia electrónica (Kakhlon y Cabantchik, 2002).

A pesar de lo anterior, la suplementación con hierro es muy común, y algunas veces es tomado en conjunto con la Vit. C para ayudar a su absorción. Los efectos dañinos de una alta ingesta de cada uno por separado, sales de hierro o Vit. C, justifica una seria consideración. Por lo tanto, en tándem este “cocktail” es un veneno potente. La interacción incontrolada entre la Vit. C y las sales de hierro lleva al estrés oxidativo.

La cosuplementación de sales de hierro con Vit. C exagera el estrés oxidativo en el tracto gastrointestinal, predisponiendo a los individuos a la ulceración, desórdenes inflamatorios y al aumento de desórdenes crónicos existentes y puede causar cáncer (Fenech y Ferguson, 2001).

IMPORTANCIA DEL OXÍGENO

El oxígeno molecular, vital para la existencia de los organismos aerobios, es inherentemente tóxico. Esta paradoja deriva de la misma naturaleza química del oxígeno. Animales, plantas y muchos microorganismos disponen del oxígeno para una eficiente producción de equivalentes energéticos en forma de ATP.

El lado perjudicial del oxígeno se relaciona directamente con el hecho que cada átomo de oxígeno posee un electrón desapareado en su orbital externo y la molécula de oxígeno posee dos electrones desapareados en dos orbitales distintos, de manera que el átomo de oxígeno es un radical libre y la molécula de oxígeno un bi-radical libre. La reducción tetravalente concertada del oxígeno por la cadena de transporte electrónica mitocondrial para producir agua, se considera un proceso relativamente seguro; sin embargo, el ambiente reducido intracelular proporciona amplias oportunidades para que el oxígeno sufra la reducción univalente que es la causante de la generación de los intermediarios reactivos. El radical súper óxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo son los subproductos de esta reducción univalente, denominados ROS y responsables de la toxicidad del oxígeno (Gastell y Pérez, 2000).

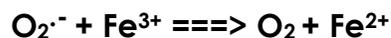
En este ambiente aerobio poco favorable, los organismos vivos han desarrollado una serie de sistemas enzimáticos y una variedad de compuestos antioxidantes hidro y liposolubles, cuya función es secuestrar, interceptar e

inactivar las ROS que se producen inevitablemente. La célula posee también la capacidad de sintetizar una serie de sistemas enzimáticos reparadoras/eliminadoras de la lesión en proteínas, lípidos y DNA.

Como la intensidad del estrés oxidativo puede variar de un momento a otro, los organismos pueden adaptarse al estrés fluctuante induciendo en un determinado momento la síntesis de enzimas antioxidantes y reparadoras cuya misión es evitar o eliminar la lesión.

Reacción de Fenton-Haber-Weis

La producción primaria de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 es capaz de iniciar y sostener una reacción en cadena en condiciones fisiológicas que abarcan las reacciones de lipoperoxidación. Las especies $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 son los reactivos responsables de los procesos de iniciación de las reacciones siguientes:



En esta última reacción se genera $\cdot OH$ y se denomina de Fenton-Haber Weiss ya que ellos describieron originalmente la descomposición del peróxido de hidrógeno por sales de hierro. Imlay *et al.* (1988) han sugerido que el daño al DNA podría ser causado *in vivo* por el H_2O_2 vía ésta reacción (Ames *et al.*, 1993; Galaris *et al.*, 2006; Balaban *et al.*, 2005; Brenneisen *et al.*, 2005). La acción protectora de la súper óxido dismutasa (SOD) y la catalasa, al eliminar el H_2O_2 se comprende que mantenga baja la tasa de generación del $\cdot OH$. El $\cdot OH$ es capaz de iniciar las reacciones de propagación con ácidos grasos no

saturados (RH) para generar hidroperóxidos estables, según las siguientes reacciones:



ESTRES OXIDATIVO

La continua generación y eliminación de los ROS es un fenómeno común en la vida aeróbica. Por lo tanto, en condiciones de incremento en la producción o una baja en la eliminación de estas especies puede llevar a un estado aumentado en células y tejidos, situación conocida como estrés oxidativo (Barbouti *et al.*, 2002).

El estrés oxidativo es un estado de la célula en la cual se encuentra alterada la homeostasis de la óxido-reducción intracelular, que se produce a causa de una excesiva producción de ROS y/o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes, conduciendo a daño celular.

El estado de óxido-reducción de la célula está determinado por el equilibrio entre las parejas de óxido-reductiva de los distintos compuestos biológicos presentes en ella, principalmente de aquellos que se encuentran en mayor proporción. El glutatión (GSH, g-L-glutamil-L-cisteinil-glicina), debido a su alta concentración intracelular (5-10 mM), se considera un regulador homeostático del estado de óxido-reducción celular. Este metabolito predomina ampliamente en su forma reducida (GSH) sobre la oxidada (GSSG). Esto trae como consecuencia que un ligero desplazamiento del equilibrio hacia la forma oxidada afecte de manera alarmante el estado de óxido-reducción general, debido a su participación en muchos equilibrios de óxido reducción acoplados.

En particular esto es crítico para la regulación de algunos factores de transcripción, cuya actividad depende del estado de óxido-reducción en el que se encuentren. Cuando un grupo -SH crítico sufre una modificación oxidativa la proteína afectada puede perder su funcionalidad (Barbouti *et al.*, 2002)

Las ROS endógenas como producto del metabolismo xenobiótico (ver Anexo 1) y el metabolismo aerobio pueden causar daño oxidativo a las macromoléculas celulares. Las lesiones al DNA resultantes de la exposición a ROS incluyen modificaciones de bases, sitios abásicos, rompimientos sencillos y dobles y entrecruzamientos (Halliwell y Aruoma, 1991). El daño continuo al DNA por radicales libres puede contribuir al envejecimiento, al cáncer y a otras enfermedades degenerativas relacionadas con la edad (Ames, 1989; Loft y Poulsen 1996).

Bajo condiciones fisiológicas, en los organismos, se forman varias ROS por descomposición enzimática y no enzimática. Los niveles elevados de ROS pueden iniciar la peroxidación lipídica, dañar al DNA y a las proteínas.

El hierro y otros metales de transición participan en la formación de ROS y en la peroxidación lipídica. El $\cdot\text{OH}$ es muy reactivo (Schaich, 1992) pero su papel al igual que otros ROS en la peroxidación lipídica no es muy claro (Halliwell y Gutteridge, 1986; Fridovitch, 1989; Velisek, 1999; Tien *et al.*, 1981; Minota y Aust 1987 y Yushino y Muramaki, 1998). *In vivo* el $\cdot\text{OH}$ podría formarse vía reacciones Fenton. El Fe se presenta en el organismo unido a la hemoglobina o a la ferritina y puede ser liberado de estos complejos por acción de ROS, Vit. C o peróxidos lipídicos. La Vit. C puede transferir electrones o ^+H al O_2 y OH a los metales de transición (Hwang *et al.*, 2000), lo cual indica por qué la Vit. C puede tener efectos pro y antioxidantes (Ozgová *et al.*, 2003).

Como se mencionó anteriormente el estrés oxidativo está implicado en gran variedad de condiciones patológicas, incluyendo el cáncer y el envejecimiento (Ames *et al.*, 1993; Griendling y Harrison, 1999; Galaris y Evangelou, 2002; Balaban *et al.*, 2005; Brenneisen *et al.*, 2005; Halliwell, 2006; Galaris *et al.*, 2006).

El H_2O_2 puede modular funciones celulares fundamentales como el crecimiento, la proliferación y diferenciación celular o provocar la muerte de ésta (Yu *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002). La alteración del proceso apoptótico puede contribuir al desarrollo de muchas enfermedades vinculadas con la acumulación de células indeseables o pérdida celular como resultado de una excesiva apoptosis (Vaux y Korsmeyer, 1999; Tenopoulou *et al.*, 2005).

Además, generalmente se cree que el H_2O_2 afecta directamente las funciones mitocondriales, induciendo la liberación de factores apoptogénicos hacia el citosol y se han presentado evidencias de que el H_2O_2 interactúa inicialmente con iones de hierro redox-activado llevando a la generación de radicales hidroxil y subsecuentemente a la ruptura de la membrana lisosomal (Doulis *et al.*, 2003; Antunes *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2003) Además se han propuesto muchos mecanismos, aunque no son muy claros, en que la desestabilización lisosomal puede afectar variables como la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Barbouti *et al.*, 2002).

DAÑO AL DNA, REPARACIÓN Y APOPTOSIS

El ciclo mitótico de las células eucariotas involucra una secuencia ordenada de eventos que resultan en una transmisión exitosa de material genético a las células hijas. La entrada al ciclo celular mitótico está regulado por señales específicas (Siede *et al.*, 1993).

Las células tienen múltiples respuestas al daño al DNA, que están clasificadas como reparación del DNA o tolerancia del DNA al daño. Como su nombre lo dice, la reparación del DNA abarca mecanismos de reversión del daño que involucran la catálisis por enzimas, escisión de bases dañadas, así como nucleótidos que son incorporados incorrectamente durante la replicación del DNA. La tolerancia del DNA al daño involucra muchas respuestas celulares distintas, por las cuales los efectos potencialmente letales de la replicación de DNA con bases dañadas son mitigados. La eficiencia de la reparación del DNA y su tolerancia al daño están influenciadas por respuestas regulatorias.

Hay una variedad de mecanismos que permiten reconocer el daño al DNA y repararlo. De acuerdo con su principal tipo de acción durante el ciclo celular mitótico, se clasifican en pre-replicativos, dependientes de la fase S y post-replicativos. Los agentes químicos pueden unirse covalentemente a las bases del DNA o causar sitios abásicos (AB). Las bases modificadas pueden ser eliminadas por el sistema de escisión de bases (BER); las lesiones mayores, que son más complejas y menos específicas, son eliminadas por escisión de nucleótidos (NER) que contiene con una gran variedad de alteraciones en las bases. La reparación por NER es la mejor forma de reparar el daño de bases, que pueden resultar en distorsiones en la estructura del DNA y en consecuencia interferir con el apareamiento normal de bases. NER es activada por dímeros de pirimidina, por exposición a la luz U.V. (Friedberg *et al.*, 2004).

En BER las glicosilasas eliminan las bases alteradas (son cambios en las bases nitrogenadas que se forman por exposición a luz UV, radicales $\cdot\text{OH}$ y ciertos agentes químicos como el 4NQO dejando un sitio AB. La reparación de estas lesiones continúa con la actividad de endonucleasas AB que catalizan el corte del DNA en los sitios AB, preparando al DNA para la escisión, síntesis y unión de la cadena. Se han identificado dos clases de enzimas para el primer paso de

este tipo de reparación: Glicosilasas simples, que remueven la base y forma un sitio AP y las glicosilasas que remueven la base y además están asociadas a una actividad endonucleasa por lo que cortan el enlace fosfodiéster en el sitio AP. Estas enzimas se conocen como liasa AB. La mayoría de las lesiones producidas por radicales son corregidas por BER (Heres-Pulido, 2001)

La mayor parte de las lesiones producidas por el estrés oxidativo en las bases del DNA son reparadas por BER. El metabolismo que depende del oxígeno se ha relacionado con enfermedades cardiovasculares, cáncer, degeneración neuronal, disfunción de la inmunidad y envejecimiento. Sin embargo, las células, contienen sistemas de reparación que las protegen del estrés oxidativo (Friedberg *et al.*, 2004)

La apoptosis es un proceso activo de muerte celular caracterizado por la contracción celular, hinchamiento de la membrana, condensación de la cromatina y fragmentación del DNA (Nishimura, 1999). El deterioro del proceso apoptótico ha sido implicado en muchas enfermedades (Chinnaiyan y Dixit 1996). Se sabe que muchos eventos mitocondriales específicos preceden a la apoptosis, incluyendo la alteración del rango de Bcl-2/Bax y la traslocación citosólica del citocromo C el cual a su vez puede inducir una cascada apoptótica de activación de caspasas y disminución de PARP⁸ [poli (ADP-ribosa) polimerasa] (Jayshree *et al.*, 2000; Kluck *et al.*, 1997).

La apoptosis juega un papel importante en la repuesta celular al estrés genotóxico y se ha pensado que la pérdida de la respuesta apoptótica en las células es uno de los mecanismos involucrados en la evolución tumoral maligna (Arends y Wyllie, 1991).

⁸ PARP: Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa (PARP-1), es una enzima nuclear de 116 kDa, que cataliza la transferencia de unidades de ADP-ribosa empleando como sustrato NAD⁺, sobre residuos carboxílicos de glutámico y aspártico de proteínas nucleares. Una de las funciones biológicas de la PARP-1 es la reparación del DNA y el mantenimiento de la integridad del genoma. Esta proteína nuclear funciona como sensor activándose en respuesta al daño del DNA de causa isquémica, señalizando la ruptura de su cadena. Cuando la intensidad del daño al que esta expuesto el DNA es severa, el estrés oxidativo induce una sobreactivación de PARP -1, que tras consumir el NAD⁺ y disminuir de ATP las células, produce disfunción celular y muerte por necrosis.

Dos genes efectores importantes, *bcl-2* y *bax*, están involucrados en las rutas apoptóticas. El protooncogen *Bcl-2* fue descubierto originalmente por análisis de translocación cromosómica asociada con linfoma folicular humano B-cell (Bakhshi *et al.*, 1985; Tsujimoto *et al.*, 1985; Tsujimoto y Croce, 1986). El gen *bcl-2* codifica una proteína de membrana que se ha encontrado en la membrana nuclear, en la superficie interna de la membrana mitocondrial y en el retículo endoplásmico (Krajewski *et al.*, 1993; Akao *et al.*, 1994) este último ha mostrado funcionar como supresor de apoptosis (Vaux *et al.*, 1988). *Bcl-2* se expresa generalmente en linfocitos y neuronas (Negrini *et al.*, 1987; Hockenbery *et al.*, 1991; Eguchi *et al.*, 1992) y su sobreexpresión se ha reportado en muchos tumores (Pezzella *et al.*, 1993; Ikegaki *et al.*, 1994).

La proteína *Bax* está considerada como el efector más importante de apoptosis, *Bax* forma homodímeros o heterodímeros con *Bcl-2*. La función de *Bax-Bax* en la muerte celular activa es antagonista de *Bax-Bcl-2* (Oltvai *et al.*, 1993). De esta manera la proporción de *Bcl-2* y *Bax* debería controlar la susceptibilidad de las células a los estímulos que inducen muerte celular apoptótica (Yin *et al.*, 1994).

ÓXIDO-4-NITROQUINOLINA (4NQO)

El 4NQO (Fig. 3) es un potente cancerígeno (Kitano, 2000; Nagao y Sugimura, 1976) que imita a la luz ultravioleta en muchos de sus efectos biológicos (Ikenega *et al.*, 1975; Stich *et al.*, 1973) y en muchos de los sistemas de reparación (Kondo y Kato, 1968; Ikenega *et al.*, 1975; Yamamoto *et al.*, 1970; Tekebe *et al.*, 1972; Walker, 1984; Bailleul *et al.*, 1989) por estas razones se ha usado como testigo positivo en pruebas de genotoxicidad (Chan y Walter 1977; Synderwine y Bohr, 1992).

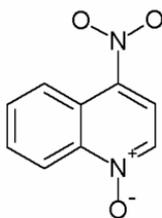


Figura 3. Estructura molecular del óxido-4-Nitroquinolina (4NQO)

Las propiedades cancerígenas y mutagénicas del 4NQO se reportaron por primera vez en 1957 (Nakahara *et al.*, 1957). Es un modelo químico que ha sido extensamente estudiado con respecto a su acción cancerígena, mutagénica, formación de aductos de DNA y reparación (Nagao y Sugimura, 1976; Bailleul *et al.*, 1989). Normalmente el 4NQO es activado en las células, a través del metabolismo xenobiótico (Anexo 1), en forma de acil-4HAQO el cual se torna reactivo con el DNA principalmente con las guaninas y después con las adeninas (Galiegue-Zoutina *et al.*, 1986). Se ha observado que el monoacetil y el diacetil-4HAQO reaccionan con el DNA (Tada, 1975) *in vitro* para formar monoadductos covalentes en la C8 o en el N2 de desoxiguanosina y el N6 de la desoxiadenosina en el DNA (Bailleul *et al.*, 1989; Nagao y Sugimura, 1976), los mismos productos que se forman *in vivo* (Galiegue-Zoutina *et al.*, 1986; Panigrahi y Walker, 1986). Se han identificado tres aductos primarios: a) 1-óxido, C8-(guanin-8-il)-4-aminoquinolina 1-óxido b) 3-(N2-Guanil)-4-aminoquinolina y c) 3-(N6-adenil)-4-aminoquinolina 1-óxido comprendiendo 50%, 30% y 10% respectivamente (Fig 4).

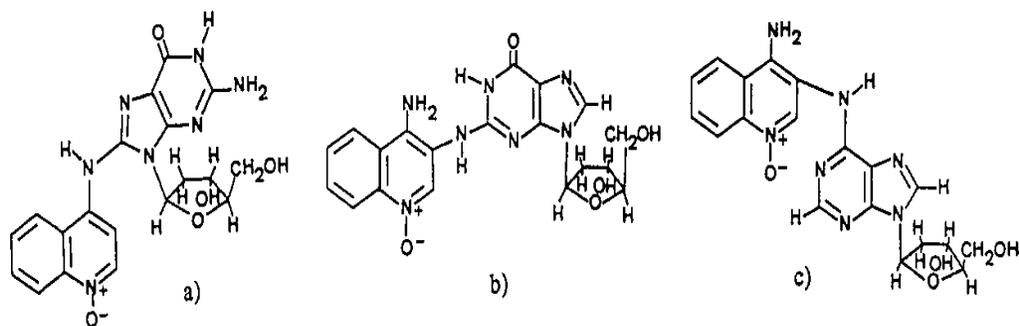


Figura 4. Estructura de los aductos de 4NQO. a) dGuo-C8-AQO; b) dGuo-N2-AQO; c) dAdo-N6-AQO (Tomado de Bailleu *et al.*, 1989).

El 4NQO es básicamente un mutágeno de sustitución de bases que actúa primordialmente (80 %) sobre los residuos de guanina, Fronza *et al.*, 1992 y Kohda *et al.* 1987 encontraron que una cantidad substancial de 8-hidroxidesoxiguanosina (8OHdG) se formaba en el DNA en células *Elrich* expuestas a 4NQO y en DNA de timo de ternera con 4HAQO *in vitro* en presencia de seril adenosina monofosfato (seril-AMP). El apareamiento de 8OHdG con adenina así como con citosina durante la replicación del DNA resulta en transversiones de G:C a A:T (Moriya, 1993). De hecho, las mutaciones de G:C a A:T son predominantes entre las encontradas en tumores inducidos con 4NQO (Ide *et al.*, 2001). Ya que el 8-OHdG puede ser generado por agentes producidos por radicales y oxígeno, Kohda *et al.* (1987) probaron el efecto de acarreadores de radicales en la formación de 8OHdG inducido por 4HAQO, pero no pudieron detectar ninguno. Entonces concluyeron que el 8OHdG producido por el 4HAQO puede ser atribuido a los aductos de 4HAQO-DNA pero no está mediado por especies reactivas de oxígeno.

El 4NQO también produce daño oxidativo y rompimientos simples de DNA (Bailleul *et al.*, 1989; Gebhart *et al.*, 1988; Baohong *et al.*, 2005), el 8-oxoguanina es una forma de daño oxidativo al DNA el cual es generado espontáneamente o inducido por varios agentes tales como algunos químicos (Matsui *et al.*,

1999;Tekeuchi y Morimoto, 1994), Radiación X (Kasai y Nishimura, 1991), radiación UV (Hattori *et al.*, 1996; Li, *et al.*, 2005; Mirzayans *et al.*, 1999; Nishigori *et al.*, 2003) con o sin fotosensores produciendo radicales hidroxil (Tekeuchi *et al.*, 1997) y oxígeno singulete (Boiteux *et al.*, 1992) y también es un agente recombinógeno (Heres-Pulido *et al.*, 2004).

Rebollar-Vega (2008), probó la interacción entre el brócoli de supermercado (BS) y el 4NQO (2.0 mM) con SMART en ala, encontrando que, para ambas cruas, se obtuvieron resultados débiles positivos para manchas pequeñas, al comparar el 4NQO (2.0 mM) solo contra cotratamientos con BS. Estos resultaron positivos para manchas pequeñas y grandes al compararlos con el testigo negativo. Concluye que en ambas cruas no se encontró disminución en la frecuencia de manchas por parte del BS en el cotratamiento 4NQO+BS.

Csala *et al.*, (1990) encontraron que al inhibir los CYP450s, en microsomas de hígado de roedor, disminuía la oxidación del ascorbato y que esto sugiere que la transferencia electrónica del ascorbato al oxígeno es un proceso enzimático mediado posiblemente por una isoenzima del CYP450s.

Por otro lado, Bahadorani *et al.* (2008), investigaron los efectos de las vitaminas A, E y C en el alargamiento de la vida de *Drosophila melanogaster* bajo diferentes condiciones de estrés oxidativo. Entre las vitaminas probadas la Vit. C mostró una fuerte actividad prooxidante bajo hiperoxia y acortó el tiempo de vida. Además incrementó los efectos tóxicos del hierro.

Arranz *et al.*, (2007) encontraron que la Vit. C puede interactuar con el sistema enzimático catalizador de la activación metabólica de la N-nitrosamina, bloqueando la producción de los intermediarios genotóxicos e induciendo Fase II (Anexo 1) del metabolismo xenobiótico. También reportan efecto protector de la Vit. C en contra de la N- Nitrosamina, proponiendo algún tipo de competencia por los CYP450s.

JUSTIFICACIÓN

La creciente conciencia pública de los beneficios de un estilo de vida saludable está acompañada por una explosión en el uso de nutraséutica más

que en la pasada década. En particular se ha dado énfasis al arsenal antioxidante, el cual es un área que ha sido ampliamente estudiada pero ambigua al menos con respecto a la Vit. C, ésta es esencial en muchas reacciones enzimáticas y también actúa como un acarreador de radicales libres. Aún así, el papel de ésta como protector contra el daño oxidativo al DNA es controversial (Halliwell 1996; Levine *et al.*, 1996; Podmore *et al.*, 1998; Poulsen *et al.*, 1998; Carr y Frei 1999; Premkumar y Bowlus 2004). Numerosos estudios han demostrado los efectos antioxidantes de la Vit. C (Green *et al.*, 1994; Duthie *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 1997; Noroozi *et al.*, 1998 ; Naidu 2003; Konopacka y Rzeszowska 2001 ; Chihuailaf *et al.* 2002; Konopacka *et al.*, 1998; Kaya, 2001; Kaya *et al.*, 2002; Krinsky 2001; Lutsenko *et al.*, 2002; Dusinska *et al.*, 2003; Costa y Nepomuceno, 2006). Por otro lado, estudios *in vivo* e *in vitro* frecuentemente muestran que la Vit. C actúa como prooxidante (Podmore *et al.*, 1998; Paolini *et al.*, 1999; Cai *et al.*, 2001; Bahadorani *et al.*, 2008).

1999;Tekeuchi y Morimoto, 1994), Radiación X (Kasai y Nishimura, 1991), radiación UV (Hattori *et al.*, 1996; Li, *et al.*, 2005; Mirzayans *et al.*, 1999; Nishigori *et al.*, 2003) con o sin fotosensores produciendo radicales hidroxil (Tekeuchi *et al.*, 1997) y oxígeno singulete (Boiteux *et al.*, 1992) y también es un agente recombinógeno (Heres-Pulido *et al.*, 2004).

ANTECEDENTES

Se ha investigado el efecto antimutagénico de la Vit. C usando el ensayo de mutación y recombinación somáticas en alas de *Drosophila melanogaster* (SMART, por sus siglas en inglés, Anexo 3). Kaya *et al.*(2001) trataron larvas transheterocigotas de tercer estadio con tres diferentes agentes alquilantes (Metil Metano Sulfonato, Etil Metano Sulfonato y Etil Nitrosourea). Los tres mutágenos fueron claramente genotóxicos. La Vit. C (17 mM) no incrementó la frecuencia de clones mutantes. Cuando se probaron los mutágenos con la Vit. C, esta última fue efectiva al reducir la genotoxicidad de los tres mutágenos directos, por lo que se concluye que hay un efecto protector por parte de la Vit. C.

Costa y Nepomuceno (2006), probaron una mezcla de vitaminas (C, E y beta caroteno) y minerales (cobre, selenio y zinc), sobre la genotoxicidad del doxorubicin (DXR), que es un agente generador de radicales libres, en las cruza estándar (CE) y de bioactivación elevada (CBE) de SMART. Las dosis de 12.5, 25 y 50 mg/ml de la mezcla vitamínica/mineral (MV) por sí mismas no fueron genotóxicas en ninguna de las cruza, mientras que ésta produjo una reducción significativa de la genotoxicidad del DXR (0.125 mg/ml), en ambas cruza. El efecto protector fue observado cuando las larvas recibieron pre- o cotratamientos de la MV. Los resultados indican que, bajo las condiciones de

estos experimentos, la mezcla MV no fue genotóxica; sin embargo protege contra los efectos genotóxicos del DXR.

Se ha demostrado el efecto genotóxico del 4NQO en SMART en ojo (Gaivão *et al.*, 1999) y en ala de *Drosophila melanogaster* (Graf *et al.*, 1989; Hayatsu *et al.*, 1992; Negishi *et al.*, 1994; Batiste-Alentorn *et al.*, 1995 y Kaya *et al.*, 2002). Heres-Pulido *et al.*, (2004), reportaron que en la CE el 4NQO (2.5 y 5.0 mM) tuvo efecto mutagénico y recombinogénico. Para la CBE se encontró mayor efecto mutagénico pero no recombinogénico.

Existen varios ensayos realizados con SMART en ala de *Drosophila melanogaster* referentes a la interacción del 4NQO con diferentes agentes a los que se les atribuye efecto antimutagénico. Kaya *et al.*, 2002 investigaron la capacidad de la Vit. C para modular la acción genotóxica del 4NQO (3.0 mM) en CE y CBE de dicho ensayo. Los resultados obtenidos muestran que el mutágeno fue claramente genotóxico y ninguna de las concentraciones de Vit. C probadas (25, 75 y 250 mM) indujo aumento significativo en la frecuencia de clones mutantes. Al probar la Vit. C con el 4NQO no se mostró efecto antigenotóxico con respecto a la genotoxicidad del 4NQO.

Gómez-Luna (2008), probó la interacción entre el brócoli cultivado orgánicamente (BCO) y el 4NQO (2.0 mM) encontrando efecto sinérgico entre éstos ya que en la CE, a mayor concentración de BOC se presentaba mayor cantidad de manchas pequeñas, lo cual se reflejaba en manchas totales. En la CBE, a mayor concentración de BOC disminuyó la frecuencia de manchas en general, sobre todo las pequeñas, lo cual atribuyó a que probablemente, por los niveles altos de CYP450s, se presentó mayor daño y se indujo apoptosis.

Rebollar-Vega (2008), probó la interacción entre el brócoli de supermercado (BS) y el 4NQO (2.0 mM) con SMART en ala, encontrando que, para ambas cruzas, se obtuvieron resultados débiles positivos para manchas pequeñas, al comparar el 4NQO (2.0 mM) solo contra cotratamientos con BS. Estos resultaron positivos para manchas pequeñas y grandes al compararlos con el testigo negativo. Concluye que en ambas cruzas no se encontró disminución en la frecuencia de manchas por parte del BS en el cotratamiento 4NQO+BS.

Csala *et al.*, (1990) encontraron que al inhibir los CYP450s, en microsomas de hígado de roedor, disminuía la oxidación del ascorbato y que esto sugiere que la transferencia electrónica del ascorbato al oxígeno es un proceso enzimático mediado posiblemente por una isoenzima del CYP450s.

Por otro lado, Bahadorani *et al.* (2008), investigaron los efectos de las vitaminas A, E y C en el alargamiento de la vida de *Drosophila melanogaster* bajo diferentes condiciones de estrés oxidativo. Entre las vitaminas probadas la Vit. C mostró una fuerte actividad prooxidante bajo hiperoxia y acortó el tiempo de vida. Además incrementó los efectos tóxicos del hierro.

Arranz *et al.*, (2007) encontraron que la Vit. C puede interactuar con el sistema enzimático catalizador de la activación metabólica de la N-nitrosamina, bloqueando la producción de los intermediarios genotóxicos e induciendo *Fase II (Anexo 1)* del metabolismo xenobiótico. También reportan efecto protector de la Vit. C en contra de la N- Nitrosamina, proponiendo algún tipo de competencia por los CYP450s.

JUSTIFICACIÓN

La creciente conciencia pública de los beneficios de un estilo de vida saludable está acompañada por una explosión en el uso de nutraséutica más

OBJETIVO

Determinar el efecto de la interacción 4NQO, Vit. C, y FeSO₄ en las Cruzas E y BE en SMART en ala de *Drosophila melanogaster*.

OBJETIVO PARTICULAR

Determinar, a partir de las diferencias entre las cruzas E y BE, si los CYP450s influyen en la modulación del daño producido por el 4NQO en cotratamiento con Vit. C, y FeSO₄.

Aportar evidencias sobre la reacción Fenton en un bioensayo *in vivo*

Discutir los resultados obtenidos en este trabajo con los resultados obtenidos en el Laboratorio de Genética Toxicológica (LGT) FESI UNAM y por otros investigadores que han probado 4NQO en SMART en ala.

HIPÓTESIS

1. Ya que existe polémica con respecto a la dualidad de la Vit. C referente a su actividad antioxidante o prooxidante en ausencia o presencia de metales de transición, entonces:

Para ambas cruzas:

a) En el testigo Vit. C se espera encontrar una disminución en la tasa de mutación basal o al menos no encontrar diferencias significativas con respecto al solvente

b) Se espera encontrar efecto genotóxico en el testigo Vit. C/ FeSO₄.

2. Debido a la acción promutágena del 4NQO y a su carácter prooxidante, se espera encontrar:

- a) Diferencias entre las cruas con respecto al 4NQO y sus cotratamientos debido a las diferencias en los niveles de CYP450s.
- b) Incremento en el daño producido por el 4NQO en los cotratamientos 4NQO/FeSO₄ y 4NQO/Vit. C /FeSO₄.
- c) Modulación del efecto genotóxico por parte de la Vit. C en los cotratamientos 4NQO/Vit. C y 4NQO/ Vit. C/ FeSO₄.

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

Tratamientos o Cotratamientos	4NQO (2mM)	Vit. C (5.6 mM)	FeSO ₄ (0.2 mM)	TW-OH 80 5% - 5%
Testigo TW-OH	-	-	-	+
Testigo 4NQO	+	-	-	+
Testigo Vit. C	-	+	-	+
Testigo FeSO ₄	-	-	+	+
Cotrat. 4NQO/Vit.C	+	+	-	+
Cotrat. 4NQO/FeSO ₄	+	-	+	+
Cotrat. Vit. C/FeSO ₄	-	+	+	+
Cotrat. 4NQO/Vit.C/FeSO ₄	+	+	+	+

Donde: TW-OH 80 1:1 5% = mezcla 1:1 de 5% Tween-80 (CAS No. 9005-56-6) de Sigma-Aldrich y etanol 5% de Merck.

Las líneas *flare* (*flr³/TM3, Bd^S*), *Oregon-flare* (*ORR(1);ORR(2);flr³/TM3, Bd^S*) y *mwh* (*mwh/ mwh*) (Anexo III) de *Drosophila melanogaster* (Anexo 2) fueron propagadas a 25° C con 60% de humedad en frascos lecheros estériles de 250

- a) Diferencias entre las cruas con respecto al 4NQO y sus cotratamientos debido a las diferencias en los niveles de CYP450s.
- b) Incremento en el daño producido por el 4NQO en los cotratamientos 4NQO/FeSO₄ y 4NQO/Vit. C /FeSO₄.
- c) Modulación del efecto genotóxico por parte de la Vit. C en los cotratamientos 4NQO/Vit. C y 4NQO/ Vit. C/ FeSO₄.

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

Tratamientos o Cotratamientos	4NQO (2mM)	Vit. C (5.6 mM)	FeSO ₄ (0.2 mM)	TW-OH 80 5% - 5%
Testigo TW-OH	-	-	-	+
Testigo 4NQO	+	-	-	+
Testigo Vit. C	-	+	-	+
Testigo FeSO ₄	-	-	+	+
Cotrat. 4NQO/Vit.C	+	+	-	+
Cotrat. 4NQO/FeSO ₄	+	-	+	+
Cotrat. Vit. C/FeSO ₄	-	+	+	+
Cotrat. 4NQO/Vit.C/FeSO ₄	+	+	+	+

Donde: TW-OH 80 1:1 5% = mezcla 1:1 de 5% Tween-80 (CAS No. 9005-56-6) de Sigma-Aldrich y etanol 5% de Merck.

Las líneas *flare* (*flr³/TM3, Bd^S*), *Oregon-flare* (*ORR(1);ORR(2);flr³/TM3, Bd^S*) y *mwh* (*mwh/ mwh*) (Anexo III) de *Drosophila melanogaster* (Anexo 2) fueron propagadas a 25° C con 60% de humedad en frascos lecheros estériles de 250

ml con 5 g de hojuelas de hojuelas de papa deshidratada y 20 ml de solución conservadora.

Para la CEstándar (CE) se utilizaron hembras vírgenes de la línea *flare* y machos *mwh*. Para la cruce de bioactivación elevada (CBE), se utilizaron hembras vírgenes de la línea Oregon-*flare* y machos *mwh* (Anexo 2).

La colecta de huevos se realizó en frascos lecheros con levadura fresca activada, durante 8 horas en oscuridad a 25° C y 60% de humedad.

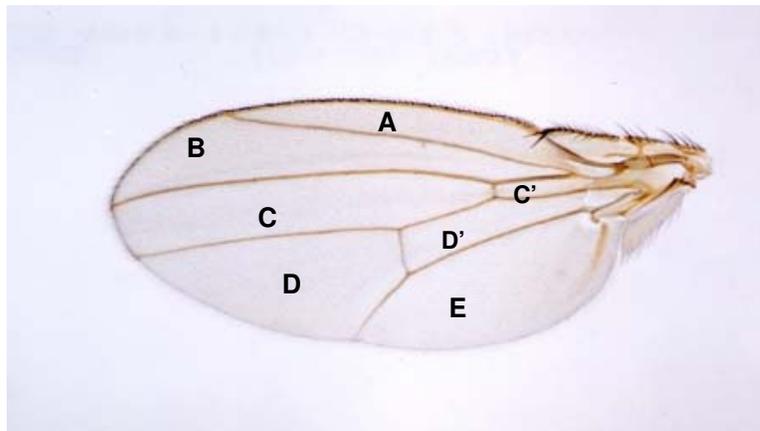
Las larvas de tercer estadio (72 ± 4 hrs.) se recuperaron tres días después de la colecta de huevos vertiendo el contenido de los frascos diluyendo con agua a 25°C en un colador de metal de malla fina, hasta dejar limpias las larvas. Éstas se expusieron a tratamientos crónicos (48 hrs) con 2.0 mM de 4NQO (CAS No. 56-57-5, 97% de pureza), 5.6 mM de Vit. C (CAS No. 50-81-7, 99% de pureza), 0.2 mM de FeSO₄ (CAS No. 15244-10-7) obtenidos de Sigma-Aldrich. Y los co-tratamientos Vit.C/ FeSO₄, 4NQO/ FeSO₄, 4NQO / Vit.C, y 4NQO/Vit.C/FeSO₄. Como testigo negativo se utilizó TW-OH [mezcla 1:1 de 5% Tween-80 (CAS No. 9005-56-6) de Sigma-Aldrich y etanol 5% de Merck].

Todos los tratamientos se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes y se usaron 2 ml de solución de ellos para hidratar 0.5 g de medio instantáneo para *Drosophila melanogaster* (DIM) (Carolina Biological supply Co., Burlington N C, USA).

Se recuperaron los adultos de ambas cruces y se conservaron en viales con alcohol al 70%, posteriormente se seleccionaron 55-60 individuos (procurando tener la misma cantidad de hembras que de machos) con alas de fenotipo silvestre (transheterocigotos). Se disectaron las alas y se realizaron

preparaciones permanentes, con solución de Fauré, las que fueron etiquetadas bajo estricto control, para evitar prejuicio en la revisión. Se analizaron con microscopio óptico 40X para contabilizar los clones o manchas de células mutantes producidas por la pérdida de heterocigosis (Anexo 2). El registro de éstas se realizó de acuerdo a la sección del ala en que se encontraban (A, B, C, C', D, D' y E) (Fig. 4) de los genes marcadores (*flr³* y *mwh*).

Figura 4: Ala de *Drosophila melanogaster*, donde se observa la división por áreas dadas por la venación



natural. (Tomada del banco fotográfico del Laboratorio de Genética Toxicológica)

Todos los datos obtenidos se procesaron con el programa estadístico SMART para PC de Frei y Würigler (1988), que se basa en la prueba estadística X^2 para proporciones. Este análisis permite decidir si la frecuencia de manchas inducidas en los tratamientos tiene un diagnóstico positivo, débil positivo, negativo o indeciso con base en las siguientes hipótesis:

- Hipótesis nula (H_0): Indica que la frecuencia de mutaciones inducidas y espontáneas no es significativamente mayor a la frecuencia del testigo negativo.
- Hipótesis alternativa (H_a): Señala que la frecuencia de las manchas inducidas sea **m** veces mayor que la frecuencia del testigo negativo (Graf *et. al.*, 1984), donde **m**, es el factor de multiplicación utilizado para realizar este análisis estadístico, indicando cuántas veces debe incrementarse el número de

eventos de los tratamientos con respecto al testigo para considerar una respuesta positiva.

Las manchas pequeñas (1-2 células) son más comunes, por lo que predominan en relación con la frecuencia de manchas grandes (>3 células) y las manchas gemelas, por lo que deben analizarse por separado para evitar una sobreestimación de la inducción de las manchas menos comunes. De esta manera, para considerar un incremento significativo en la frecuencia de manchas pequeñas y totales (se obtiene de la suma de todas las manchas, por lo que la contribución de las manchas pequeñas es predominante) se utiliza $m=2$, mientras que para las manchas grandes y gemelas $m=5$. Por ende son posibles las siguientes cuatro decisiones (Frei y Würigler, 1988):

1. Aceptar H_0 y rechazar H_a : **negativo**
2. Rechazar H_0 y aceptar H_a : **positivo**
3. Rechazar H_0 y rechazar H_a : **débil positivo**
4. Aceptar H_0 y aceptar H_a : **indeciso**

De acuerdo con estos autores para obtener un diagnóstico significativo deben registrarse un mínimo de 55-60 individuos (110-120 alas por tratamiento por experimento). Los resultados débiles positivos e indecisos fueron analizados con la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney STAT graphics versión 6.0 (Frei y Würigler, 1995).

RESULTADOS

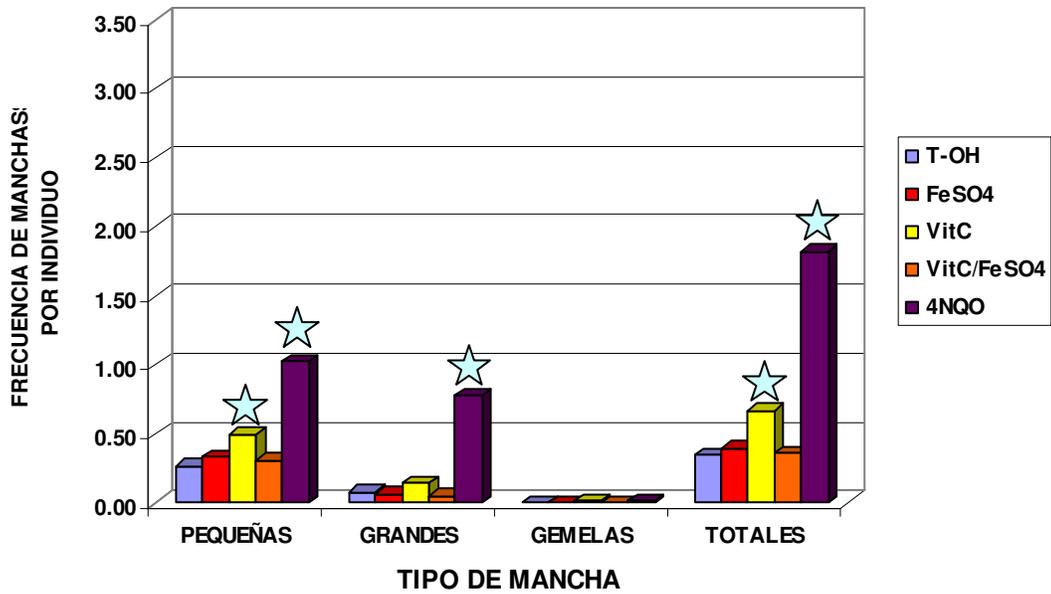
Los tratamientos y cotratamientos, fueron probados en ambas cruzas de manera simultánea en tres ensayos independientes y de acuerdo con Frei y Würgler (1995) se revisaron 55-60 individuos por tratamiento.

En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos después de analizar las alas con fenotipo silvestre de *D. melanogaster* CE y CBE de SMART, después de alimentar de manera crónica a larvas de 72 ± 4 hr, con 4NQO (2.0 mM), Vit. C (5.6 mM), FeSO₄ (0.2 mM) y sus interacciones todos disueltos en TW-OH 5%-5%.

Las frecuencias de los diferentes tipos de manchas por individuo obtenidas para el testigo negativo TW-OH, se encontraron ligeramente bajas para la CE y dentro del rango obtenido en experimentos previos para la CBE.

CEstándar: Con respecto a los tratamientos testigos el diagnóstico de la Vit. C fue inesperadamente positivo (+) para manchas pequeñas, en particular las de una sola célula (Gráficas 1 y 2). Con respecto al hierro, solo y en combinación con Vit. C, el diagnóstico fue negativo y en el caso del 4NQO se muestra un diagnóstico positivo esperado para manchas pequeñas y grandes. Para manchas gemelas ninguno de los tratamientos fue positivo (Gráfica 1 y Tabla 2 A).

TESTIGOS DE ESTÁNDAR



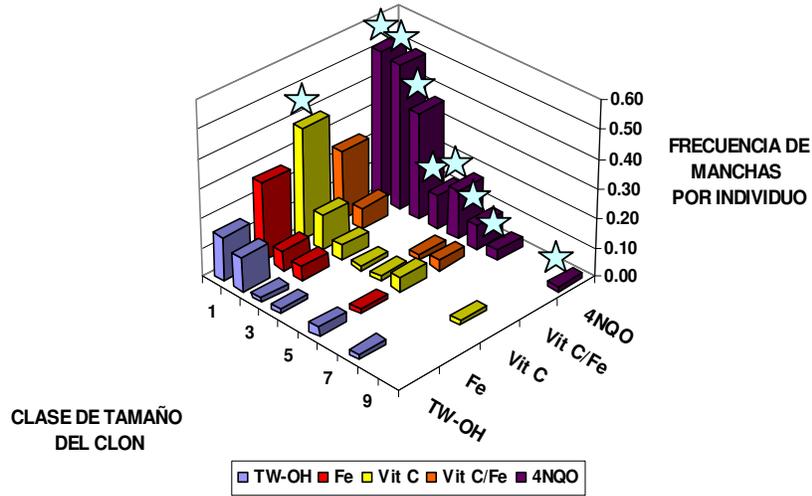
Gráfica 1. Frecuencias de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales, por individuo después de alimentar larvas de la CEstándar en tratamientos crónicos con TW-OH (5%-5%), FeSO₄ (0.2 mM), Vit. C (5.6 mM), Vit. C/ FeSO₄ y 4NQO (2.0 mM) se observan diagnósticos positivos para Vit. C, manchas pequeñas, y para manchas pequeñas y grandes en 4NQO (2.0 mM) con respecto al testigo TW_OH. Donde: ☆ indica una diferencia estadísticamente significativa con una $P \leq 0.05$.

Tabla 2. Resumen de resultados obtenidos después de analizar las alas con fenotipo silvestre de *D. melanogaster* CE y CBE de SMART para alas, después de alimentar de manera crónica a larvas de 72 ± 4 hr, con 4NQO (2.0 mM), Vit. C (5.6 mM), FeSO₄ (0.2 mM) todos disueltos en TW-OH 5%-5% y sus interacciones.

Tratamiento (Concentración)	Número de individuos	Manchas por individuo (número de manchas) diagnóstico estadístico*										clones mwh	
		Manchas pequeñas (1-2 células) m=2		Manchas grandes (> 2 células) m=5		Manchas gemelas m=5		Manchas totales m=2					
Cruza Estándar (CE)													
A. Testigos													
TW-OH (5%-5%)	60	0.27	(16)		0.08	(5)		0.0	(0)		0.35	(21)	20
FeSO ₄ (0.2 mM)	60	0.33	(20)	i/ ns	0.07	(4)	-	0.0	(0)		0.40	(24)	- 24
Vit. C (5.6 mM)	60	0.50	(30)	+	0.15	(9)	i/ ns	0.02	(1)	i/ ns	0.67	(40)	+ 40
FeSO ₄ / Vit. C	55	0.32	(17)	i/ ns	0.05	(3)	-	0.0	(0)		0.36	(20)	- 20
4NQO (2.0 mM)	60	1.02	(61)	+	0.78	(47)	+	0.02	(1)	i/ ns	1.82	(109)	+ 109
B. Cotratamientos													
4NQO (2.0 mM)	60	1.02	(61)		0.78	(47)		0.02	(1)		1.82	(109)	109
4NQO/ FeSO ₄	60	2.18	(131)	+	2.37	(142)	+	0.03	(2)	i/ ns	4.58	(275)	+ 274
4NQO/ Vit. C	60	1.77	(106)	+	1.60	(96)	+	0.0	(0)	i ns	3.37	(202)	+ 202
4NQO/ Vit. C /FeSO ₄	60	2.66	(154)	+	2.98	(173)	+	0.03	(2)	i ns	5.67	(329)	+ 320
Cruza de Bioactivación Elevada (CBE)													
C. Testigos													
TW-OH (5%-5%)	60	0.40	(24)		0.08	(5)		0.0	(0)		0.48	(29)	29
FeSO ₄ (0.2 mM)	60	0.32	(19)	-	0.10	(6)	-	0.0	(0)		0.42	(25)	- 25
Vit. C (5.6 mM)	60	0.48	(29)	-	0.05	(3)	-	0.0	(0)		0.53	(32)	- 31
FeSO ₄ / Vit. C	60	0.33	(20)	-	0.10	(6)	-	0.0	(0)		0.43	(26)	- 26
4NQO (2.0 mM)	59	1.24	(73)	+	1.32	(78)	+	0.0	(0)		2.56	(151)	- 150
D. Cotratamientos													
4NQO (2.0 mM)	59	1.24	(73)		1.32	(78)		0.0	(0)		2.56	(151)	150
4NQO/ FeSO ₄	60	1.28	(77)	-	1.90	(114)	w ns	0.03	(2)	i/ ns	3.22	(193)	- 192
4NQO/ Vit. C	59	1.10	(65)	-	1.07	(63)	-	0.02	(1)	i/ ns	2.19	(129)	- 128
4NQO/ Vit. C /FeSO ₄	60	1.12	(67)	-	1.42	(85)	-	0.0	(0)	i/ ns	2.53	(152)	- 152

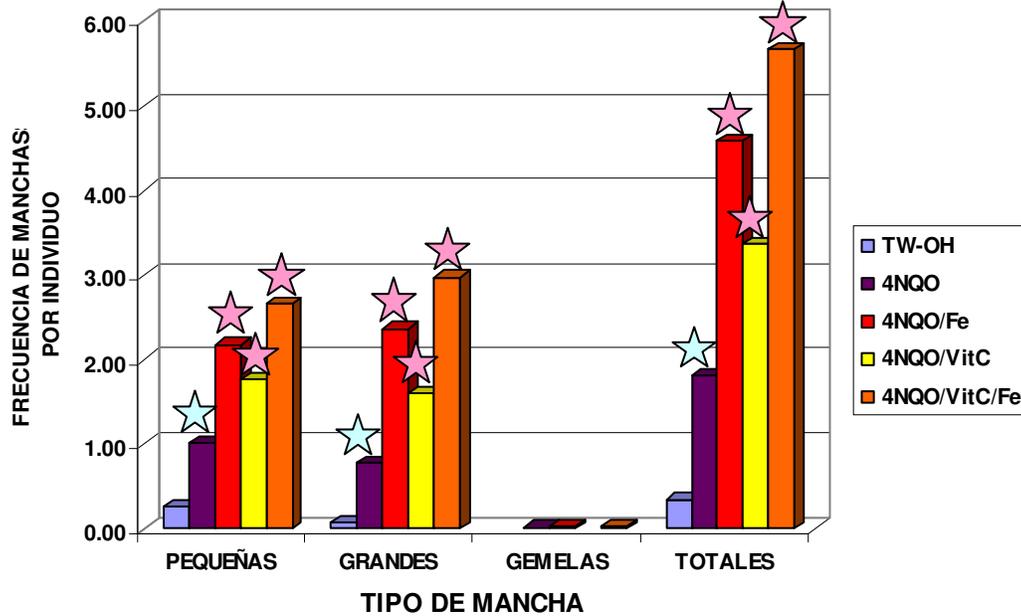
*Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988, 1995) comparados con su testigo correspondiente: -, negativo;+, positivo; w, débil positivo; i, indeciso; ns, no significativo (P<0.05); m, factor de multiplicación de riesgo mínimo para asignar un resultado positivo.

TESTIGOS DE ESTÁNDAR



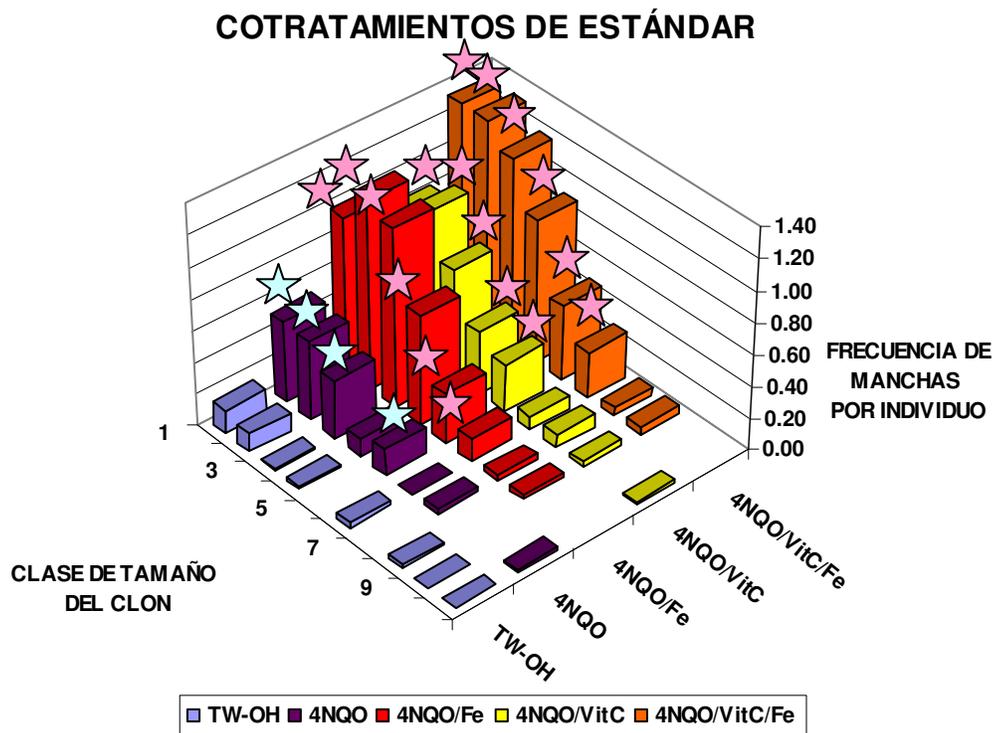
Gráfica 2. Distribución del tamaño del clon por individuo después de alimentar larvas de la CE en tratamientos crónicos con TW-OH, Vit. C, FeSO₄ (Fe), VitC/ FeSO₄ y 4NQO. Se observa el efecto genotóxico directo del 4NQO (manchas de más de 3 células) y el indirecto (manchas pequeñas). Se observa también que la Vit. C presentó efecto genotóxico al final de la división celular, ya que la clase del tamaño del clon estadísticamente significativa es la de una célula (☆).

COTRATAMIENTOS DE ESTÁNDAR



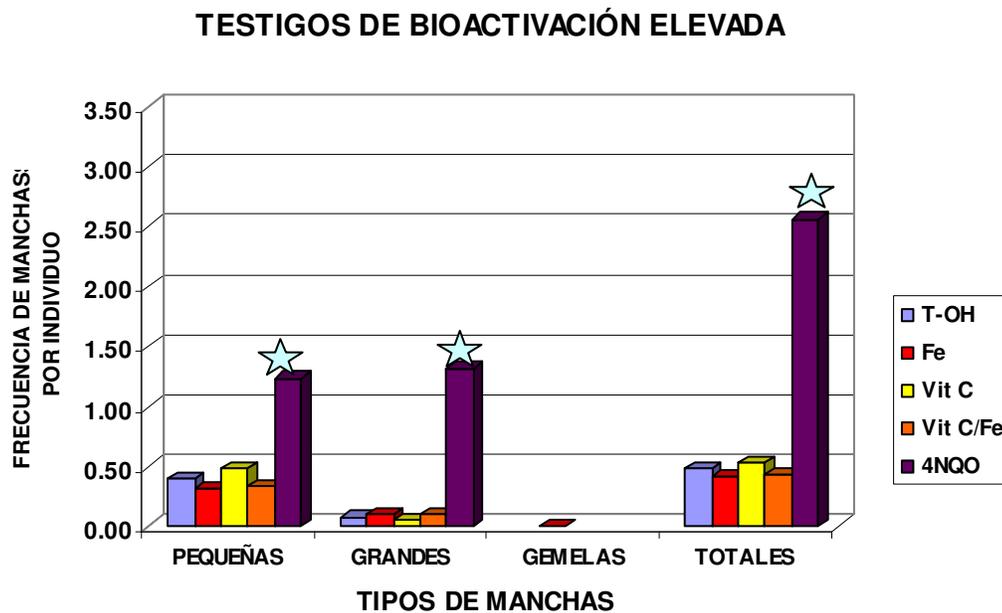
Gráfica 3. Se puede observar claramente el incremento en la frecuencia de manchas pequeñas y grandes por individuo en los diferentes cotratamientos con respecto a los testigos negativo (TW-OH) y positivo (4NQO).

En la tabla 2B y gráfica 3 se puede observar que todos los cotratamientos tuvieron diagnóstico positivo para manchas pequeñas, grandes y totales con respecto al testigo 4NQO. Se encontró la siguiente jerarquía de genotoxicidad, siendo $4NQO < 4NQO/ Vit. C < 4NQO/ FeSO_4 < 4NQO/ Vit. C/ FeSO_4$ para todos los tipos de manchas, excepto gemelas que, cabe destacar, en todos los casos se presentaron con frecuencias muy bajas. La Vit. C resultó genotóxica cuando fue administrada sola y el hierro, solo y en combinación con Vit. C, resultó aparentemente inocuo. En los cotratamientos la Vit. C fue menos genotóxica que el hierro solo y en combinación con la Vit. C.



Gráfica 4. Distribución del tamaño del clon por individuo después de alimentar larvas de la CE en cotratamientos crónicos con TW-OH, 4NQO, 4NQO/ Vit. C, 4NQO/ FeSO₄ (Fe), 4NQO/ VitC/ FeSO₄. Se puede observar que se incrementó en la frecuencia de manchas grandes, por el efecto directo del 4NQO y de manchas pequeñas provocado por los metabolitos generados del 4NQO.

En la gráfica 4 se puede observar que se incrementó el daño al inicio (manchas grandes) provocado por el efecto directo (Li *et al.*, 2005) del 4NQO (estrés oxidativo) y al final de la división celular (manchas pequeñas) provocado por los metabolitos generados del 4NQO.

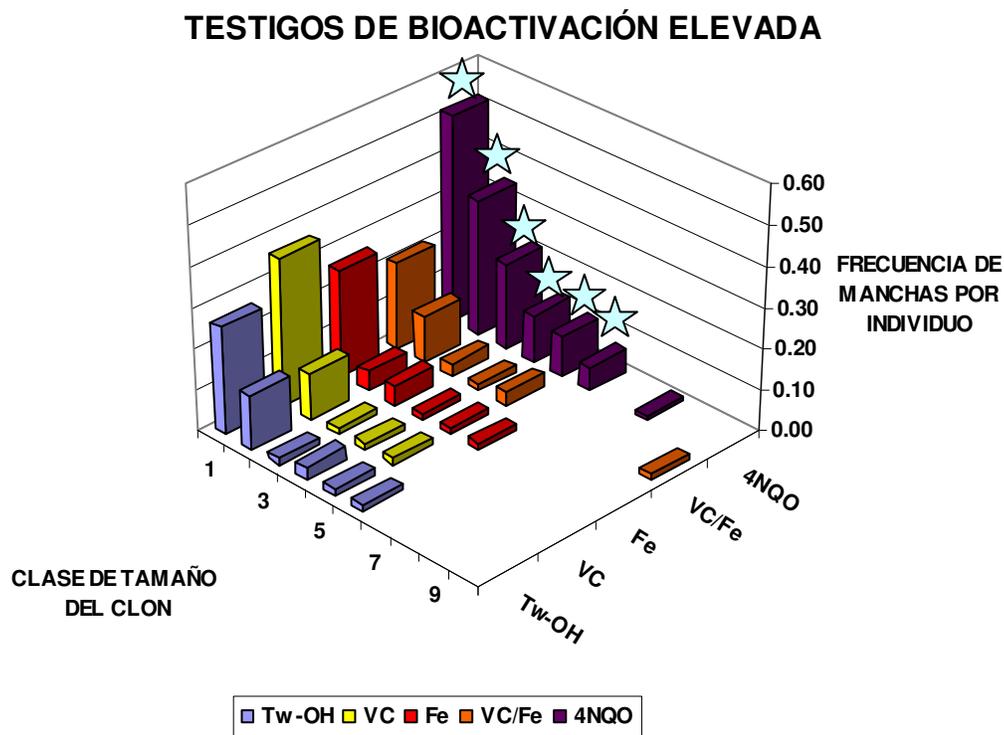


Gráfica 5. Frecuencias de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales, por individuo después de alimentar larvas de la cruda bioactivación elevada en tratamientos crónicos con TW-OH (5%-5%), 4NQO (2.0 mM), Vit. C (5.6 mM), FeSO₄ (0.2 mM) y Vit. C/ FeSO₄ se observan diagnósticos negativos para todos los testigos para manchas pequeñas, grandes y totales excepto en 4NQO (2.0 mM) que muestra diagnóstico positivo, todos con respecto al testigo TW-OH. Donde: ☆ Estadísticamente significativo con una $P \leq 0.05$.

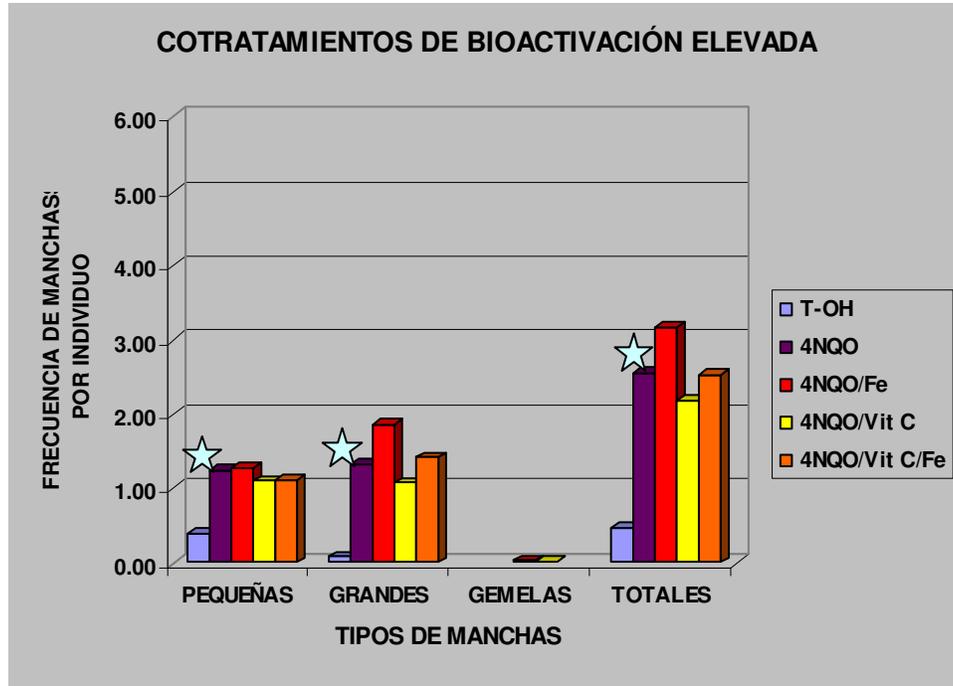
Cruza de Bioactivación Elevada. En la tabla 2 C y Gráficas 5 y 6 se puede observar que los tratamientos con FeSO₄, Vit. C y Vit. C/ FeSO₄ mostró un diagnóstico negativo para todos los tipos de manchas. El 4NQO indujo manchas pequeñas, grandes y totales, como se esperaba.

En la Tabla 2D se puede observar que ninguno de los cotratamientos obtuvo un diagnóstico positivo contra el 4NQO para ninguno de los tipos de manchas (Gráfica 7), sin embargo existen diferencias significativas en las distribuciones del tamaño del clon de los cotratamientos con respecto al 4NQO (Gráfica 8 y Tabla 3).

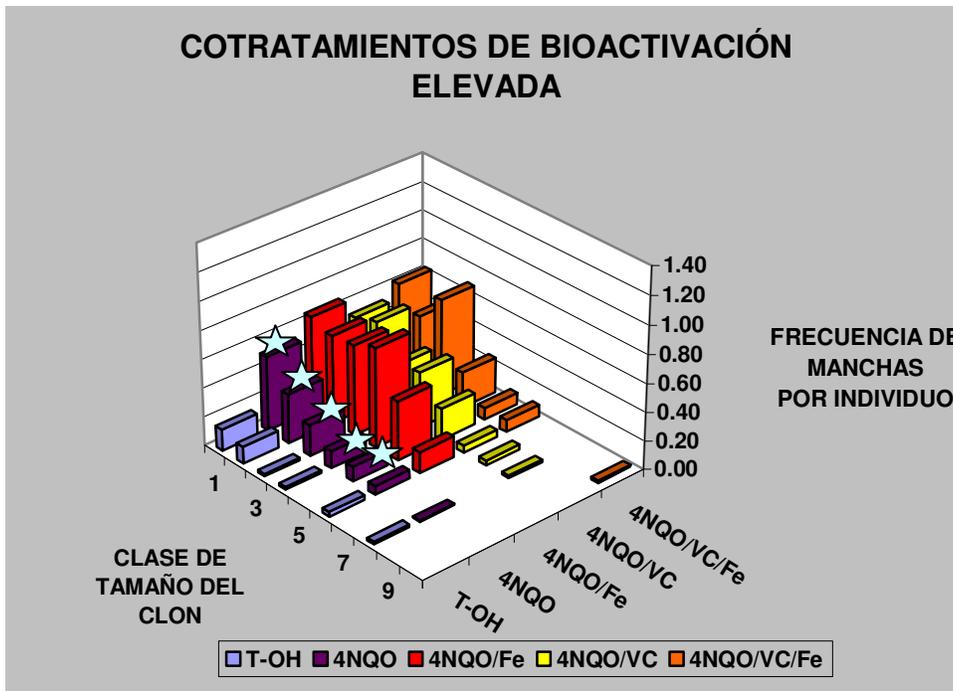
Debe tomarse en cuenta que el testigo positivo 4NQO en general resultó más genotóxico en la CBE que en la CE, con frecuencias de manchas totales 2.56 y 1.82 respectivamente, sin embargo los cotratamientos resultaron aparentemente menos genotóxicos en la CBE que en la CE (Tabla 2 B y D).



Gráfica 6. Distribución del tamaño del clon por individuo después de alimentar larvas de la cruz BE en tratamientos crónicos con TW-OH, Vit. C, FeSO₄ (Fe), VitC/ FeSO₄ y 4NQO. Se observa el efecto genotóxico directo del 4NQO (manchas de más de 3 células) y el indirecto (manchas pequeñas) (☆.)



Gráfica 7: Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo para la CBE para el testigo negativo TW-OH 5%-5%, el testigo positivo 4NQO (2mM) y para los cotratamientos 4NQO/ Vit. C, 4NQO/ FeSO₄, 4NQO/ Vit. C/ FeSO₄. Se observa que con respecto al testigo negativo los cotratamientos son genotóxicos, pero no existen diferencias significativas con respecto al testigo positivo.



Gráfica 8. Distribución del tamaño del clon por individuo después de alimentar larvas de la cruz BE en cotratamientos crónicos con TW-OH, 4NQO, 4NQO/ Vit. C, 4NQO/ FeSO₄ (Fe), 4NQO/ VitC/ FeSO₄. Se puede observar que no hay incremento en la frecuencia de manchas, por los efectos directo (oxidativo) e indirecto (provocado por los metabolitos) generados del 4NQO.

Tabla 3 Análisis con χ^2 para la distribución del tamaño de clones de los cotratamientos con respecto a la del 4NQO en la CBE en los que se observan diferencias significativas (s) en las distribuciones (P= 0.05).

OBSERVADOS	ESPERADOS		Jl	Grds -1		
4NQO/VitC	4NQO 2.0	(Fo-Fe)	(Fo-Fe) ²	(Fo-Fe) ² /Fe	7-1=6	Val Tab
31	48.80	-17.80	316.84	6.49	12.59	Ji ²
34	32.00	2.00	4.00	0.13	27.56	
21	20.00	1.00	1.00	0.05		
23	11.20	11.80	139.24	12.43		
13	9.60	3.40	11.56	1.20		
3	5.60	-2.60	6.76	1.21		
3	0.80	2.20	4.84	6.05		
128				27.56	s	

OBSERVADOS	ESPERADOS		Jl	Grds -1		
4NQO/Fe	4NQO 2.0	(Fo-Fe)	(Fo-Fe) ²	(Fo-Fe) ² /Fe	7-1=6	Val Tab
40	72.82	-32.82	1,077.07	14.79	12.59	Ji ²
37	47.75	-10.75	115.56	2.42	66.90	
38	29.84	8.16	66.52	2.23		
42	16.71	25.29	639.46	38.26		
25	14.33	10.68	113.96	7.96		
9	8.36	0.64	0.41	0.05		
0	1.19	-1.19	1.43	1.19		
191				66.90	s	

OBSERVADOS	ESPERADOS		Jl	Grds -1		
4NQO/VitC/Fe	4NQO 2.0	(Fo-Fe)	(Fo-Fe) ²	(Fo-Fe) ² /Fe	7-1=6	Val Tab
38	57.19	-19.19	368.16	6.44	12.59	Ji ²
29	37.50	-8.50	72.25	1.93	51.11	
41	23.44	17.56	308.44	13.16		
16	13.13	2.88	8.27	0.63		
15	11.25	3.75	14.06	1.25		
5	6.56	-1.56	2.44	0.37		
6	0.94	5.06	25.63	27.34		
150				51.11	s	

DISCUSIÓN

La Vit. C presentó un efecto controversial en el presente estudio, ya que, en la CE, al ser administrada sola (testigo Vit. C) en el análisis estadístico se obtuvo un diagnóstico positivo para manchas pequeñas, no así en la CBE. Esto podría deberse a que la Vit. C puede autooxidarse hasta DHA por el $O_2^{\cdot-}$ en presencia de H^+ y genera H_2O_2 y radical ascorbil¹, siendo estas últimas moléculas reactivas (Chrastil y Wilson, 1978; Rosen *et al.*, 1999 y Griffiths y Lunec, 2001). El radical ascorbil en sobrecarga puede provocar la formación de bases oxidadas como la 8-oxoadenosina (8-oxoA) dando como resultado mutaciones al DNA (Lutsenko *et al.*, 2002). Por otro lado esta oxidación puede ser promovida por los CYP450s (Csala *et al.*, 1999). A partir de todo esto es probable que la generación del radical ascorbil y H_2O_2 tuviera un efecto adverso en la CE en contra del protector esperado (Kaya, 2001; Costa y Nepomuceno, 2006 y Arranz *et al.*, 2007). Ahora bien, la aparente ausencia de daño observado en CBE puede ser explicada por dos vías: i) Los niveles altos constitutivos de CYP450s pudieron haber promovido la oxidación enzimática de la Vit. C generando así más daño el cual promovería la apoptosis ó ii) La Vit. C pudo inducir Fase II del metabolismo xenobiótico y desintoxicar el medio (Arranz *et al.*, 2007). Esta dualidad en el efecto de la Vit. C podría deberse a que altas concentraciones de ésta podrían inducir las dos vías anteriores y bajas concentraciones de la misma podrían tener preferencia por alguna de las dos vías (Bahadorani *et al.*, 2008). También debe tomarse en cuenta que éste ha sido un estudio *in vivo*, con *Drosophila melanogaster*, y por esta razón puede haber discrepancias con otros autores que han trabajado *in vitro* o con otros modelos.

¹ Presenta un oxígeno con una carga extra y otro con un electrón libre.

En función de lo anteriormente expuesto, se esperaba que al menos en la CE el testigo Vit. C/ FeSO₄ presentara mayor proporción de manchas que el testigo Vit. C (Reacción Fenton) pero esto no ocurrió en ninguna de las cruas. Mas allá de pensar en que esta mezcla no tuvo efecto, se podría asumir un efecto apoptótico ya que la Vit. C tiene actividad prooxidante en presencia de hierro, actúa como agente reductor promotor de reacción Fenton *in vivo* (Imlay *et al.*, 1988), a altas concentraciones acarrea radicales y peróxidos lipídicos induciendo apoptosis (Sakagami *et al.*, 2000). Este mecanismo de acción parece reflejar un proceso de señalización y actúa como un activador de la cascada de caspasas (Podmore *et al.*, 1998; Rehman *et al.*, 1998). Es importante aclarar que en la CE, aunque se llegó al tamaño óptimo de la muestra (Frei y Würzler 1995), la mortalidad fue alta con respecto a otros tratamientos, entonces se cree que el daño oxidativo fue mucho mayor, resultando tóxico, y las moscas sobrevivientes resultaron ser las resistentes (Gaivão *et al.*, 1999).

Las células tienen varios mecanismos desarrollados para reducir la sobrecarga de hierro tales como una alta regulación del transporte de hierro trans-membranal, quelantes intracelulares y enzimas que destruyen las especies reactivas de oxígeno, pero un desbalance en estos sistemas podría llevar a mutaciones (Fenech y Ferguson, 1995). Además el Fe⁺² por sí solo podría causar reacciones Fenton con el H₂O₂ intracelular libre lo cual llevaría a la generación de radicales ·OH responsables del daño oxidativo por su alta reactividad. En este estudio no encontramos diferencias significativas entre el testigo negativo y el testigo Fe⁺² en ninguna de las cruas esto podría referirnos a que el tratamiento fue inocuo o a la probable inducción de apoptosis por reparación insuficiente debida a la sobrecarga de ROS. Esta prueba no es suficiente para explicar

lo sucedido con el Fe^{+2} , sería necesario hacer medición de ROS o de bases oxidadas para dictaminar lo sucedido.

Se confirmó el efecto genotóxico del 4NQO en ambas cruzas, encontrándose diferencias evidentes entre éstas. En la CBE, con expresión altamente constitutiva de CYP450s, se presentó mayor efecto que en la CE, con expresión regulada. Esto se observó principalmente para las manchas grandes, producto de eventos mutacionales ocurridos al inicio del desarrollo embrionario (efecto prooxidante del 4NQO sumado a su acción promutágena). Estas diferencias eran esperadas ya que el compuesto es promutágeno y debe ser activado por el metabolismo xenobiótico, generándose metabolitos reactivos tales como el 4HAQO que forma aductos con el DNA (Tada, 1975).

En la CE todos los cotratamientos obtuvieron un diagnóstico positivo con la siguiente jerarquía $4\text{NQO} < 4\text{NQO}/\text{Vit. C} < 4\text{NQO}/\text{FeSO}_4 < 4\text{NQO}/\text{Vit. C}/\text{FeSO}_4$. Además, como se observa en la tabla 2B los resultados obtenidos muestran un efecto aditivo parcial. Suponíamos que el cotratamiento 4NQO/ Vit. C fuera menos genotóxico que el 4NQO porque siendo éste un óxido esperaríamos que la Vit. C lo estabilizara y que al promover Fase II se eliminaran eficientemente los metabolitos producidos en Fase I. El hecho de que el cotratamiento resultara más genotóxico, podría explicar si la Vit. C produce otro tipo de interacción con el 4NQO o con alguno de sus derivados y esta interacción sea dependiente de los CYP450s ya que en la CBE, sí se presenta disminución en la frecuencia de manchas pequeñas y grandes, aunque ésta no sea estadísticamente significativa. La interacción entre la Vit. C y el 4NQO con respecto a los CYP450s no es clara, y la prueba SMART no es lo suficientemente robusta para

esclarecerlo. De acuerdo con Arranz *et al.* (2007) se podría esperar competencia entre el 4NQO y la Vit. C por los CYP450s lo que reduciría la formación de metabolitos reactivos de ambos produciéndose menor frecuencia de manchas. Sería adecuado demostrar esta hipótesis, en un ensayo *in vitro*, libre de células, en el cual se usaría algún inhibidor de CYP450s en los tratamientos de 4NQO y Vit. C por separado y en mezcla, para ver cual es la participación entre éstos y los CYP450s.

En el caso del cotratamiento 4NQO/ FeSO₄ se observó efecto sinérgico en ambas cruces, sobre todo en manchas grandes, esto quiere decir que el FeSO₄ potenció el efecto del 4NQO y a su vez el 4NQO podría actuar como proveedor de H₂O₂ para el FeSO₄ y generar una reacción tipo Fenton (Chricton *et al.*, 2001), Así, en un sistema *in vivo*, por sus características químicas, pudieron haber promovido la generación de mayor cantidad de radicales libres que pudieron haber dañado al DNA (Imlay *et al.*, 1988).

El tratamiento de 4NQO/Vit. C/FeSO₄, fue el más genotóxico en la CE se asume por una alta carga de ROS provenientes de la interacción de la Vit. C con el Fe⁺² (reacción Fenton), del radical ascorbil aunado al del 4NQO que también produce daño oxidativo y rompimientos simples de DNA (Bailleul *et al.*, 1989; Gebhart *et al.*, 1988; Baohong *et al.*, 2005). En el caso de CBE se observa una disminución del efecto en manchas pequeñas y grandes con este mismo tratamiento, lo cual podría deberse a i) de alguna forma desconocida, la Vit. C interfiere en la interacción entre el 4NQO y el Fe⁺² disminuyendo así la frecuencia de manchas o ii) que los altos niveles constitutivos de CYP450s, produjeran más ROS, que sumados a los ya formados por los compuestos, generaran tanto daño al DNA, que

disparara la respuesta apoptótica y consecuentemente provocarían menor frecuencia de manchas. Ahora bien, no sólo podemos pensar en inducción a apoptosis por daño al DNA sino también por peroxidación lipídica de la membrana mitocondrial que provocaría la translocación citosólica del *citocromo c* el cual puede activar una cascada apoptótica de activación de caspasas y disminución de PARP (Jayshree *et al.*, 2000; Kluck *et al.*, 1997). En éste caso se estaría hablando de citotoxicidad, que también traería como consecuencia menor número de manchas.

La apoptosis juega un papel importante en la respuesta celular al estrés genotóxico y se ha pensado que la pérdida de la respuesta apoptótica en las células es uno de los mecanismos involucrados en la evolución tumoral maligna (Arends y Wyllie, 1991).

En este trabajo casi no se observaron manchas gemelas, indicadoras de eventos recombinogénicos, este resultado aparentemente difiere con Heres-Pulido *et al.* (2004) que observaron el efecto recombinógeno del 4NQO, sin embargo, en el presente trabajo sólo se revisaron las alas de individuos transheterocigotos, por lo que no se puede decir que no se hayan presentado dichos eventos. Se sugiere revisar las alas de fenotipo serratia para tener mayor información al respecto.

Los resultados obtenidos en este trabajo podrían explicar parcialmente los obtenidos por Gómez-Luna (2008), quien probó el BOC con 4NQO 2.0mM y obtuvo efecto sinérgico para manchas pequeñas en la CE. En la CBE observó que al aumentar la concentración de BOC disminuía la frecuencia de manchas, probablemente por inducción de apoptosis. Cabe aclarar que las concentraciones de Vit. C y FeSO₄ utilizadas en el presente trabajo se calcularon en función de la contenida en el BOC.

La discrepancia con Rebollar-Vega (2008) podría atribuirse al manejo post-cosecha del BS, ya que, al oxidarse la planta puede haber pérdida de Vit. C y su manejo puede influir en reacciones con los componentes de la mezcla compleja.

CONCLUSIÓN

En este modelo, a las concentraciones usadas y bajo las condiciones experimentales aquí expuestas:

1. En función de las diferencias en las frecuencias de clones mutantes encontradas para ambas cruzas. Se confirma la diferencia, reportada previamente, sobre la genotoxicidad del 4NQO relacionada con los niveles CYP450s
2. En la craza CE la Vit C fue prooxidante.
3. La Vit. C, el FeSO_4 y su mezcla modularon la genotoxicidad del 4NQO en ambas cruzas.
4. Los resultados con la mezcla Vit. C + FeSO_4 sugieren que la reacción Fenton ocurrió *in vivo* en la CE.
5. La modulación de la genotoxicidad del 4NQO ocurrió en función de los diferentes niveles de CYP450s presentes en las dos cruzas de *Drosophila melanogaster*.

BIBLIOGRAFÍA

Akao Y, Otsuki Y, Kataoka S, Ito Y, Tsujimoto Y. Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 1994;**54**:2468-2471.

Ames BN. Endogenous oxidative DNA damage, aging and cancer. *Free Rad. Res. Commun.* 1989;**7**:121–128.

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993;**90**:7915–7922.

Ames BN, Gold LS, Willett WC. The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1995;**92**:5258–5265.

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; 153pp.

Anderson D, Phillips BJ, Yu TW, Edwards AJ, Ayes R, Butterworth KR. The effects of vitamin C supplementation on biomarkers of oxygen radical generated damage in human volunteers with “low” or “high” cholesterol levels. *Env. Mol. Mutag.* 1997;**30**:161.

Antunes F, Cadenas E, Brunk UT. Apoptosis induced by exposure to a low steady-state concentration of H₂O₂ is a consequence of lysosomal rupture. *Biochem. J.* 2001;**356**:549–555.

Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 1991;**32**:223-254

Arranz N, Haza AI, García A, Rafter J, Morales P. Protective effect of vitamin C towards N-nitrosamine-induced DNA damage in the single-cell gel electrophoresis (SCGE)/HepG2 assay. *Toxicol In Vitro.* 2007;**7**:1311-7.

Bahadorani S, Bahadorani P, Phillips JP, Hilliker AJ. The effects of vitamin supplementation on *Drosophila* life span under normoxia and under oxidative stress. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2008;**63**:1:35-42.

Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell.* 1985;**41**:899-906.

Bailleul B, Daubersics P, Galiegue-Zouitina S, Loucheux-Lcfebvre MH. Molecular basis of 4-nitroquinoline 1-oxide carcinogenesis. *J. Cancer Res.* 1989;**80**:691-697.

Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 2005;**120**:483–495..

Baohong W, Jiliang H, Lifan J. Studying the synergistic damage effects induced by 1.8 GHz radiofrequency field radiation (RFR) with four chemical mutagens on human lymphocyte DNA using comet assay in vitro . *Mutat Res* 2005;**578**:149–57.

Barbouti A, Doulias P, Nouis L, Tenopoulou M, Galaris D. DNA damage and apoptosis in hydrogen peroxide-exposed Jurkat cells: bolus addition versus continuous generation of H₂O₂. *Free Radical Biol. Med.* 2002;**33**:691–702

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

Block G. The data support a role for antioxidants in reducing cancer risk. *Nutr. Rev.*, 1992;**50**:207–213.

Block G, Patterson B, Subar. A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer*. 1992;**18**:1–29.

Bode A. Metabolism of vitamin C in health and disease. *Adv. Pharm.* 1997;**38**:21.

Boiteux S, Gajewski E, Laval J, Dizdaroglu M. Substrate specificity of the *Escherichia coli* Fpg protein (formamidopyrimidine-DNA glycosylase): excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochemistry*. 1992;**31**:106-10.

Brenneisen P, Steinbrenner H, Sies H. Selenium, oxidative stress, and health aspects. *Mol. Aspects Med*. 2005;**26**:256–267.

Brodie Bb, Burns Jj, Mark Lc, Lief Pa, Bernstein E, Papper Emj. The fate of pentobarbital in man and dog and a method for its estimation in biological material. *Pharmacol Exp Ther*. 1953;**109**:26-34

Byers T and Perry G. Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Annu. Rev. Nutr.*, 1992;**12**:139–159.

Cai L, Koropatnick J, Cherian MG. Roles of vitamin C in radiation-induced DNA damage in presence and absence of copper. *Chem. Biol. Interact*. 2001;**137**:75-88.

Cadenas S, Barja G, Poulsen H, Loft S. Oxidative DNA damage estimated by oxo8dG in the liver of guinea-pigs supplemented with graded dietary

doses of ascorbic acid and α -tocopherol. *Carcinogenesis* 1997;**18**:2373–2377.

Carr A, Frei B. Does vitamin C act as pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J.* 1999;**13**:1007-1024.

Castell JV. Metabolismo de fármacos y hepatotoxicidad. Jornada de Toxicología Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular SEQC. Madrid, Abril 2005.

Chan AC, Walker IG. Loss of DNA repair capacity during successive subcultures of primary rat fibroblasts. *The Journal of Cell Biology.* 1977;**74**:365-370.

Chihuailaf RH, Contreras PA, Wittwer FG. Patogénesis del estrés oxidativo: consecuencias y evaluación en salud animal. *Vet. Méx.*, 2002;**3**:3.

Childs A, Jacobs C, Kaminski T, Halliwell B, Leeuwenburgh C. Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. *Free Radic Biol Med.* 2001;**15**:745-753.

Chinnaiyan AM, Dixit VM. The cell-death machine. *Current Biology.* 1996;**6**:555–562.

Chrastil J, Wilson JT. Contribution of Cytochromes and Proteins to the Effect of Ascorbic Acid on Artificial and Microsomal Hydroxylation Systems containing Oxygen and Hydrogen Peroxide. *Great Britain Biochem. J.* 1978;**170**:693-698

Costa WF, Nepomuceno JC. Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and minerals on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.* 2006;**47**:1:18-24.

Crichton R, Boelaert JR, Braun V, Hantke K, Marx JJM, Santos M, Ward R. Iron oxidative stress. Inorganic biochemistry of iron metabolism. 2ª edición. Edit. John Willey & sons, Inglaterra. 2001. Capítulo 10

Csala M, Braun L, Mile V, Kardon T, Szarka A, Kupcsulik P, Mandl J, Banhegyi G. Ascorbate-mediated electron transfer in protein thiol oxidation in the endoplasmic reticulum. *FEBS Letters*. 1990;**460**:539-543

Cullinton B.J. The complete genome sequence 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 15 de mayo del 2008; fecha de actualización 15 de mayo del 2008]. Disponible en: http://www.genomenewsnetwork.org/articles/03_00/article_fly_3_24.shtml.

Cunningham JJ. The glucose/insulin system and vitamin C: implications in insulin dependent diabetes mellitus. *J. Am. Coll. Nutr.* 1998;**17**:105.

Dabbagh AJ, Mannion T, Lynch SM, Frei B. The effect of iron overload on rat plasma and liver oxidant status in vivo. *Biochem J*. 1994;**300**:799-803

Danielson PB, MacIntyre RJ, Fogleman JC. Molecular cloning of a family of xenobiotic-inducible drosophilid cytochrome p450s: evidence for involvement in host-plant allelochemical resistance, *PNAS*. 1997;**94**:10797-10802.

Danielson PB, Fister JL, McMahill MM, Smith MK, Fogleman JC. Induction by alkaloids and phenobarbital of family 4 cytochrome P450s in *Drosophila*: evidence for involvement in host plant utilization. *Molecular & General Genetics*. 1998;**259**:54-59.

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

de Freitas JM, Meneghini R. Iron and its sensitive balance in the cell, *Mutat. Res.* 2001;**475**:153-159.

Doulias P, Christoforidis S, Brunk UT, Galaris D. Endosomal and lysosomal effects of desferrioxamine: protection of HeLa cells from hydrogen peroxide-induced DNA damage and induction of cell-cycle arrest. *Free Radic. Biol. Med.* 2003;**35**:719–728.

Dusinska M, Kazimirova A, Barancokova M, Beno M, Smolkova B, Horska A, Raslova K, Wslova L, Collins AR. Nutritional supplementation with antioxidants decreases chromosomal damage in humans. *Mutagenesis.* 2003;**18**:371-376.

Duthie SJ, Ma A, Ross MA, Collins AR. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res.* 1996;**56**:1291-1295.

Eguchi Y, Ewert DL, Tsujimoto Y. Isolation and characterization of the chicken bcl-2 gene: expression in a variety of tissues including lymphoid and neuronal organs in adult and embryo. *Nucleic Acids Res.* 1992;**20**:4187-4192.

Ek A, Strom K., Colgreave IA. The uptake of ascorbic acid into HUVECs and its effect on oxidant insult. *Biochem. Pharmacol.* 1995;**50**:1339.

Fenech M, Ferguson L. Vitamins/minerals and genomic stability in humans. *Mutat Res.* 2001; **475**:1-6

Ferguson LR. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutat. Res.* 1994;**307**:395– 410.

Fraga CG, Oteiza PI. Iron toxicity and antioxidant nutrients. *Toxicology.* 2002; **180**:23-32

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

Frei H, Würigler FE. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 1995;**334**: 247-258.

Fridovitch I. Superoxide dismutase. An adaptation to a paramagnetic gas. *Biol Chem* 1989;**264**:7761-7764

Friedberg EC, McDaniel LD, Schultz RA. The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis Current Opinion. *Genetics & Development* 2004;**14**:5-10

Fronza G, Campomenosi P, Iannone R, Abbondandolo A. The 4-nitroquinoline-1-oxide mutational spectrum in single stranded DNA is characterized by guanine to pyrimidine transversions. *Nucleic acids res.* 1992;**20**:1283-1287.

Gaivão I, Sierra LM, Comendador MA. The w/w+ SMART assay of *Drosophila melanogaster* detects the genotoxic effects of reactive oxygen species inducing compounds. *Mutat. Res.* 1999;**440**:2:139-45

Galaris D, Barbouti A, Korantzopoulos P. Oxidative stress in hepatic ischemia-reperfusion injury: the role of antioxidants and iron chelating compounds. *Curr. Pharm. Des.* 2006;**12**:2875-2890.

Galaris D, Evangelou A. The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2002;**42**:93-103

Galiègue-Zouitina S, Bailleul B, Ginot YM, Perly B, Vigny P, Loucheux-Lefebvre MHN2-guanyl and N6-adenyl arylation of chicken erythrocyte DNA by the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline 1-oxide. *Cancer Res.* 1986;**4**:1858-63.

Gastell PL, Pérez JL. Métodos para medir el daño oxidativo. *Rev Cubana Med. Milit.* 2000;**29**:67-78

Gebhart E, Bauer R, Raub U, Schinzel M, Ruprecht KW, Jonas JB. Spontaneous and induced chromosomal instability in Werner syndrome. *Hum. Genet.* 1988;**80**:135–9.

Ghaskadbi S, Rajmachikar S, Agate C, Kapadi A H, Vaidya V G. Modulation of cyclophosphamide mutagenicity by vitamin C in the in vivo rodent micronucleus assay. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 1992;**12**:11–17.

Gillman MD, Supples LA, Gagnon D, Posner MP, Ellison RC, Castelli WP, Wolf PA. Protective effect of fruits and vegetables on development of stroke in men. *JAMA*, 1995;**273**:1113–1117.

Gómez-Luna JC. "Evaluación del efecto antimutagénico del Brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) ante el 4-NQO en la cruza E y BE de *Drosophila melanogaster* mediante la prueba SMART en ala". Tesis de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad De Estudios Superiores Iztacala (2008) (En prensa).

Graf U, Würgler FE, Katz JA, Frei H, Juon H, Hall CB, Kale PG. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutag.* 1984;**6**:153-188.

Graf U, Frei H, Kägi A, Katz AJ, Würgler FE. () Thirty compounds tested in the *Drosophila* Wing spot test. *Mutat. Res.* 1989;**222**:359-373.

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

Graf U. Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*, *Experientia*. 1995;**51**:168-173.

Graf U, Spanó MA, Guzmán-Rincón J, Abraham SK, Andrade HH. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds and complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. Second Conference of Pan-African Environmental Mutagen society (PAEMS). *African Newsletter on Occupational Health and Safety*. 1996;23-25

Graf U, Abraham SK, Guzmán-Rincón J, Würzler FE. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 1998;**402**:203-209.

Green MH, Lowe JE, Waugh AP, Aldridge KE, Cole J, Arlett CF. Effect of diet and Vitamin C on DNA strand breakage in freshly isolated human white blood cells. *Mutat. Res.* 1994;**316**:91-102.

Griendling KK, Harrison DG. Dual role of reactive oxygen species in vascular growth. *Circ. Res.* 1999;**85**:562–563.

Griffiths HR, Lunec J. Ascorbic acid in the 21st century – more than a simple antioxidant. *Environ. Toxicol. and Pharmacol.* 2001;**10**:173–182

Guzmán-Rincón J, Graf U. *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, Gutteridge JMC. Iron and free radical reactions: two aspects of antioxidant protection. *TIBS*. 1986;**11**:372-375

Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.*, 1991;**281**:9-19.

Halliwell B. Proteasomal dysfunction: a common feature of neurodegenerative diseases? Implications for the environmental origins of neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal*. 2006;(11-12):2007-2019.

Hälström I, Blanck A. Genetic variation in cytochrome P450 system in *Drosophila melanogaster*. I. Chromosomal determination of some cytochrome P450-dependent reactions. *Chem. Biol. Interac.* 1985;**56**:157-171.

Hattori Y, Nishigori C, Tanaka K, Uchida K, Nikaido O, Osawa T, Hiai H, Imamura S, Toyokuni S. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure. *J. Investing. Dermatol.* 1996;**107**:733-737.

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

Heres-Pulido ME. 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.

Heres-Pulido M E, Dueñas-García I, Castañeda-Partida L, Sánchez-García A, Contrera-Sousa M, Durán-Díaz A, Graf U. Genotoxicity of tamoxifen citrate and 4-nitroquinoline-1-oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis*. 2004;**19**:187-193.

Higdon, Jane. *Linus Pauling Institute Recommendations*. Oregon State University.

Hirayama T. Lifestyle and mortality—the healthiest way to live. *Homeost. Health Dis*. 1994;**35**:168–179

Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. Bcl2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci*. 1991;**88**:6961-6965.

Hoda MQ, Sinha SP. Protective role of ascorbic acid and vitamin B-complex against pesticide-induced clastogeny in bone marrow cells of mice. *Int. J. Vitamin Nutr. Res*. 1991;**61**:155–158.

Hwang J, Sevalin A, Hodis HN, Ursini F. Synergistic inhibition of LDL oxidation by phytoestrogens and ascorbic acid. *Free Radic Biol Med*. 2000;**29**:79-89.

Ide F, Oda H, Nakatsuru Y, Kusama K, Sakashita H, Tanaka K, Ishikawa T. Xeroderma pigmentosum group A gene action as a protection factor against 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2001;**4**:567-72.

Ikegaki N, Katsumata M, Minna J, Tsujimoto Y. Expression of bcl-2 in small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res*. 1994;**54**:6-8.

Ikenega M, Ichikawa-Ryo H, Kondo S. The major cause of inactivation and mutation by 4-nitroquinoline 1-oxide in *Escherichia coli*: excisable 4NQO-purine adducts. *J. Mol. Biol.* 1975;**92**:341-356.

Imlay JA, Linn S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science.* 1988;**240**:640-642.

Iyer V, Struhl K. Absolute mRNA levels and transcriptional initiation rates in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996;**93**:5208–5212.

Jayshree LH, Mohamed AS, Kok WL, Hui DR, Manjunatha K Shazib P. Induction of mitochondrial permeability transition and cytochrome C release in the absence of caspase activation is insufficient for effective apoptosis in human leukemia cells. *Blood.* 2000;**95**:1773–1780.

Kakhlon O, Cabantchik ZI. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). *Free. Radic. Biol. Med.* 2002;**33**:1037-1046

Kasai H, Nishimura S. Formation of 8-hydroxydeoxyguane in DNA by oxygen radicals and its biological significance. *In Oxidative Stress: Oxidant and Antioxidants.* Academic Press. 1991; 99–116.

Kaya B, Creus A, Velázquez A, Yanikoglu A, Marcos R. Induction of an adaptive response in *Drosophila* imaginal disc cells exposed *in vivo* to low doses of alkylating agents. *Mutagenesis.* 2001;**15**:337-340.

Kaya K, Creus A, Velázquez A, Yanikoglu A, Marcos R. Genotoxicity is modulated by ascorbic acid studies using the wing spot test in *Drosophila*. *Mutat. Res.*, 2002;**520**:93-101.

Kitano M. Host genes controlling the susceptibility and resistance to squamous cell carcinoma of the tongue in a rat model. *Pathol. Int.* 2000;**50**:353-62.

Khan MMT, Martell AE. Metal ion and metal chelate catalyzed oxidation of ascorbic acid by molecular oxygen. I. Cupric and ferric ion catalyzed oxidation. *J. Am. Chem. Soc.* 1967;**89**:4176-4185.

Khan PK, Sinha SP. Ameliorating effect of vitamin C on murine sperm toxicity induced by three pesticides endo- sulfan, phosphamidon and mancozeb. *Mutagenesis.* 1996;**11**:33-36.

Kluck RM, Martin SJ, Hoffman BM, Zhou JS, Green DR, Newmeyer DD. Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system. *EMBO Journal.* 1997;**16**:4639-4649.

Kohda K, Tada M, Hakura A, Kasai H, Kawazoe Y. Formation of 8-hydroxyguanine residues in DNA treated with 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide and its related compounds in the presence of seryl-AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987;**149**:1141-1148.

Kondo S, Kato T. Photoreactivation of mutation and killing in *Escherichia coli*. *Adv. Biol. Mcd. Phys.* 1968;**12**:283-298.

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

Konopacka M, Rzeszowska-Wolny J. Antioxidant vitamin C, E beta-carotene reduce DNA damage before as well as after gamma-ray irradiation of human lymphocytes in vitro. *Mutat. Res.* 2001;**491**:1-7.

Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 1993;**53**:4701-4714.

Krinsky NI. Carotenoids as antioxidants. *Nutr.* 2001;**17**:815-817.

Lehman M, Graf U, Reguly ML, Rodrigues de Andrade HH. Interference of Tannic Acid on the Genotoxicity of Mitomycin C, Methylmethanesulfonate, and Nitrogen Mustard in Somatic Cells of *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2000;**36**:195-200

Levine M, Dhariwal KR, Welch RW, Wang Y, Park JB. Determination of optimal vitamin C requirements in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995;**62** (6 Suppl.), 1347S.

Levine M, Conry-Cantilena C, Wang Y, Welch RW, Washko PW, Dhariwal KR, Park JB, Lazarev A, Graumlich JF, King J, Cantilena LR. Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996;**93**:3704–3709.

Li YY, Wang L, Li S, Guo T, Guo X, Yang P, Chen Y, Wang L, Lu Ch. p53 protein activates the transcription of human proliferating cell nuclear antigen in response to 4-nitroquinoline N-oxide treatment. *IJBCB.* 2005;**37**: 416-426

Linster CL, Van Schaftingen E. Vitamin C biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS J.* 2007;**274**:1-22.

Liu SL, Lin X, Shi DY, Cheng J, Wu CQ, Zhang YD. Reactive oxygen species stimulated human hepatoma cell proliferation via crosstalk between PI3-

K/PKB and JNK signaling pathways. *Arch. Biochem. Biophys.* 2002;**406**:173–182.

Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J. Mol. Med.* 1996;**74**:297–312

Lutsenko EA, Carcomo JM, Golde DW. Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 2002;**277**:16895-16899.

Matsui M, Nishigori C, Toyokuni S, Takada J, Akaboshi M, Ishikawa M, Imamura S, Miyachi Y. The role of oxidative DNA damage in human arsenic carcinogenesis: Detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in arsenic-related Bowen's disease. *J. Investig. Dermatol.* 1999;**113**:26-31.

Miao ZH, Rao VA, Agama K, Antony S, Kohn KW, Pommier Y. 4-nitroquinoline-1-oxide induces the formation of cellular topoisomerase I-DNA cleavage complexes. *Cancer Res.* 2006;**66**:6540-5.

Mitchell I, Combes RD. 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.

Minoti G, Aust SD. The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1987;**262**:1098-1104.

Moriya M. Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-Oxoguanine in DNA induces targeted G. C- >T. A transversions in simian kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993;**90**:1122-1126.

Mirzayans R, Bashir S, Murray D, Paterson MC. Inverse correlation between p53 protein levels and DNA repair efficiency in human fibroblast strains

treated with 4-nitroquinoline 1-oxide: evidence that lesions other than DNA strand breaks trigger the p53 response. *Carcinog.* 1999;**20**:941-946.

Naidu, K. A. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr. J.*, 2003;**21**:2-7.

Nakahara W, Fukuoka F Sugimura T. Carcinogenic action of 4-Nitroquinoline-N-oxide. *Gann.* 1957;**48**:129-137

Nagao M, Sugimura T. Molecular biology of the carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide. *Adv. Cancer Res.* 1976;**23**:131-69.

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

Negrini M, Silini E, Kozak C, Tsujimoto Y, Croce CM. Molecular analysis of mbcl-2: structure and expression of the murine gene homologous to the human gene involved in follicular lymphoma. *Cell.* 1987;**49**:455-463.

Nishigori C, Hattori Y, Arima Y, Miyachi Y. Photoaging and oxidative stress. *Exp. Dermatol.* 2003;**12**(suppl.2):18-21.

Nishimura A. Changes in Bcl-2 and Bax Expression in Rat Tongue during 4-Nitroquinoline 1-oxide-induced Carcinogenesis. *J. Dent. Res.* 1999;**78**:1264-1269.

Noorozi M, Angerson WJ, Lean ME. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am. J. Clin. Nutr.* 1998;**67**:1210-1218.

Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993;**74**:609-619.

Ordman R. The Scientific Basis of The Vitamin C Dosage Of Nutrition Investigator. *Beloit College*. Archivado desde el original, el 2007-02-22.

Paolini M, Pozzetti L, Pedulli GF, Marchesi E, Cantelli-Forti G. The nature of prooxidant activiti of vitamin C. *Life Sci*. 1999;**64**:273-278.

Panigrahi GB, Walker IG. Lack of excision of 4HAQO adducts from DNA by cell extracts that excise pyrimidine dimers. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1986;**140**:775-81.

Parkes JG, Olivieri NF, Templeton DM. Characterization of Fe²⁺ and Fe³⁺ transport by iron-loaded cardiac myocytes. *Toxicology*. 1997;**117**:141–151.

Pezzella F, Turley H, Kuzu I, Tungekar MF, Dunnill MS, Pierce CB. bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. *N Engl. J. Med*. 1993;**329**:690-694.

Podmore ID, Griffiths HR, Herbert KE, Mistry N, Mistry P, Lunec J. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature*. 1998;**392**:559.

Poulsen HE, Weimann A, Salonen JT, Nyyssonen K, Loft S, Cadet J, Douki T, Ravanat JL. Does vitamin C have a pro-oxidant effect? *Nature*. 1998;**395**:231-232.

Premkumar K, Bowlus CL. Ascorbic acid does not increase the oxidative stress induced by dietary iron in C3H mice. *J. Nutr*. 2004;**134**:435-438.

Ramos P, Abundis HM, Gaytán JC, Ordaz MG, Orozco PG, Maldonado J, Hernández J, González E, Reyes P, Galicia EM, Muñoz JA. Manual de

laboratorio de genética para *Drosophila melanogaster*. McGraw-Hill, México. 1993, p131.

Rebollar-Vega, R. G. "Estudio de la interacción del brócoli (*Brassica oleracea*, var. *Italica*) con el carbamato de etilo (uretano), Metil Metanosulfonato (MMS) y 4-Nitroquinolina-1-óxido (4-NQO) en la prueba SMART en ala de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad De Estudios Superiores Iztacala 2008;63pp.

Rehman A, Collis CS, Yang M, Kelly M, Diplock AT, Halliwell B, Rice-Evans C. The effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage to DNA in healthy volunteers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998;**246**:293-298.

Rosen GM, Britigan BE, Halpern HJ, Pov S. The oxygen paradox in: Free radicals Biology and detection by spin trapping. Oxford University New York. 1999, Chapter 10.

Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR, Gabor Miklos GL. Comparative genomics of the eukaryotes, *Science*. 2000; **287**:2204-2215.

Sakagami H, Satoh K, Hakeda Y, Kumegawa M. Apoptosis inducing activity of vitamin C and vitamin K. *Cell Mol. Biol.* 2000;**46**:129.

Saner CB, Weibel F, Würgler C. Senggstag. Metabolic of promutagens catayzed by *Drosophila melanogarter* CYP6A2 enzyme in *Sacharomyces cerevisiae*, *Envirol. Mol. Mutagen.* 1996;**27**:46-58.

Sarma L, Kesavan PC. Protective effects of vitamins C and E against g-ray-induced chromosomal damage in mouse. *Int. J. Radiat. Biol.* 1993;**63**:759–764.

Schaich KM. Metals and lipid peroxidation. Contemporary issues. *Lipids*. 1992;**27**:209-218

Shamberger RJ. Genetic toxicology of ascorbic acid. *Mutat. Res.* 1984;**133**:135–159.

Siede W, Friedberg AS, Friedberg EC. RAD9-dependent G1 arrest defines a second checkpoint for damaged DNA in the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci Genetics*. 1993;**90**:7985-7989.

Sies H, Stahl W, Sundquist AR. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann. NY Acad. Sci.* 1992;**669**:7–20.

Snyderwine EG, Bohr VA. Gene- and Strand-specific Damage and Repair in Chinese Hamster Ovary Cells Treated with 4-Nitroquinoline 1-Oxide. *Cancer res.* 1992;**52**:4183-4189.

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

Srivastava SK, Ansari NH, Liu S, Izban A, Das B, Szabo G, Bhatnagar A. The effect of oxidants on biomembranes and cellular metabolism. *Mol Cell Biochem*. 1989;**91**:149-57.

Stahl W, Sies H. Antioxidant defense: Vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes*. 1997;**46**:14–S18.

Stich HF, Stich W, San RH. Chromosome aberrations in xeroderma pigmentosum cells exposed to the carcinogens, 4-nitroquinoline-1-oxide and N-methyl-N'-nitrosoguanidine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1973;**142**:1141-1144.

Suberlich HA. Pharmacology of vitamin C. *Ann. Rev. Nutr.* 1994;**14**:371.

Tada M. Seryl-tRNA synthetase and activation of the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Nature.* 1975;**255**, 510–512.

Takebe H, Furuyama JI, Miki V, Kondo S. High sensitivity of xeroderma pigmentosum cells to the carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide. *Mutat. Res.*, 1972;**15**: 98-100.

Takeuchi T, Morimoto K. Crocidolite asbestos increased 8-hydroxydeoxyguanosine levels in cellular DNA of a human promyelocytic leukemia cell line, HL60. *Carcinogenesis.* 1994;**15**:635-639.

Takeuchi T, Matsugo S, Morimoto K. Mutagenicity of oxidative DNA damage in Chinese hamster V79 cells. *Carcinogenesis.* 1997;**18**:2051-2055.

Tenopoulou M, Doulias PT, Barbouti A, Brunk UT, Galaris D. Role of compartmentalized redox-active iron in hydrogen peroxide-induced DNA damage and apoptosis. *Biochem. J.* 2005;**387**:703–710.

Tien M, Svingen BA, Aust S. Superoxide dependent lipid peroxidation. *Fed. Proc.* 1981;**40**:179-182.

Tsujimoto Y, Croce CM. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1986;**83**:5214-5218

Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985;**228**:1440-1443.

Udenfriend S, Cooper Jr, Clark Ct, Baer Je. Rate of turnover of epinephrine in the adrenal medulla. *Science.* 1953;**117**:663-665.

Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988;**335**:440-442.

Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell*. 1999;**96**:245–254.

Vera JC, Rivas CI, Fischbarg J, Golde DW. Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid. *Nature*. 1993;364:79-82.

Velisek J. Chemistry in food (in Czech). Tabor: Oasis; 1999.

Verhoeven DT, Verhagen H, Goldbohm, R A, Van den Brandt, P A, Van Poppel G. Mini review: A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chemico-Biological Interactions* 1997;**103**:79-129

Vitamin and mineral requirements in human nutrition, 2nd edition. World Health Organization (2004). Archivado desde el original, el 2007-02-20.

Vitamin C Foundation's RDA. Archivado desde el original, el 2007-02-12.

Vitamin C. Food Standards Agency (UK). Archivado desde el original, el 2007-02-19.

Vogel EW. Tests for recombinagens in somatic cells of *Drosophila*. *Mutat Res*. 1992; **284**:159-75.

Vogel EW, Graf U, Frei HJ, Nirvad MM. The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. IARC, *Scient. Publ*. 1999;**146**:427-470.

Walker IG. Lack of effect of 4-nitroquinoline l-oxide on cellular NAD levels. *Mutat.Res*. 1984;139:155-159.

Wattenberg LW. Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. *Cancer Res* 1983;**43**(Suppl):2448s–2453s.

Wattenberg LW. .Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.* 1985;**45**:1-8

Weissberger L.H, Harris P.L. Effect of tocopherols on phosphorus metabolism *J. Biol. Chem.* 1943;**151**:543-551

Yamamoto Y, Itoh T, Takahashi H. Nucleolar organizer regions in tongue carcinomas induced in rats: comparison with DNA cytofluorometric analysis. *Acta Otolaryngol.* 1994;**114**:458-64.

Yin X-M, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature.* 1994;**369**:321-323.

Yoshino M, Muramaki K. Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. *Anal Biochem.* 1998;**257**:40-44

Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL. Mediation of poly (ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science.* 2002;**297**:259–263.

Zhao M, Antunes F, Eaton JW, Brunk UT. Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 2003;**270**:3778–3786.

ANEXO 1

METABOLISMO XENOBIÓTICO

Los compuestos denominados xenobióticos, se encuentran presentes en los alimentos y en el medio ambiente, con los que inevitablemente entramos en contacto. Suelen ser de naturaleza no polar, por lo que tienen una tendencia natural a acumularse en los entornos lipídicos de los organismos. A diferencia de los compuestos volátiles (cuya eliminación se facilita mediante intercambio gaseoso en los pulmones) o los hidrosolubles (filtración renal), la eliminación de los compuestos lipofílicos es mucho más problemática, por lo que su acumulación en el organismo puede llegar a desencadenar fenómenos de toxicidad (Castell, 2005).

El hígado contribuye de forma mayoritaria a la función de facilitar la eliminación de xenobióticos lipofílicos, mediante un conjunto de reacciones, denominadas de *biotransformación*, en las que se modifica de manera más o menos compleja la estructura química de los xenobióticos para aumentar su hidrosolubilidad y así facilitar su eliminación.

El resultado final de la biotransformación de un xenobiótico es la formación de metabolitos que, por su menor lipofilicidad son más solubles en agua, más fácilmente eliminables vía renal o biliar, y por lo general, menos tóxicos, aunque también una consecuencia posible de esta biotransformación es que los productos generados por estas reacciones pueden ser más tóxicos que el compuesto original (Castell, 2005).

Etapas del metabolismo y enzimas implicadas.

El proceso de biotransformación se subdivide en etapas o fases. Bajo la denominación de *Fase I* se engloban procesos químicos de distinta naturaleza (principalmente oxidación, oxigenación, reducción e hidrólisis, así como de-alquilaciones, deshalogenaciones), cuyo resultado es la modificación química de las moléculas con la adición de nuevos grupos funcionales. El metabolito resultante es más polar, más reactivo, y sensiblemente menos lipófilo.

Con frecuencia, los metabolitos generados en la *Fase I* se unen covalentemente a moléculas endógenas de la célula tales como ácido glucorónico, glutatión, sulfato y aminoácidos generando conjugados (Reacciones de *Fase II*). Este proceso conlleva un considerable aumento de la hidrosolubilidad y, por lo general, también una disminución de su efectividad toxicológica (Castell, 2005).

Ambos procesos facilitan la eliminación renal o biliar de los metabolitos (*Fase III*), pero no todos los xenobióticos necesariamente pasan por un proceso de *Fase I* seguido de otro de *Fase II*. El objetivo principal de las reacciones de biotransformación es el modificar la hidrofobicidad de un compuesto de manera que se facilite su eliminación y, en ocasiones, tal objetivo se alcanza con sólo reacciones de *Fase I*, solo de *Fase II*, o ambas.

Durante la *fase I* del metabolismo, uno o más grupos polares (como el hidroxilo, $\cdot\text{OH}$) son adheridos a una molécula hidrofóbica. Por medio de esta reacción el compuesto original se transforma en sustrato conveniente para la *Fase II*, conjugando enzimas, tales como la glutatión transferasa. Los productos conjugados son suficientemente polares y están listos para ser excretados de la célula y del cuerpo. Aunque esta ruta metabólica

representa básicamente un mecanismo de detoxificación, en el caso de los promutágenos y procancerígenos esta ruta lleva a la formación de productos cancerígenos/ mutagénicos. Unas de las enzimas más importantes de la *Fase I* es un grupo conocido como CYP450-mediados, oxidasas de función mixta (MFO) o monoxigenasas (MO) que están en el retículo endoplásmico liso de la célula. MFO es una enzima casi ubicua. Se ha encontrado en el 90% de los tejidos que se han examinado, incluyendo hígado, pulmón, tracto gastrointestinal y riñón de rata, ratón, crisetos (hámsteres) y monos. La enzima también ha sido detectada en hígado, pulmón y placenta humanos. A pesar de que este sistema está localizado el retículo endoplásmico, también puede estar presente en fracciones nucleares y mitocondriales. La membrana envuelve un sistema multi-componente de dos proteínas pequeñas CYP450 y una proteína llamada NADPH-CYP450 reductasa, así como oxígeno molecular y NADPH (Castell, 2005).

CYP450s

El ciclo catalítico del CYP450 implica varias etapas sucesivas. Comienza por la incorporación del xenobiótico al centro catalítico de la enzima que en ese momento tiene el átomo de hierro del grupo prostético hemo, en estado oxidado Fe^{+3} . La catálisis por CYP450 transcurre con el concurso del CYP450 reductasa dependiente de NADPH, que suministra el electrón necesario para la reducción a Fe^{+2} . En ese momento el oxígeno molecular entra en el centro catalítico de la enzima asociándose al grupo hemo. El electrón del Fe^{+2} es transferido a la molécula de oxígeno. Un segundo electrón canalizado a través del citocromo b5, permite reducir parcialmente a la molécula de oxígeno unida que, junto con un H^+ , libera uno de sus átomos en forma de H_2O . El otro átomo de oxígeno, todavía unido al centro catalítico, oxida al xenobiótico que allí encuentra. El

compuesto se libera de la enzima y la enzima puede iniciar ahora un nuevo ciclo de catálisis (Castell, 2005).

Los citocromos poseen una cierta permisividad en cuanto al sustrato sobre el que actúan, de manera que sus especificidades se solapan asegurando que virtualmente cualquier xenobiótico sea metabolizado por ellos.

Flavín-monooxigenasas.

Ocupan el segundo lugar en importancia en cuanto a las oxidaciones metabólicas. Estas enzimas están implicadas en la oxigenación de compuestos nitrogenados (con la formación de N-óxidos), organofosforados y organosulfurados.

A diferencia de los citocromos, son enzimas que poseen como coenzima *flavina-adenosina-dinucleótido (FAD)* y son capaces de utilizar directamente NADPH como cofactor para reducir uno de los dos átomos de oxígeno. Su mecanismo de acción catalítico es singular, la interacción de los xenobióticos con la enzima es mucho más laxa. La oxidación se produce a través de un intermedio reactivo oxidante generado en el mismo centro catalítico de la enzima (hidroxiperoxi-flavín monooxigenasa) que oxida al xenobiótico.

Finalmente existen otras reacciones de oxidación, catalizadas por diversas enzimas. En primer lugar las aminoxidasas (MAO) y diaminoxidasa (DAO), encargadas de la desaminación oxidativa de sustratos endógenos. En segundo lugar la xantina oxidasa, que convierte la hipoxantina en xantina y finalmente en ácido úrico, pero que es capaz de oxidar distintos xenobióticos (Castell, 2005).

Biotransformación

En ocasiones, como consecuencia del propio metabolismo, se originan especies químicamente reactivas capaces de interactuar con biomoléculas de la célula. Este escenario puede presentarse como consecuencia de reacciones catalizadas por los CYP450s. En el transcurso de las reacciones de oxidación en las que intervienen, se pueden generar intermediarios electrófilos reactivos. El resultado es por tanto una reacción de bioactivación del compuesto.

Además de las especies reactivas derivadas del propio xenobiótico, también pueden generarse especies reactivas de oxígeno capaces de iniciar reacciones radicalarias en cadena, con resultado de daño celular. La reacción catalizada por los CYP450s implica una reducción parcial de la molécula de O_2 . Si la activación del oxígeno queda confinada en el centro catalítico de la enzima, la reacción transcurre hasta la oxidación del fármaco sin mayores incidencias. Sin embargo, en ocasiones las reacciones pueden no completarse, por impedimentos estéricos del propio sustrato o porque alguna de las isoformas del CYP450, concretamente CYP2E1, dejan escapar con relativa facilidad intermedios reactivos, generando anión superóxido (O_2^{-1}), peróxido (O_2^{-2}), e incluso radicales derivados del propio xenobiótico.

Para contrarrestar los efectos deletéreos la mayoría de las células (en particular los hepatocitos) poseen mecanismos de defensa capaces de conjugarse como: *GST*, *GSH* y mecanismos de reparación de DNA y proteínas que participan en la *Fase II*.

Los reactantes de oxígeno se producen como consecuencia de la vida aeróbica. El control de sus niveles es esencial para mantener los efectos benéficos, como la conversión del piruvato a acetil-S-CoA, la conversión

de ácido glutámico en protrombina y factores de coagulación VII y IX, y la fagocitosis, la activación de peroxidasas y NADH oxidasas, entre otros, y prevenir los efectos perjudiciales, como la arteroesclerosis, la autoinmunidad, la inflamación crónica, el síndrome de dificultad respiratoria, el cáncer y el envejecimiento (Castell, 2005).

ANEXO 2

OXÍGENO

Es interesante destacar que el O_2 y el O_2^- son radicales de oxígeno (O_2 es un biradical y O_2^- es un monoradical), mientras que el H_2O_2 , a pesar de ser una especie reactiva de oxígeno, no es un radical ya que todos los electrones de su orbital externo se encuentran apareados. El radical hidroxilo ($\cdot OH$) es una verdadera especie radical. Las especies de oxígeno actúan como oxidantes biológicos, pero el O_2^- es un reductor suave, aunque la simple adición de un protón lo convierte en un agente oxidante activo ($HO_2\cdot$). Sin embargo, el potencial redox del $\cdot OH$ marca claramente a este radical como una especie muy oxidante. El oxígeno singlete ($^1 O_2$) no se genera por reacciones redox, sino por absorción de energía electromagnética, la cual invierte transitoriamente el giro (spin) de uno de los dos electrones desapareados del oxígeno, de modo que los giros muestran una orientación antiparalela. El oxígeno molecular, estado basal o triplete, es incapaz de aceptar dos electrones directamente, reducción bivalente, porque la adición de un par de electrones antiparalelos se encuentra restringida por los giros paralelos del estado basal. El oxígeno singlete, sin embargo, con sus giros electrónicos antiparalelos no tiene tales restricciones en su reactividad y es muy buen oxidante bivalente frente a muchas biomoléculas. La absorción de grandes cantidades de energía electromagnética por el oxígeno molecular para generar oxígeno singlete se encuentra restringida a acontecimientos fotoquímicos. El interés en el oxígeno singlete se centra principalmente en aquellos relacionados con la química ambiental, biología vegetal y reacciones oxidativas en tejidos expuestos al medio ambiente, como la piel y el ojo. El oxígeno singlete es muy inestable y se

convierte en oxígeno molecular, emitiendo luz en su descomposición (Rosen *et al.*, 1999).

La vida media más corta la poseen los radicales de elevada reactividad, lo que indica que los radicales $\cdot\text{OH}$ son los más reactivos. La formación de $\cdot\text{OH}$ implica reacción con cualquier molécula orgánica cercana. Otras especies reactivas producidas en condiciones normales no son radicales libres, pero poseen elevada reactividad, como es el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), estado de oxígeno excitado electrónicamente, con una vida media de 5×10^{-6} segundos, y el poderoso oxidante peroxinitrito (ONOO^-) con vida media de 0,05 - 1 segundos

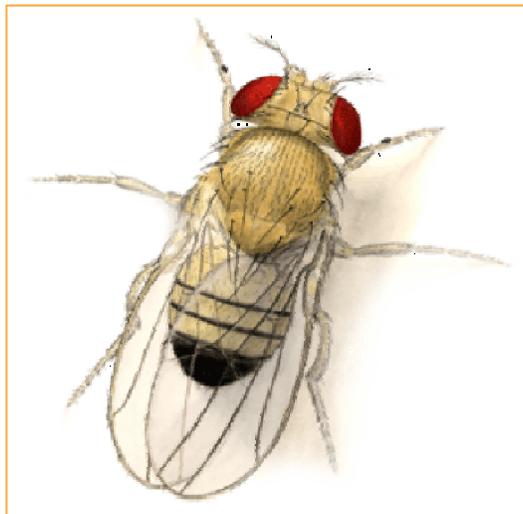
A pesar de su naturaleza biradical, la molécula de oxígeno es, desde el punto de vista químico, bastante estable y se ha descrito como radical perezoso. La mayoría de las biomoléculas aisladas, proteínas, azúcares, DNA y algunos lípidos son estables por largos períodos de tiempo en nuestra atmósfera. Sin embargo el oxígeno es bastante reactivo para combinarse con los átomos de hierro de la hemoglobina y la citocromo oxidasa (constantes de reacción de segundo orden 10^7 - $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), para proporcionar las bases químicas para el transporte y respiración del oxígeno (Rosen *et al.*, 1999).

ANEXO 3

***Drosophila melanogaster* y SMART**

Drosophila melanogaster (fig 5) es también conocida como mosca del vinagre o de la fruta, es un insecto díptero, que posee un número de cromosomas reducido (4 pares) y un ciclo de vida corto (10-12 días a 25° C) (Amorós, 2001) Aproximadamente el 61% de los genes de enfermedades humanas conocidas tienen una contraparte identificable en su genoma (Culliton, 2000) y el 25.5% de sus proteínas son similares, en 80% de su secuencia, a las de los mamíferos (Rubin *et. al.*, 2000). A nivel genético, *Drosophila melanogaster* es un organismo extensamente estudiado (DIS, 2008).

Figura 5: *Drosophila melanogaster* macho (Tomada de



www.imsb.ethz.ch/.../hafene/researchprojects)

Drosophila melanogaster presenta 4 estadios: huevo (1 día), larva (4 días), pupa (5 días) y adulto (fig. 6) Consume de tres a cinco veces su peso, durante el estadio larvareo, debido a su ingesta continua de alimento. La metamorfosis ocurre en la pupa, en la cual se forman las estructuras adultas (antenas, ojos, alas, etc.) a partir de los discos imagales (fig 7). El par de discos imagales de las alas consisten en aproximadamente 30,000

células en la pupa temprana, cuando inicia la diferenciación celular del ala.

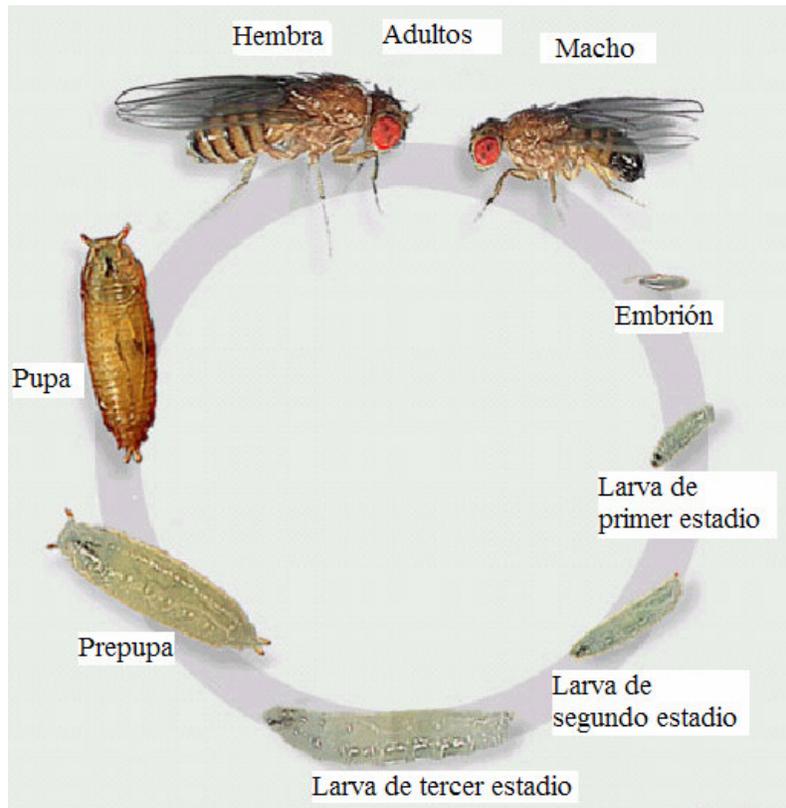


Figura 6: Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (modificado de <http://www.ucm.es/info/genetica/grupod/Genenzima/genenzima.htm>)

La madurez sexual del macho se da entre las seis y ocho horas, después de haber emergido de la pupa, mientras que en el caso de las hembras ésta tarda de diez a doce horas. La hembra fecundada puede depositar hasta 50-75 huevos en un día, posteriormente disminuye su producción (Graf, 1995; Mitchel y Combes, 1984).

La mosca de la fruta, ofrece una serie de ventajas como sistema de prueba eucariótico de genotoxicidad *in vivo*. Es fácil de cultivar, su ciclo de generación es corto y los ensayos somáticos son económicos porque sólo se requiere de equipo de laboratorio básico y de bajo costo. Además de los sistemas de prueba bien establecidos y validados que utilizan

células germinales, especialmente el de letales recesivos ligados al sexo, se han desarrollado otros como el de las células del ojo y del ala de los discos imagales. Estas pruebas de mutación y recombinación somáticas (SMART) son ensayos de una sola generación y utilizan marcadores recesivos que se expresan en la superficie de los ojos o de las alas de las moscas adultas. La inducción de la pérdida de heterocigosis de marcadores en las células de los discos imagales de las larvas mediante tratamiento con compuestos genotóxicos, conduce a la formación de un clon de células mutantes que después de la metamorfosis se expresan como manchas en los ojos o en las alas. La principal ventaja de estos sistemas de prueba somáticos reside en el hecho de que no sólo detectan varios tipos de eventos de mutación, sino que básicamente manifiestan la recombinación somática.

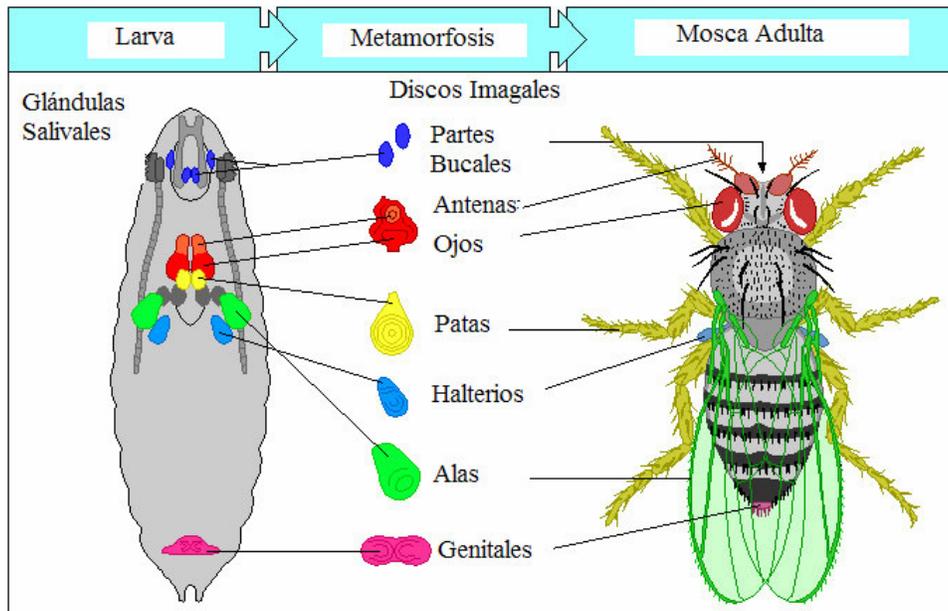


Figura 7. Morfología, localización y estructuras del adulto a las que darán lugar los discos imagales de *Drosophila melanogaster* (Modificado de Estrada 2008)

La prueba de la mancha del ala ofrece la ventaja de que en cada experimento es posible cuantificar la actividad recombinogénica contra la mutagénica (Frei y Würigler 1995). Además de la CE, en la prueba

SMART del ala, es posible realizar una cruza de bioactivación elevada (CBE) Las larvas de esta última se caracterizan por un elevado nivel constitutivo de citocromos P450, lo que facilita la detección de promutágenos y procancerígenos (Graf y van Schaik 1992). Guzmán-Rincón y Graf (1995) y Graf *et al.* (1996) proporcionan más detalles acerca del uso de la prueba del ala. Los ensayos somáticos de genotoxicidad se encuentran validados con un gran número de agentes químicos y mezclas complejas (más de 400) (Graf *et al.*, 1998, Vogel *et al.*, 1999) y además están bien adaptados para estudios de antigenotoxicidad (Graf *et al.*, 1998).

Se ha demostrado que *Drosophila melanogaster* tiene enzimas de los CYP450s encontradas en la fracción S9 del hígado de mamífero (Clark 1982; Hälström *et al.*, 1984). Además, Danielson *et al.* (1997, 1998) han probado que la familia CYP6 de *Drosophila melanogaster* muestra fuertes homologías con la familia CYP3 de los vertebrados la cual, al igual que la familia CYP2 son responsables del metabolismo de fármacos en los vertebrados. Finalmente Saner *et al.* (1996) describieron funcionalmente el gen CYP6A2 de *Drosophila melanogaster* como responsable del metabolismo xenobiótico en CBE.

Dos hechos han permitido que este organismo sea ideal para el análisis genético: primero que no hay recombinación meiótica en los machos y segundo, que se pueden obtener balanceadores en los cromosomas que impiden la recombinación meiótica con el cromosoma homólogo (Saner, 1996) Se tienen actualmente líneas construidas con marcadores genéticos específicos para investigar *in vivo* el efecto de tratamientos diversos sobre los genes o sus productos: mutaciones, deleciones y recombinaciones mitóticas. El efecto se puede cuantificar morfológicamente por aparición

o pérdida del o los marcadores tanto en las células germinales como en las somáticas.

Los 4 pares de cromosomas de *Drosophila melanogaster* en células somáticas en metafase se ven como: un par de cromosomas XX en las hembras que parecen varillas y en el caso de los machos se ve una varilla y un bastón que es el cromosoma Y; dos pares metacéntricos largos en forma de V (pares 2 y 3) y un par de varillas muy cortas que es el par 4. La posición citogenética de los genes en los cromosomas de este insecto se registra de acuerdo con la estructura de los cromosomas en la siguiente forma: posición 0-20 en el cromosoma X, 21-40 en el brazo izquierdo del cromosoma 2 y 41-60 en su brazo derecho; 60-80 en el brazo izquierdo del cromosoma 3 y 81-100 en su brazo derecho, por último 101-102 en el cromosoma 4 (Ramos *et al.*, 1993).

Para la prueba SMART se usan dos marcadores que afectan la apariencia de los tricomas de las alas: “*múltiple wing hairs*” (*mwh*) que es una mutación recesiva homocigótica viable, localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3 - 0.3), que en homocigocis produce tricomas múltiples por célula en lugar del tricoma único de la condición silvestre. El marcador “*flare*” (*flr*) es una mutación recesiva que afecta la forma de los tricomas, localizado en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-3.38). Se conocen tres alelos para este carácter y en condición homocigótica son letales. Sin embargo esta condición es sí es viable en las células de los discos imagales del ala, y puede observarse en la cutícula del ala. Por su carácter letal, los alelos *flr* pueden conservarse en las líneas de *Drosophila melanogaster* introduciendo un balanceador con múltiples inversiones y un marcador dominante que es letal en estado homocigótico, y que están presentes en la línea *flr³/TM3, Bd^s: " flare, Three Multiple 3, Beaded-*

Serrate". Las larvas transheterocigóticas (*mwh+/+flr*) pueden ser sometidas a tratamientos agudos o crónicos, a diferentes edades (48-92 h) y a diferentes agentes genotóxicos, pero el daño producido en los discos imagales de la larva (Graf, 1995) es evidenciado en el fenotipo de los tricomas de la cutícula del ala del adulto que pueden ser *mwh* o *flare* en forma de manchas simples: pequeñas y grandes y manchas gemelas. Los eventos genéticos que producen clones simples pueden ser mutación, recombinación, delección o pérdida del cromosoma y las gemelas solamente por recombinación somática (Figs. 8a y 8b). Las dimensiones de las manchas dependen de la edad larvaria en que se provoca la mutación o la recombinación y se forma el clon. La relación entre el tiempo de inducción de clones de células mutantes en el disco imagal y la talla de la mancha resultante en el ala, son un aspecto básico, relacionado con la prueba del ala. Los discos consisten en aproximadamente 50 a 100 células en el primer estadio larval y alcanzan una talla aproximadamente de 25,000 células en la pupa temprana cuando inicia la diferenciación del ala. De estas células son analizadas 24,400 en la prueba del ala. La proliferación continua durante el desarrollo de la larva permite aumentar la cantidad de células blanco presentes en el disco imagal. Por lo anterior, se espera un aumento en la inducción de clones conforme aumenta la edad de la larva. En contraste a la inducción de la frecuencia de clones, se espera que la talla de los clones disminuya conforme se incrementa la edad larvaria (Heres-Pulido 2001; Heres-Pulido *et al.*, 2004 y Spanó *et al.*, 2001)

a) Cruza Estándar (CE)

Esta craza se caracteriza por tener regulada la expresión de los genes CYP450. Está construida para la prueba SMART con hembras de la línea *flr³/TM3*, *Bd^s* y machos de la línea *mwh* que producen dos tipos de

genotipos: transheterocigóticos *mwh flr³⁺/mwh⁺ flr³* y heterocigóticos *mwh flr³⁺/mwh⁺ flr³⁺* TM3, *Bd^s*. Esta craza detecta principalmente mutágenos directos y como presenta niveles regulados de la familia de genes *Cyp450* es capaz de activar los mutágenos indirectos, aunque en mucha menor intensidad (Heres-Pulido 2001).

b) Cruza de Bioactivación Elevada (CBE)

En 1989 Frölich y Würgler construyeron una línea ORR-*flr* (ORR fue aislada de la naturaleza, es resistente al DDT) con la expresión constitutiva de los CYP450s dependientes de metabolismo xenobiótico, lo cual facilita la detección de pro mutágenos. En particular se encuentran aumentados los niveles de CYP6A2.

Esta craza está construida con hembras de la línea Oregon (ORR) [*ORR;flr³/-ln(3LR)TM3, Bd^s*] y machos *mwh* (Heres-Pulido et al. 2004)

c) Fundamento de SMART

El fundamento de la prueba SMART es "la pérdida de heterocigosis de genes marcadores que se expresan como clones o manchas de tricomas múltiples o malformados, derivados de células mutantes en las alas de los organismos adultos" ocasionada por la actividad genotóxica de compuestos que inducen eventos genéticos como: mutaciones puntuales, deleciones recombinaciones somáticas y no-disyunción (Fig.8 a y b) (Graf et al., 1998; 1984).

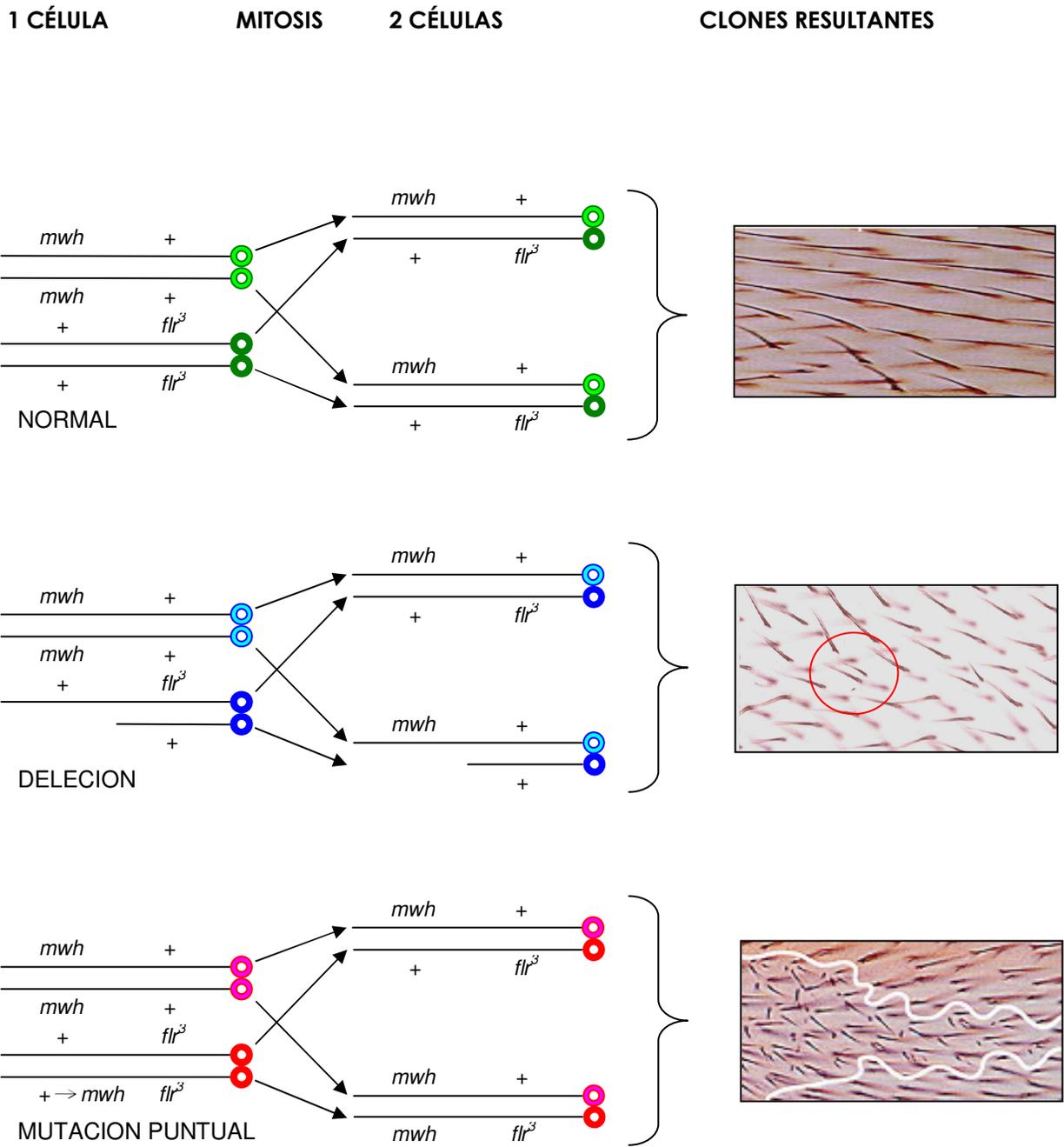


Figura 8a: Eventos que ocasionan la pérdida de heterocigosis para los marcadores *flr³* y *mwh* en *Drosophila melanogaster*

1 CÉLULA

MITOSIS

2 CÉLULAS

CIONES RESULTANTES

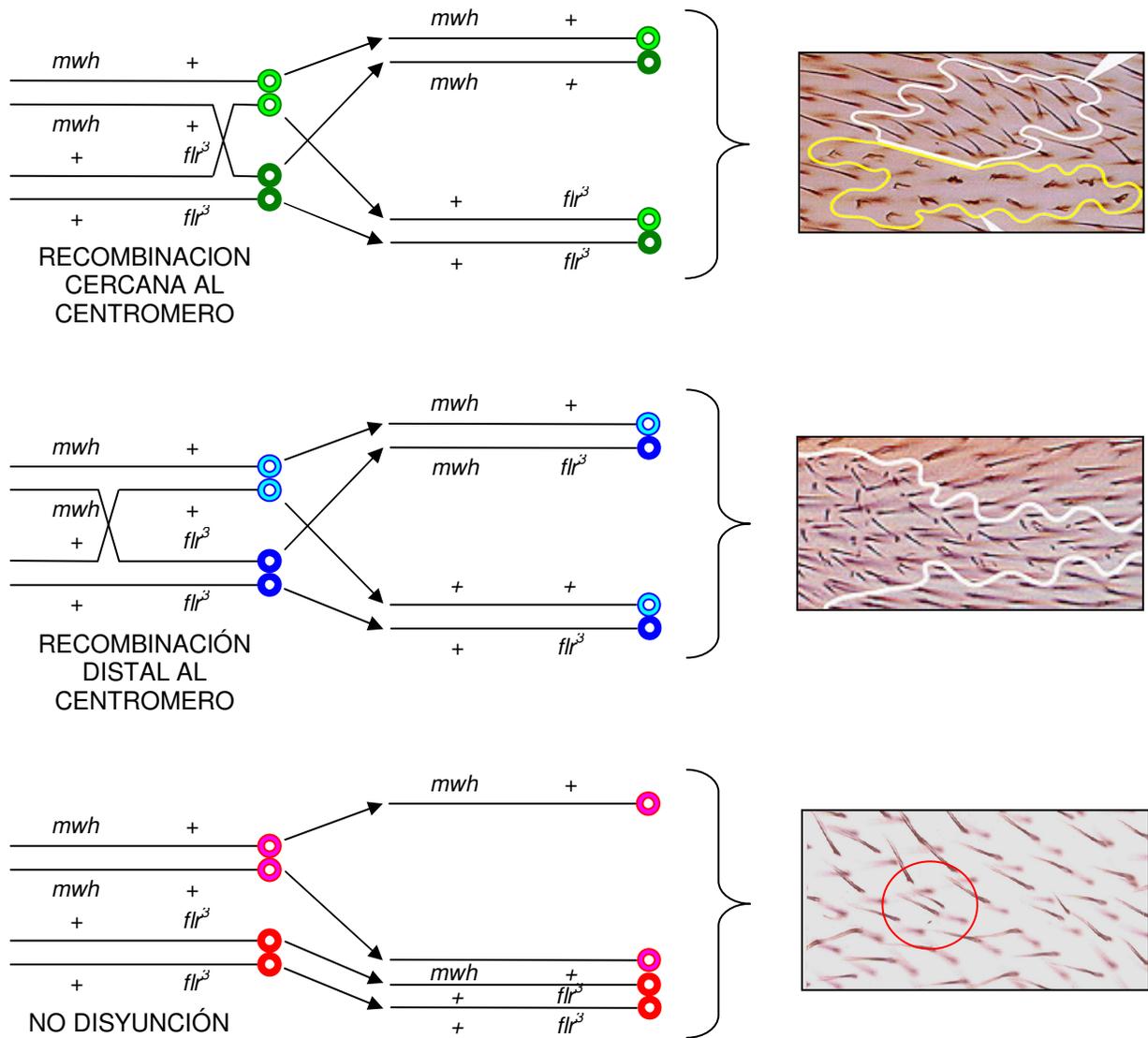


Figura 8b: Eventos que ocasionan la pérdida de heterocigosis para los marcadores *flr³* y *mwh* en *Drosophila melanogaster*.