



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

“EL EFECTO GENOTÓXICO DEL 4-NQO ES MODULADO POR LA
VITC/FeSO₄ EN *Drosophila melanogaster*, SMART EN ALAS,
CRUZA E”

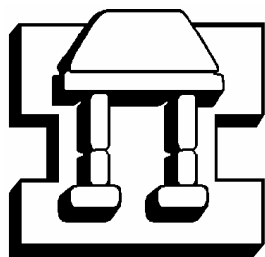
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

SOLEDAD POBLETE VENTURA



IZTACALA

DIRECTORA DE TESIS:

M. en C. IRMA ELENA DUEÑAS GARCÍA

TLALNEPANTLA DE BAZ, EDO. DE MEX.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mi hermano Daniel Ventura Poblete (Dany) el motor principal de mi vida

A mis papás: Soledad Poblete L. y Eudes Ventura J.

A Titus X. Lowman, por su apoyo moral en momentos difíciles

A mis hermanas: Briceida†, Idalia, Olivia†, Maritza, Mercedes y Oralia Ventura Poblete.

A mi hermano: Félix Ventura Poblete.

A mis sobrinos: Carlos y Maritza Matías V., Magdalena y Diego Vásquez V. y Rodrigo A. Rosas V.

A mis cuñados: Carlos Matías, Feliciano Vásquez, Guillermo Rosas y Martha Acevedo

A mi amigo Javier Gualito L.: quien fue un gran apoyo durante mi estancia en la Ciudad de México

A mis amigos: las familias Tapia Guerrero y Espinosa Domínguez

A mi primo Decar Hernández: quien fue un gran apoyo durante la realización de esta carrera

A mis queridas maestras Irma E. Dueñas G., M. de J. Laura Castañeda P. y M. Eugenia I. Heres P.

¡Lo logramos!!!!

A mis hermanas académicas: las princesas; Rocío Arellano L.L., Diana M. Arista D., Karina P. Estrada G., y

Rosa G. Rebollar V.,

A mis amigas del alma: Inés Marquez M., Candelaria Juárez M., Sonia Vásquez L., Isela Hernández G.,

Jared Espinosa C., Lizbeth G. Lee, Felicitas Zabalegui R., Sally Antonio A.,

A mis amigas Isabel Nájera I. y Fabiola Álvarez H. que me acompañaron en los cuatro años de carrera

A mi familia postiza de la FESI “los chemos y los luchos”

AGRADECIMIENTOS

A Dios quien me permitió llegar hasta esta parte de mi vida.

A mi querida profesora Irma Elena por su paciencia y dedicación.

A mis padres y hermanos quienes me han apoyado siempre en todo.

A las instituciones que en su momento me apoyaron económicamente a lo largo de la carrera y en la realización de esta tesis: al club deportivo CRUZ AZUL y al Programa Universitario México Nación Multicultural.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por todo lo que me dio y por lo que significa ser egresada de esta gran Institución.

Al Biol. Luis Felipe Santos Cruz, quien me dio algunos consejos prácticos para la realización de este trabajo.

Al M. en C. Ángel Durán Díaz por su colaboración en la pruebas estadísticas.

A la M. en C. María Eugenia Heres Pulido por sus sabios consejos.

A la directora de ésta tesis:

M. en C. Irma Elena Dueñas García

A mis sinodales:

M. en C. Ana María García Bores

M. en C. Laura Castañeda Partida

Doctora América N. Castañeda Sortibran

Biólogo Antonio E. Cisneros Cisneros

Quienes me dieron sabios consejos y sugerencias, gracias por el tiempo que le dedicaron a la revisión de esta tesis.

ÍNDICE	
LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
OXIDO DE 4-NITROQUINOLINA (4-NQO)	
OXÍGENO	6
RADICALES LIBRES (RL)	7
ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROS) Y TENSIÓN OXIDANTE....	9
VITAMINA C (VITC, ÁCIDO ASCORBICO)	12
ANTECEDENTES	16
JUSTIFICACIÓN	17
OBJETIVO	
HIPÓTESIS	18
DISEÑO EXPERIMENTAL	
MATERIALES Y MÉTODOS	19
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	33
REFERENCIAS	34
ANEXO 1	44
ANEXO 2	48
PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICAS (SMART POR SUS SIGLAS EN INGLÉS)	
ANEXO 3	52
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	
ANEXO 4	54
NUTRIENTES DEL BCO	
ANEXO 5	55
RESULTADOS DE SMART Y JI CUADRADA PARA PROPORCIONES DONDE SE COMPARAN LA DISTRIBUCIÓN DE LA PROPORCIÓN DEL TAMAÑO DE LOS CLONES	

“El efecto genotóxico del 4-NQO es modulado por la VitC/FeSO₄ en *Drosophila melanogaster*, SMART en alas, Cruza E”.

RESUMEN

Varios estudios han demostrado que el brócoli (*Brassica oleracea*) tiene propiedades anticancerígenas y antigenotóxicas, debidas posiblemente a que tienen altas concentraciones de Vitamina C (VitC), entre otros componentes. El óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO) es un potente mutágeno y cancerígeno. En trabajos previos con la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en ala de *Drosophila melanogaster*, cruza estándar (E), se ha reportado que cotratamientos con 4-NQO (2.0 mM)/brócoli cultivado orgánicamente (BCO) aumentó la proporción de mutación y recombinación somática, pero el tratamiento con 4-NQO (3.0 mM)/VitC (25, 75 y 250 mM) no causó efecto. Debido a que el BCO contiene altas concentraciones de VitC y iones metálicos, el propósito de este trabajo fue evaluar el efecto de la interacción de la mezcla VitC (5.6 mM)/FeSO₄ (0.2 mM) en diferentes concentraciones de 4-NQO (2.0, 2.5, 3.0 y 5.0 mM) en la cruza E de SMART en ala de *D. melanogaster*. Entre los testigos negativo y VitC/FeSO₄ no se encontraron diferencias estadísticas. En los tratamientos con 4-NQO se presentó mayor proporción de manchas/individuo para clones pequeños y grandes, con un claro efecto concentración-respuesta con un comportamiento lineal. En los co-tratamientos 4-NQO con VitC/FeSO₄ no se observó el mismo tipo de respuesta, ya que siguió un comportamiento de tipo polinomial. Se encontró un incremento estadísticamente significativo en las proporciones de las manchas pequeñas y grandes en el cotratamiento 4-NQO (2.0 mM) + VitC/FeSO₄ con respecto a 4-NQO (2 mM). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la proporción de manchas entre los cotratamientos 4-NQO (2.5, 3.0 y 5.0 mM) + VitC/FeSO₄ comparados con los tratamientos 4-NQO (2.5, 3.0 y 5.0 mM), pero sí se encontraron diferencias en la distribución del tamaño de clones *mwh*, excepto para 4-NQO (2.5 mM). En función de los resultados se deduce que hubo modulación de la genotoxicidad del 4-NQO por la Vit C/FeSO₄.

INTRODUCCIÓN

La capacidad genotóxica (mutagénesis¹, recombinogénesis², clastogénesis³), la oncogénesis⁴ y la actividad apoptótica⁵ de diferentes agentes a los que las poblaciones humanas están expuestas, han sido estudiadas. También es necesario encontrar agentes quimiopreventivos⁶ que brinden la posibilidad de evaluar la actividad antígenotóxica de compuestos simples o mezclas complejas, mediante co-tratamientos, pre-tratamientos y post-tratamientos a varias duraciones (Lohman *et al.*, 2001; Graf *et al.*, 1998).

Existen estudios epidemiológicos y experimentales en animales los cuales han demostrado que el brócoli (*Brassica oleracea* var. *Itálica*) tiene propiedades quimio-preventivas de la oncogénesis (Zhu y Loft, 2003, 2001; London *et al.*, 2000; Conaway *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 1997). Estas plantas de la familia Brassicaceae, contienen glucosinolatos, indoles y vitaminas A, C y E, entre otros compuestos, que se han reportado en el humano como anti-oncogénicos (Chu *et al.*, 2002; Cohen *et al.*, 2000; Verhoeven *et al.*, 1997). No obstante, hay estudios que muestran que el efecto antígenotóxico o genotóxico de la mezcla compleja del brócoli depende de numerosos factores, como el modelo experimental, la dosis, el momento de aplicación y la genotoxina (Verhoeven *et al.*, 1997).

OXIDO DE 4-NITROQUINOLINA (4-NQO)

El óxido de 4-nitroquinolina- (4-NQO por sus siglas en inglés) es un nitroareno (Figura 1), cancerígeno y mutágeno potente en los bioensayos a corto plazo. Sus propiedades mutagénicas y cancerígenas fueron reportadas por primera vez por Nakahara *et al.* (1957). Desde 1981 se sabe que el 4-NQO es un pro-cancerígeno que induce tumores principalmente en hígado, pulmón, esófago, estómago y piel entre otros órganos. Su vía de activación metabólica y su efecto cancerígeno han sido muy estudiados en diversas investigaciones

¹ Mutagénesis: generación de mutaciones que puede ser causada por diferentes agentes físicos o químicos.

² Recombinogénesis: generación de eventos de recombinación en células somáticas.

³ Clastogénesis: generación de fragmentos de cromosomas por agentes físicos o químicos.

⁴ Oncogénesis: Inducción de procesos cancerosos provocado por agentes físicos o químicos.

⁵ Actividad apoptótica: muerte celular debido a una ineficiente reparación en el material genético.

⁶ Quimiopreventivos: agentes químicos que pueden prevenir mutaciones y reparar daño celular causado por agentes físicos y químicos.

(Stanley y Benson 1988). Las enzimas citocromo P 450 (CYP450) que realizan la activación metabólica del 4-NQO están ampliamente distribuidas en la escala evolutiva, estando presentes en procariontes y en eucariontes; en los mamíferos se encuentran en la mayoría de los órganos y en *D. melanogaster* se localizan en prácticamente todo el cuerpo graso de la larva, pero principalmente se expresan en los túbulos de Malpighi (Yang *et al.*, 2007).

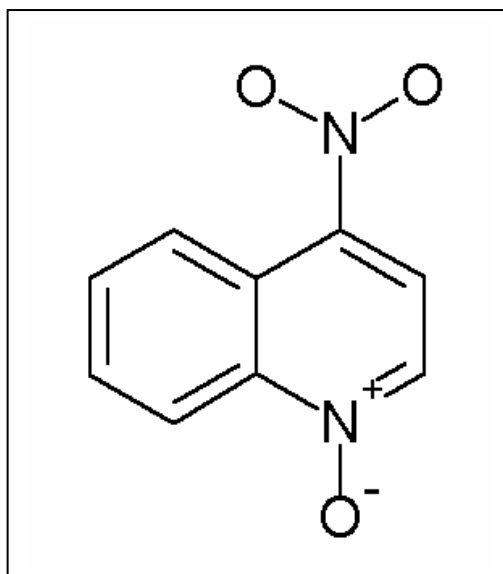


Figura 1. Estructura molecular del óxido de 4-nitroquinolina

El 4-NQO ha sido muy empleado en bioensayos con mamíferos para estudiar el cáncer provocado por daño inducido al ácido desoxirribonucleico (ADN) (Li *et al.*, 2005; Yanaida *et al.*, 2002; Fronza *et al.*, 1992). Para que se induzca el efecto neoplásico⁷, es fundamental que se lleve a cabo la activación metabólica de este pre-cancerígeno (Li *et al.*, 2005; Bailleul *et al.*, 1989). Durante esta etapa se produce el metabolito 4-acetoxiaminoquinolina-1-óxido (Ac-4-HAQO), que puede ser unido covalentemente al N2 y C8 de la guanina (dGuO-N2-AQO, dGuO-C8-AQO) y/o al N6 de la adenina (dAdO-N6-AQO). Estos aductos⁸ pueden producir transversiones (G → Py⁹), por si mismos o por la producción de sitiosapurínicos (AP), o transiciones (G → A) (Fronza *et al.*, 1992). Generalmente esas lesiones al ADN, a semejanza de las lesiones que provoca la luz UV, son procesadas por la Reparación de Escisión de Nucleótidos (REN)

⁷ Neoplasia: crecimiento incontrolado de nuevas células.

⁸ Aductos: compuestos que se forman al unirse algún metabolito con nucleótidos del material genético.

⁹ Py: pirimidinas; tres bases de los ácidos nucleicos (citosina, timina y uracilo) son derivados pirimidínicos.

(Li *et al.*, 2005; Mirzayans *et al.*, 1999); mientras que los aductos remanentes pueden dar como resultado mutación por transición debido al equilibrio tautomérico¹⁰, el cual es uno de los orígenes de la activación proto-oncogénica¹¹.

El 4-NQO también puede considerarse como mutágeno directo ya que otro mecanismo por el cual produce daños al material genético, tales como bases modificadas y rompimientos de hebras simples del ADN, es por tensión oxidante¹² intracelular (Li *et al.*, 2005; Ramotar *et al.*, 1998). Éste mutágeno incrementa las especies reactivas de oxígeno (EROs¹³) y se piensa que el 4-NQO sufre reacciones o modificaciones de oxido-reducción donde se genera el anión superóxido el cual puede generar sitios alcalinos como los causados por la luz UV (Friedberg *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 1993). Todos los daños causados por las EROs son reparados principalmente por Reparación por Escisión de Bases REB (Akbari, 2007). Si el daño en el ADN no puede ser reparado, algunas células pueden ser eliminadas por vía apoptótica escapando así al riesgo de oncogénesis. Existen evidencias que muestran que el 4-NQO (0.5-20 μ M) induce apoptosis en varios tipos de linajes celulares (Han *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2005; Héron-Milhavet *et al.*, 2001; Ramotar *et al.*, 1998).

En SMART en ala de *D. melanogaster* el 4-NQO ha mostrado ser genotóxico en la craza estándar (E) para todos los tipos de manchas y con un claro resultado concentración respuesta (Heres *et al.*, 2004; Kaya *et al.*, 2002; Batiste-Alentorn *et al.*, 1995; Negishi *et al.*, 1994; Hayatsu *et al.*, 1992; Graf *et al.*, 1989).

¹⁰ Equilibrio tautomérico: Tautomería o isomería de grupos funcionales debido a que un átomo de hidrógeno unido a otro átomo puede migrar a una posición vecina; en el ADN se dan dos tipos de tautomerías: tautomería lactama-lactima, donde el hidrógeno migra del nitrógeno al oxígeno del grupo oxo (forma lactama) y viceversa (forma lactima), y tautomería imina-amina primaria, donde el hidrógeno puede estar formando el grupo amina (forma amina primaria) o migrar al nitrógeno adyacente (forma imina). La adenina sólo puede presentar tautomería amina imina, la timina y el uracilo muestran tautomería doble lactama-lactima, y la guanina y citosina pueden presentar ambas.

¹¹ Proto-oncogen: Alelo silvestre de un gen relacionado con cualquier evento que participe en el desarrollo de un proceso canceroso.

¹² Tensión oxidante: también llamado estrés oxidativo, debido a que se refiere a una tensión en las células provocado por el oxígeno (todo lo referente al oxígeno se explica ampliamente mas adelante).

¹³ EROs: especies reactivas de oxígeno (Ver apartado en este texto p. 9)

OXÍGENO

El oxígeno fue descubierto en el aire por el químico inglés Joseph Priestley en 1774, y reconocido como elemento indispensable para la vida por el francés Antoine Lavoisier algunos años más tarde. Este gas está considerado como el elemento vital por excelencia. Todos los organismos aerobios, animales y plantas, producen su energía gracias al oxígeno que con la respiración oxida moléculas biológicas (Deby, 1991).

Aproximadamente 85-90% del oxígeno consumido por los animales es utilizado por las mitocondrias; estos organelos son la mayor fuente de Adenosin trifosfato (ATP) en los animales, en tejidos no fotosintéticos de plantas y en las hojas en la oscuridad. Lo esencial de la producción de energía metabólica es que el material de nutrición es oxidado: pierde electrones que son aceptados por los portadores de electrones, tales como, nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) y flavinas: flavin mononucleótido (FMN) y flavin adenina dinucleótido (FAD). El resultado es nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) y flavinas reducidas (FMNH_2 y FADH_2) que son oxidadas de nuevo por el O_2 en las mitocondrias, produciendo grandes cantidades de ATP. La oxidación es catalizada de tal manera que la energía sea liberada gradualmente. Éste proceso es realizado por la cadena de transporte de electrones presente en la membrana interna de la mitocondria (Halliwell-Gutteridge, 1999).

Cada átomo de oxígeno posee un electrón desapareado¹⁴ en su orbital externo y la molécula de oxígeno tiene dos electrones desapareados en distintos orbitales, de manera que el átomo de oxígeno es un radical libre y la molécula de oxígeno es un biradical libre (Cascales, 1999).

El ambiente reducido del medio intracelular proporciona amplias oportunidades para que el oxígeno sufra la reducción univalente. El anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo son subproductos comunes del metabolismo en ambiente aerobio y son los responsables de la toxicidad del oxígeno. Para sobrevivir en un ambiente poco favorable, los organismos vivos

¹⁴ Un electrón desapareado es una especie química que sólo tiene un electrón en su último orbital atómico.

han desarrollado una serie de sistemas enzimáticos y una variedad de compuestos antioxidantes hidro y liposolubles, cuyo papel es interceptar e inactivar las EROs que inevitablemente se sintetizan por todos los organismos aerobios. La célula tiene la capacidad de sintetizar una batería de enzimas antioxidantes que evitan la lesión de proteínas, lípidos y ADN. Estas son la enzima superóxido dismutasa (SOD), la glutathion peroxidasa (GPX), la catalasa (CAT), las superóxido dismutasa dependientes de cobre y zinc (Cu, ZnSOD) y la SOD dependiente del manganeso (MnSOD), la glutathion reductasa (GR) y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (Cascales, *Op. cit.*).

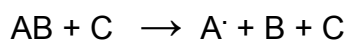
El oxígeno es esencial para los organismos aeróbicos; sin embargo, puede resultar tóxico, si se suministra en concentraciones elevadas e incluso en concentraciones similares a las del aire. Gershman y Gilbert propusieron que los efectos nocivos del oxígeno se debían a los radicales libres (RL) y otras EROs que se originaban a partir de él (Gershman, 1964. citado por Hernández *et al.*, 2001). Esta hipótesis fue desarrollada y aceptada totalmente cuando se descubrió la enzima SOD, que cataliza la reacción de dismutación del radical superóxido (O_2^-) para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Fridovich, 1975 citado por Hernández *et al.*, 2001). En ciertas condiciones, el radical superóxido es responsable de reacciones químicas tal como la oxidación la cual es muy tóxica para las células. Estas reacciones pueden dar origen a trastornos pulmonares, a problemas inflamatorios o cáncer, y también están implicadas en los fenómenos de envejecimiento (Deby, *Op. cit.*).

RADICALES LIBRES (RL)

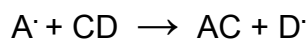
Un radical libre es cualquier molécula capaz de existir independiente, que contiene uno o más electrones desapareados. Los radicales son formados cuando un enlace covalente se rompe de forma homolítica. La energía requerida para disociar el enlace covalente puede ser dado por calor, radiación electromagnética u otros medios (Halliwell-Gutteridge, 1999). Un electrón desapareado confiere una reactividad muy elevada a los RL, pues tienden a capturar un electrón para complementar a su electrón desapareado. En la materia viva, los RL se originan generalmente con la captura de protones, a expensas de moléculas orgánicas próximas, por lo tanto hay ruptura de un

enlace covalente. Esto da lugar a deshidrogenaciones que crean nuevos radicales, los cuales a su vez, capturan electrones, y así sucesivamente. Sin embargo, la cadena se interrumpe muy rápido con la combinación de dos RL que ponen en común sus electrones desapareados. Existen radicales libres estables poco reactivos, como los radicales tocoferilo y ascorbilo, derivados respectivamente de las vitaminas E y C (Deby, *Op. cit.*).

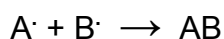
Los RL se caracterizan por iniciar reacciones en cadena que son reacciones de autopropagación en las cuales un radical reactivo origina un producto que es también un radical y que a su vez reacciona y origina otro radical. Esta fase química se conoce como “propagación” y una última fase es conocida como “terminación” en la que reaccionan dos radicales dando un compuesto no radical. Por lo tanto, las reacciones originadas por los RL en sus reacciones en cadena pueden dividirse en: a) iniciación, b) propagación y c) terminación. En la **iniciación**, un radical se forma a partir de una especie química:



En la **propagación**, un RL reacciona con una molécula estable:



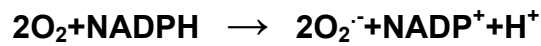
En la **terminación**, dos RL comparten sus electrones desapareados y originan un producto estable:



La reactividad química de los RL se determina por la molécula que posee el electrón desapareado, por lo cual la reactividad varía enormemente entre los diferentes RL. Una manera de expresar y comparar la reactividad química es evaluando el potencial redox de las especies químicas. Una vida media más corta la poseen los RL de elevada reactividad, lo que indica que los radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) son los más reactivos, la formación de $\cdot\text{OH}$ implica reacción con cualquier molécula orgánica cercana (Cascales *Op. cit.*).

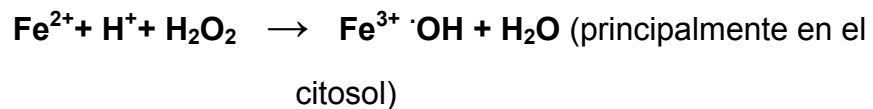
ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROs) y TENSIÓN OXIDANTE

Las principales EROs son: el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de Hidrógeno (H_2O_2), el oxígeno singulete (1O_2) y el $\cdot OH$. La formación de ($O_2^{\cdot-}$) puede ocurrir a nivel de la NADPH-oxidasa según la siguiente reacción:

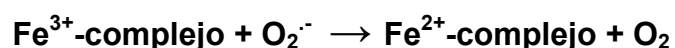


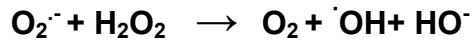
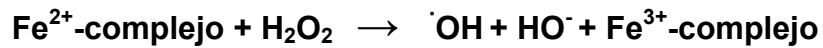
Se ha demostrado que el 1O_2 es un mediador de los efectos citotóxicos inducidos por la radiación UVA, Entre los daños a macromoléculas que puede ejercer el 1O_2 está el daño al ADN debido a la oxidación de residuos guanina a 7-hidro-8-oxo deoxiguanosina (8 oxo-Gu). Este nucleótido lleva luego a la transversión de G \rightarrow T, provocando así mutaciones que pueden llevar a la muerte celular (Ríos, 2003).

Una de las principales fuentes de EROs es la cadena respiratoria, donde pueden ocurrir trasferencias de electrones. En ella aproximadamente 3 % de los electrones provenientes de NADH, por la incompleta reducción del oxígeno se desvían hacia la formación de EROs. Las EROs son capaces de oxidar macromoléculas biológicas, tales como proteínas lípidos y ácidos nucleicos (Henle y Linn, 1997; Berlett y Stadtman, 1997; Steinberg, 1997). Por otra parte, el H_2O_2 puede reaccionar con metales divalentes (libres o unidos a proteínas) y producir $HO\cdot$, vía la **reacción de Fenton**. El ejemplo modelo es la reacción con Fe^{2+} libre, que ocurre según la siguiente reacción:



En forma similar, el H_2O_2 puede reaccionar también con el grupo prostético de metaloproteínas que contienen hierro por ejemplo: dihidroxiácido dehidrasa, 6 fosfogluconato dehidrasa, que sustraen al hidrogeno, fumarasas A y B o la aconitasa, según la **reacción de Haber Weis**:





El $\cdot\text{OH}$ puede reaccionar con diversas macromoléculas en las que por cesión de electrón se producen otras especies reactivas. En estos casos se dice que ha intervenido el radical hidroxilo. En este tipo de reacciones la hidroxilación y la transferencia de hidrógeno son las modificaciones más comunes que sufre el sustrato orgánico involucrado y se generan otros radicales libres orgánicos tales como: los radicales alcohilos ($\text{RO}\cdot$), peroxilos ($\text{ROO}\cdot$) y sulfoderivados (Ríos, *Op. cit.*).

La participación de un complejo de proteínas, conllevan modificaciones conformacionales por tensión oxidante, exponiendo distintos sitios de interacción proteica, que le permiten unirse a 2 ferro-proteínas integrales de membrana. De esta manera queda formado un complejo proteico con actividad NADPH-oxidasa (Ríos, *Op. cit.*).

El mecanismo de defensa antioxidante endógeno está constituido por sistemas enzimáticos y no enzimáticos. Entre los enzimáticos se encuentra la SOD, la catalasa, la glutatión reductasa y la glutatión peroxidasa y entre los no enzimáticos el glutatión, el ácido ascórbico (AA o VitC) y el ácido úrico como compuestos hidrosolubles y la vitamina E, los carotenos y la melatonina como liposolubles (Cascales *Op. cit.*).

La tensión oxidante (estrés oxidativo) se define como el estado en el cual los niveles de EROs son superiores a la capacidad reductora de la célula. El oxígeno molecular acepta electrones fácilmente de otras moléculas para formar las EROs y es esta peculiaridad la que lo hace tóxico para las células (Jiménez y Merchant, 2003). La tensión oxidante es un estado de la célula en la cual se encuentra alterada la homeostasis óxido-reducción intracelular, es decir el balance entre pro-oxidantes y antioxidantes. Este desbalance se produce a causa de una excesiva producción de EROs y/o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes, conduciendo a daño celular (Ríos, *Op. cit.*).

La inducción de la hemo-oxigenasa 1 (HO-1) se considera una “respuesta adaptativa” a la tensión oxidante. Esta respuesta es el fenómeno celular por el cual la exposición a un agente tóxico (en concentraciones subletales) provoca una respuesta celular que protegerá posteriormente a la célula contra los efectos deletéreos del mismo tóxico a concentraciones letales, dicho en otras palabras, es un efecto benéfico desencadenado con bajo nivel de exposición a un agente que es dañino a altos niveles. Este efecto es muy importante en casos de tensión oxidante (Ríos, 2003). La tensión oxidante se ha visto involucrada en una amplia variedad de procesos degenerativos, enfermedades y síndromes que incluye mutagénesis (transformación celular y cáncer), aterosclerosis, ataques al corazón, infartos, enfermedades crónicas inflamatorias y alteraciones del sistema nervioso (Cascales *Op. cit.*).

Se ha comprobado que la exposición a bajos niveles de radiación o a O₂ hiperbárico aumenta las defensas antioxidantes. La terapia con O₂ hiperbárico en el humano (100% O₂ a 2.5 atmósferas), por ejemplo, induce cambios significativos en el daño oxidativo al ADN, en células sanguíneas periféricas, pero luego el daño se estabiliza, en tanto que las defensas antioxidantes suben. El resultado es una reducción del daño celular total, específicamente a nivel de daño oxidativo al ADN, desencadenado inicialmente por el tratamiento. Pretratamientos de este tipo se suelen utilizar en pacientes que deben ser sometidos a una intervención quirúrgica, para minimizar los daños laterales provocados por tensión oxidante. Por otra parte en 1994, Cranfor y Davies, comprobaron que con tratamientos que provocan bajos niveles de oxidación y en condiciones normales de reparación, las células toleran cierta carga de aductos oxidados que contribuyen a la velocidad de mutación espontánea y muerte de células extremadamente dañadas, lo cual puede resultar benéfico para el sistema total (órgano y/o tejido) bajo determinadas condiciones (Cascales *Op. cit.*).

VITAMINA C (VITC, ÁCIDO ASCÓRBICO)

La vitamina C (VitC), también conocida como ácido ascórbico, en estado puro es blanca sólida y cristalina, muy soluble en agua, fue aislada por primera vez en las glándulas adrenales de mamíferos, coles y naranjas por Szent-Györgyi

en 1928. El ácido ascórbico (Figura 2) tiene dos grupos funcionales hidroxilo (OH) ionizables, de ahí su denominación como ascorbato; su pK_{a1} es de 4.25 y el pK_{a2} es de 11.8. La mayoría de las especies vegetales y muchos animales pueden sintetizar el ascorbato¹⁵ a partir de glucosa, pero los primates, incluyendo los humanos, perdieron las enzimas que se requieren para terminar el proceso de síntesis de ascorbato, es por eso que se requiere administrar VitC en la dieta (Halliwell-Gutteridge, 1999).

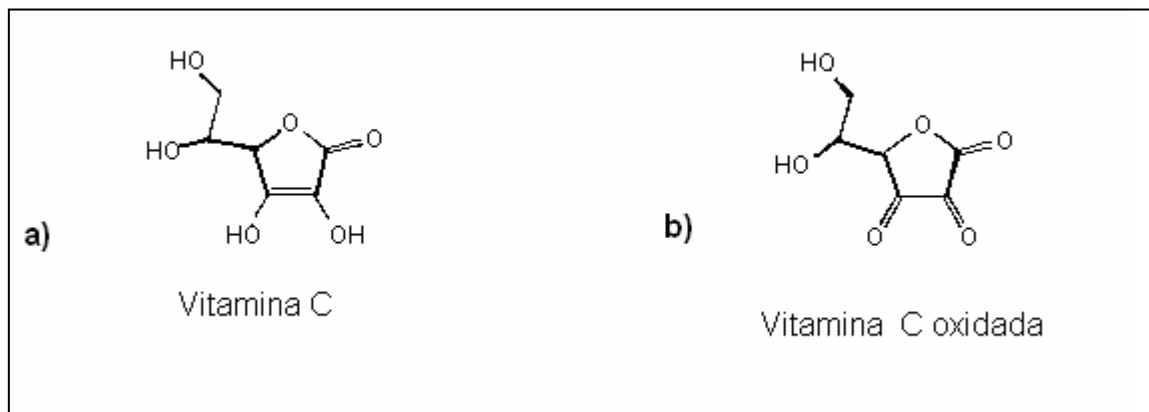


Figura 2. Estructura molecular de la vitamina C (a) y vitamina C oxidada (b)

La VitC es el suplemento nutricional más ampliamente usado en la medicación, y premedicación en todo el mundo. En la actualidad ésta es una de las vitaminas hidrosolubles más importantes y esenciales en nuestra especie, involucrada en la biosíntesis de componentes de la matriz extracelular como los colágenos y la carnitina, que es un transportador pro-catabólico de ácidos grasos en la mitocondria y de ciertos mediadores de la comunicación celular, de expresión nerviosa tales como neurotransmisores y neuropéptidos. Además de las funciones biológicas mencionadas, existe una gran infinidad de reportes científicos que califican a esta vitamina como un inmuno-modulador, protector antiviral gripal, anti-inflamatorio y se discute aún su actividad en el cáncer y sus propiedades anti-oxidantes (Naidu, 2003).

Según García *et al.*, (2006), Chihuailaf *et al.*, (2002) y Krinsky (2001) la VitC es un antioxidante. Esto se debe a que es un donador electrónico, lo que explica que sea un reductor que directamente neutraliza o disminuye el daño ejercido por especies muy reactivas como los RL. Existe aún una gran controversia

¹⁵ Ascorbato: es la vitamina C en estado reducido

sobre la temática de los RL y los antioxidantes como la VitC. Bioquímicamente, el ácido L-ascórbico dona dos de sus electrones adyacentes a un doble enlace entre los carbonos de las posiciones 2 y 3, y esta donación es secuencial, ya que la primera especie molecular generada tras la pérdida de un electrón es un radical libre denominado ácido semi deshidro-L-ascórbico (semi-DHAA) o ascorbil el cual se estabiliza por resonancia. Después de la pérdida de un segundo electrón se forma ácido deshidro ascórbico (DHAA) que posee una vida media del rango de minutos, que depende del pH y la temperatura (García *et al.*, 2006).

La VitC se encuentra en algunos mamíferos bajo la forma de ascorbato distribuido intra y extracelularmente. Reacciona en forma directa con los RL superóxido, hidroxilo y varios hidroperóxidos lipídicos. También actúa sobre el tocoferilo convirtiéndolo en tocoferol (vitamina E). Este proceso transforma el ascorbato en deshidroascorbato (DHA). El retorno a su forma nativa es por acción enzimática o por sustratos celulares tiólicos. A pesar de su manifiesta propiedad antioxidante, el ascorbato puede desempeñarse como un potente pro-oxidante¹⁶ en presencia de altas concentraciones de iones Fe^{+3} y Cu^{+2} (Chihuilaf *et al.*, 2002).

Se han efectuado diferentes estudios para investigar las propiedades antígenotóxicas y genotóxicas de la VitC (Collins, 1999; Odin, 1997; Hartman y Shankel, 1990). Debido a que tiene funciones oxidantes y antioxidantes (Podmore *et al.*, 1998; Bijur *et al.*, 1997). La mayoría de los datos indican que el ácido ascórbico es antimutagénico en pruebas *in vivo* e *in vitro* (Graf *et al.*, 1998) no obstante, en algunos casos esta sustancia actúa como un co-mutágeno. Puede promover la generación de radicales de oxígeno, induciendo intercambios de las cromátidas hermanas en cultivo de células de mamífero (Weitberg, 1987).

La VitC tiene una historia controversial en el tratamiento del cáncer, reportes epidemiológicos indican que dietas ricas en frutas y vegetales protegen generalmente contra algunos tipos de cáncer (Block, 1991) y específicamente

¹⁶ Revisar la reacción de tipo Fenton, explicadas en el apartado: EROs (especies reactivas de oxígeno) y tensión oxidante.

contra cáncer de pulmón (Ocke *et al.*, 1997; Yong *et al.*, 1997). En un estudio realizado por Gregg y Takahashi (1998) se muestra que las altas dosis (400 y 800 mg/kg) de VitC, sola o en combinación con la vitamina E no causan ninguna modulación significativa en las aberraciones cromosómicas (AC) causadas por doxorubicina (DXR quimioterapéutico). En ese trabajo se emplearon tres dosis (200, 400 y 800 mg/kg) y se determinó que las dos dosis más altas de VitC fueron menos eficientes para reducir las AC que la dosis más bajas. La dosis de VitC 200 mg/kg dio como resultado una reducción en el número de AC mientras que la dosis más alta 800 mg/kg+DXR aumentó el número de AC, aunque este incremento no fue estadísticamente significativo. Odin (1997) afirma que en dosis bajas de VitC predomina su rol de atrapar radicales libres, y en altas concentraciones desarrolla sus propiedades genotóxicas. Por otro lado Chen *et al.*, (2005) observaron que la eficacia de la VitC depende del sitio donde se encuentre, ya sea extra o intra-celularmente. Estos autores examinaron el rol del ascorbato intracelular comparándolo con el nivel extracelular para observar si provoca la muerte celular, para esto se usaron el ascorbato y el producto oxidado ácido deshidroascórbico. El ascorbato es transportado al interior de la célula por el sodio, y el ácido deshidroascórbico es transportado al interior de la célula por glucosa e inmediatamente se reduce internamente a ascorbato. En ese estudio observaron que la muerte de linfomas se produjo sólo cuando el ascorbato estaba presente externamente. Mooney *et al.*, (2005) realizaron un estudio para comprobar si las vitaminas antioxidantes como las vitaminas C y E reducen el número de aductos de benzo(a)pireno en el ADN, éstos aductos se producen en ADN en fumadores y son un riesgo potencial de cáncer. Los investigadores descubrieron que las vitaminas evitan daño al ADN y el riesgo potencial de cáncer sólo en mujeres, por medio de un mecanismo aún desconocido puesto que en hombres no hubo una reducción de daños al ADN.

La Ingestión Diaria Recomendada (IDR) de VitC varía según la fuente. La Organización Mundial de la Salud (OMS) la sitúa en 45 mg al día (<http://www.who.int/en/>); la US National Academy of Sciences Institute of Medicine recomienda ingerir 90 mg de VitC diarios para hombres y 75 mg para mujeres (<http://www.yourhealthbase>) y para el Instituto Nacional de Nutrición

"Salvador Zubirán" es de 60 mg, misma que es establecida en las normas **NOM-086-SSA1-1994** y **NOM-035-SSA2-2002** (<http://www.normex.com>). La dosis diaria máxima permitida de VitC en humanos es de 2,000 mg/día (NLM y NIH¹⁷) que corresponde a 26mg/kg calculado para una persona de 75 kg de peso.

¹⁷ National Library of Medicine y National Institutes of Health.

ANTECEDENTES

En el laboratorio de Genética Toxicológica de la FESI, UNAM, se encontró que en la cruce de Bioactivación Elevada (BE) de la prueba de mutación y recombinación somática (SMART por sus siglas en inglés) en ala de *D. melanogaster*, el brócoli de supermercado (BS) reduce la tasa de mutación basal (López-Rocha, 2004). A diferencia de lo anterior en los tratamientos de 4-NQO y el brócoli cultivado orgánicamente (BCO) por separado, no incrementaron significativamente la proporción de clones basales, sin embargo los cotratamientos BCO (25, 50 y 100%)/4-NQO (2.0 mM), presentaron un aumento en las proporciones de clones pequeños (1-2 células) con un claro efecto concentración-respuesta, en la cruce E y disminución en la cruce BE (Gómez-Luna, 2008). Por otro lado, el cotratamiento BS (100%)/4-NQO(2.0 mM) no mostró diferencias significativas con respecto al 4-NQO (2.0 mM), aunque cabe aclarar que en este ensayo el BS resultó genotóxico (Rebollar-Vega, 2008).

Heres *et al.*, (2004) determinaron la genotoxicidad del antiestrógeno citrato de tamoxifen (TAM) y el 4-NQO, debido a que éste último es un cancerígeno que produce aductos similares a los producidos por TAM descubiertos en el hígado de roedor y humano. En este trabajo se llevaron a cabo tratamientos crónicos aplicando 4-NQO (2.5 y 5.0 mM) a larvas de 72 h de las cruces E y BE para SMART en ala. El 4-NQO mostró un efecto genotóxico en la cruce E con un claro resultado dosis-respuesta, lo que se observó con mayor claridad en la cruce BE encontrando actividad recombinogénica significativa y con un alto efecto de bioactivación.

Kaya *et al.*, (2002) estudiaron la capacidad del ácido ascórbico para modular la acción genotóxica del 4-NQO (3.0 mM) en SMART en ala, cruce E de *D. melanogaster*. Se encontró que el mutágeno fue claramente genotóxico y que ninguna de las tres concentraciones de VitC probadas (25, 75 y 250 mM) incrementó o disminuyó significativamente la proporción de clones mutantes.

JUSTIFICACIÓN

En el laboratorio de Genética Toxicológica de la FESI se encontró que el brócoli de supermercado (BS) reduce la tasa de mutación basal en *D. melanogaster*, en la cruza BE (López-Rocha, 2004), no así el brócoli cultivado orgánicamente (BCO) en presencia de mutágenos de efecto conocido. Éste mostró efecto sinérgico con el metil-metano-sulfonato MMS, en ambas cruzas (Vega-Contreras, 2006); sin efecto en presencia del promutágeno uretano, en ambas cruzas (Santos-Cruz, 2006); sinergia con el 4-NQO en la cruza E y reducción de la proporción de manchas con la cruza BE (Gómez-Luna, 2008). En vista de que el brócoli contiene altas concentraciones de VitC y Fe^{2+} , entre otras muchas sustancias, en este trabajo se pretende encontrar elementos que apoyen o desechen la propuesta de que la VitC y el Fe^{2+} interactúan con el 4-NQO causando efecto sinérgico o aditivo aumentando la proporción de las mutaciones en los marcadores de la prueba SMART en el ala de *D. melanogaster* cruza E. Para esto se plantea el siguiente objetivo:

OBJETIVO

Evaluar la interacción de la mezcla VitC/ $FeSO_4$ en diferentes concentraciones de 4-NQO en la cruza E de la prueba SMART en el ala de *D. melanogaster*.

HIPÓTESIS

1. Por la controversia existente con respecto al efecto antioxidante o prooxidante de la vitamina C en presencia de iones metálicos, entonces (a ó b):
 - a) Se espera encontrar efecto mutagénico en el testigo VitC/FeSO₄ debido a la incremento en la producción de EROs actuando como prooxidante.
 - b) Se espera encontrar menor proporción de mutaciones en el testigo VitC/FeSO₄ debido a un efecto antioxidante.
2. Como el 4-NQO es un promutágeno con efecto prooxidante, entonces se espera encontrar mayor efecto mutagénico conforme se aumenta la concentración.
3. Por todo lo anterior se esperaría un efecto modulador, de la mezcla VitC/FeSO₄ ante el 4-NQO, dependiente de la concentración de éste.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Larvas de 72 ± 4 h de *D. melanogaster* (cruza E) fueron expuestas de manera crónica (48h) a los testigos positivos 4-NQO (2.0, 2.5, 3.0, 5.0 mM); los testigos negativos VitC (5.7 mM)/FeSO₄ (0.2mM) y el solvente (Tween 80-Etanol 5%-5%) y los cotratamientos 4-NQO (2.0, 2.5, 3.0 y 5.0mM)+VitC (5.7 mM)/FeSO₄ (0.2mM). Se efectuaron tres réplicas por tratamiento en tres experimentos independientes.

TESTIGOS NEGATIVOS	4-NQO (mM) DISUELTO EN TWEEN 80-ETANOL 5%-5%	COTRATAMIENTOS
1) FeSO ₄ (0.2 mM)/ VitC (5.7 mM) 2) Tween 80-Etanol 5%-5%	3) 2.0 4) 2.5 5) 3.0 6) 5.0	7) 3 + 1 8) 4 + 1 9) 5 + 1 10) 6 + 1

MATERIALES Y MÉTODOS

Químicos

Medio Instantáneo para *Drosophila* (DIM) de Carolina Biological Supply Co. (Burlington, North Carolina, EUA). FeSO_4 (CAS13463-43-9 pureza 99.99%) Sigma, Vitamina C o ácido ascórbico (CAS no. 50-81-7, pureza 99%) Sigma, (St Luis, MO, EUA) disueltos en agua desionizada. 4-NQO (CAS no. 56-57-5 pureza 97%) Sigma, disuelto en Tween-80 (CAS no. 9005-65-6) Sigma y Etanol 100% de pureza, Merck.

Cultivo y propagación de cepas de *D. melanogaster*

Se realizó la propagación y mantenimiento de las líneas *flare*³ (*flr*³/TM, *Bd*^S), y *mwh* (*mwh*/*mwh*) de *D. melanogaster* (Anexo 1) en frascos de vidrio de 250 ml con 5 g de hojuela de papa comercial y 20 ml de solución conservadora [5 ml de tegosept al 12%, etanol (OH), y 5 ml de ácido propiónico, aforados a 1 litro de agua] en una incubadora a 25 °C y humedad relativa de 65 %.

Se aislaron hembras vírgenes de la línea *flare*³ y machos *mwh* para realizar la cruce E de la prueba SMART en ala. Se colocaron en levadura fresca activada con sacarosa (25 g/kg de levadura) durante 8 h, a 25 °C y humedad relativa de 65 %. Posteriormente se retiraron los adultos y tres días después, las larvas de 72 ± 4 h de edad se retiraron del medio lavando la levadura con agua corriente (25 °C), con la ayuda de un colador metálico de malla fina.

Tratamientos para SMART en ala

Larvas de 72 ± 4 h de edad (tercer estadio larval), de la cruce E fueron sometidas a tratamientos crónicos, colocando la misma cantidad de larvas en 0.5 g de DIM con 2 ml de una solución de VitC (5.7mM)/ FeSO_4 (0.2mM)+ 4-NQO (0, 2, 2.5 3, 5 mM) disueltos en Tween 80 al 5% - Etanol al 5% (TW-OH). Se usaron como testigos negativos la mezcla FeSO_4 (0.2 mM)/VitC (5.7 mM), y el solvente (TW-OH). De 7 a 9 días después, los imagos que emergieron se colectaron en frascos viales con alcohol al 70%. Posteriormente se realizaron

preparaciones permanentes, de alas de fenotipo silvestre en solución de Fauré (30 g de goma arábica, 20 ml de glicerol, 50 g de hidrato cloral y 50 ml de agua). Se revisaron las dos superficies de cada ala en un microscopio óptico a 40 x10 aumentos, registrando el número y tipos de manchas o clones de células mutantes presentes, en un total de 55-60 individuos (110-120 alas) por tratamiento.

Análisis estadístico para SMART

Se utilizó el programa para PC SMART (Frei y Würzler, 1988) que evalúa estadísticamente las proporciones de las manchas en las alas mediante la prueba χ^2 para proporciones (Anexo 2). Los resultados indecisos (i) y débiles positivos (w) se analizaron con la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney que considera la variabilidad individual. Según Frei y Würzler (1995) el tamaño óptimo de la muestra es de 55 individuos, para obtener resultados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Se revisaron las alas de 595 individuos. Como se observa en el cuadro 1.a, todas las concentraciones de 4-NQO utilizadas resultaron positivas para todos los tipos de manchas, excepto las gemelas que resultaron no significativas con respecto al testigo solvente. Todos los cotratamientos 4-NQO+VitC/FeSO₄ resultaron positivos para todos los tipos de manchas, excepto en la concentración 5.0 mM de 4-NQO en la que las manchas gemelas resultaron no significativas en comparación con el testigo solvente (Cuadro 1.b). Con respecto al testigo negativo VitC/FeSO₄ resultó ser estadísticamente igual al testigo solvente (Cuadro 1.b).

Se encontró que a mayor concentración de 4-NQO mayor proporción de manchas totales por individuo para todas las clases de clones mutantes, con un claro efecto concentración-respuesta que sigue un comportamiento lineal, con una $r^2= 0.974$ (Gráfica 1). En los cotratamientos 4-NQO+VitC/FeSO₄ no se observó el mismo tipo de respuesta, ya que siguió un comportamiento del tipo polinomial, con una $r^2=0.977$ (Gráfica 1).

En el cotratamiento 4-NQO (2.0 mM)+VitC/FeSO₄ se observó un incremento, estadísticamente significativo, en la proporción para los clones pequeños y sobre todo para los grandes con respecto a su equivalente sin VitC/FeSO₄ (Cuadro 2.a y Gráfica 2, barras rayadas). En los tratamientos 4-NQO (2.5 y 3 mM) con y sin VitC/FeSO₄ no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, aunque es interesante observar que 4-NQO (3 mM) presenta mayor proporción de manchas pequeñas que grandes y en el cotratamiento con VitC/FeSO₄ se presenta mayor proporción de manchas grandes que de pequeñas (Cuadro 2.b-c y Gráfica 2, barras con rombos y cuadrículas, respectivamente). En el caso de 4-NQO (5.0 mM)+VitC/FeSO₄ se presentó una disminución en la proporción de todos los tipos de manchas, que resultó débil positivo en la prueba estadística ji cuadrada para proporciones, pero al analizarlo con la prueba de U de Mann-Whitney resultó no significativo (Cuadro 2.d y Gráfica 2, barras punteadas).

Cuadro 1. Resultados obtenidos en SMART en ala de *D. melanogaster* cruza E, después de tratar crónicamente a larvas de 72 ± 4 h con diferentes concentraciones (2.0, 2.5, 3.0 y 5 mM) de 4-NQO con y sin VitC/FeSO₄.

Sustancia/concetración	Proporción del número de manchas/individuo y el diagnóstico estadístico ¹				
	Número de individuos	Manchas pequeñas (1-2 células)	Manchas grandes (>2 células)	Manchas gemelas	Manchas totales
		m=2	m=5	m=5	m=2

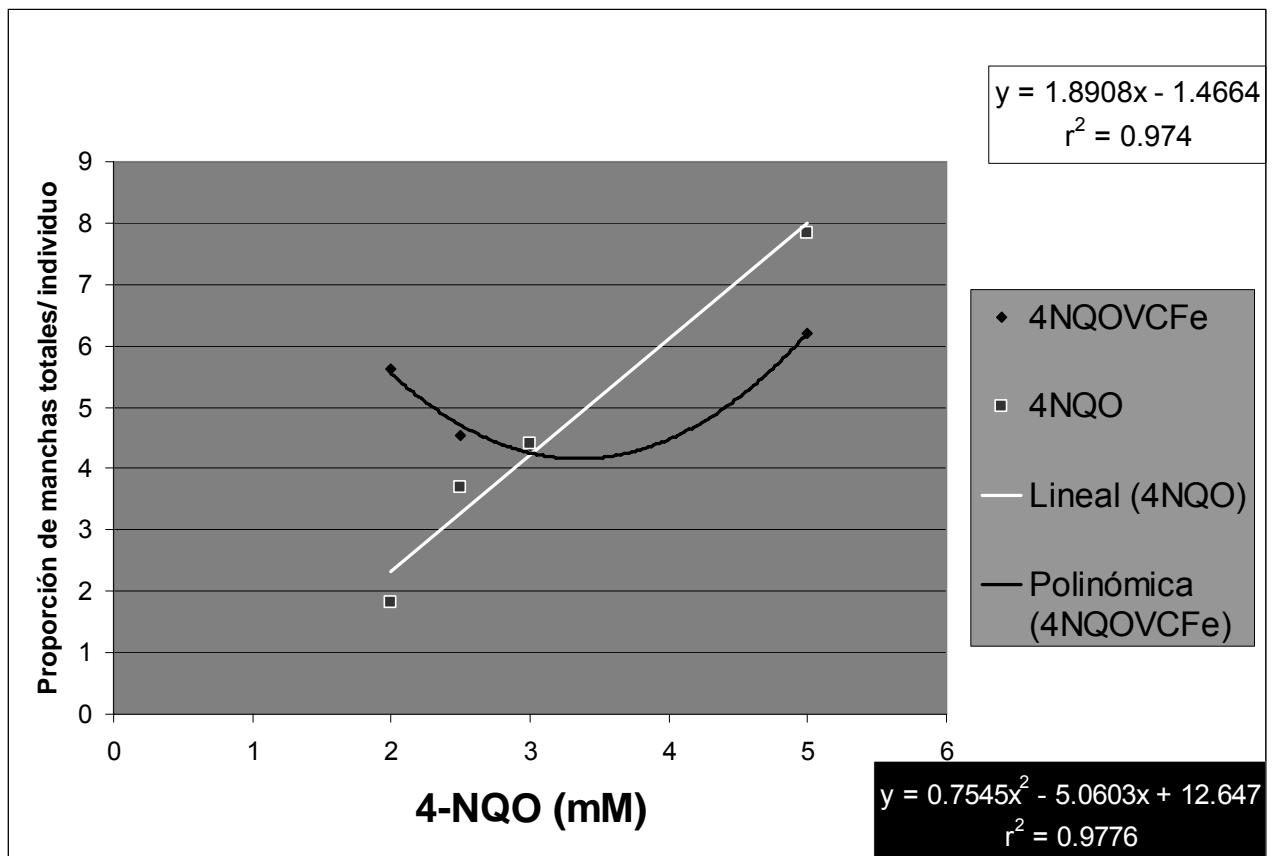
a) Comparación de diferentes concentraciones de 4-NQO

TW-OH	60	0.27 (16)	0.08 (5)	0.00 (0)	0.35 (21)
4-NQO 2.0 mM	60	1.02 (61) +	0.78 (47) +	0.2 (1) i, ns	1.82 (109) +
4-NQO 2.5 mM	60	1.82 (109) +	1.83 (110) +	0.05 (3) i, ns	3.70 (222) +
4-NQO 3.0 mM	60	2.45 (147) +	1.88 (113) +	0.07 (4) i, ns	4.40 (264) +
4-NQO 5.0 mM	60	3.85 (231) +	3.93 (236) +	0.07 (4) i, ns	7.85 (471) +

b) Comparación de diferentes concentraciones de 4-NQO+VitC 5.6mM/ FeSO₄ 0.2 mM.

TW-OH	60	0.27	0.08	0.00	0.35
VitC 5.6mM/FeSO ₄ 0.2mM.	55	0.31 (17) i, ns	0.05 (3) -	0.00 (0) i, ns	0.36 (20) -
4-NQO 2.0mM +VitC /FeSO ₄	60	2.63 (158) +	2.95 (177) +	0.03 (2) i, ns	5.62 (337) +
4-NQO 2.5 mM +VitC 5.6mM/FeSO ₄ 0.2 mM.	60	2.13 (128) +	2.30 (138) +	0.10 (6) +	4.53 (272) +
4-NQO 3.0 mM +VitC 5.6mM/FeSO ₄ 0.2 mM.	60	1.90 (114) +	2.28 (137) +	0.18 (11) +	4.37 (262) +
4-NQO 5.0 mM +VitC 5.6mM/FeSO ₄ 0.2 mM.	60	2.65 (159) +	3.50 (210) +	0.05 (3) i, ns	6.20 (372) +

¹Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei and Würigler (1988, 1995). Dónde + = positivo, - = negativo, i = indeciso, m = factor de multiplicación. Nivel de probabilidad $\alpha=\beta=0.5$ (prueba de estadística de una sola cola). A lado se presenta el diagnóstico estadístico de acuerdo con la prueba de U de Mann-Whitney con modificación para una cola. Donde **ns**= no significativo con probabilidad ≤ 0.05 .



Gráfica 1. Proporciones de manchas totales /individuo después de exponer larvas de la craza E a cotratamientos crónicos con 4-NQO (0, 2, 2.5, 3, 5 mM) con y sin VitC (5.6 mM)/FeSO₄ (0.2 mM).

Cuadro 2. Resultados obtenidos en SMART en ala de *D. melanogaster* cruza E. Comparación de diferentes concentraciones 4-NQO contra 4-NQO+VitC 5.6mM/FeSO₄ 0.2 mM

Sustancia/concetración	Proporción del número de manchas/individuo y el diagnóstico estadístico ¹				
	Número de individuos	Manchas pequeñas (1-2 células)	Manchas grandes (>2 células)	Manchas gemelas	Manchas totales
		m=2	m=5	m=5	M=2

a) comparación de 4-NQO 2.0 mM contra 4-NQO 2.0 mM+VitC 5.67 mM/FeSO₄ 0.2 mM

4-NQO 2.0 mM	60	1.02 (61)	0.78 (47)	0.2 (821)	1.82 (109)
4-NQO 2.0 mM + VitC/FeSO ₄	60	2.63 (158) +	2.95 (177) +	0.03 (2) i, ns	5.62 (337) +

b) comparación de 4-NQO 2.5mM contra 4-NQO 2.5 mM+VitC 5.67 mM/FeSO₄ 0.2 mM

4-NQO 2.5 mM	60	1.82 (109)	1.83 (110)	0.05 (3)	3.70 (222)
4-NQO 2.5 mM + VitC/FeSO ₄	60	2.13 (128) -	2.30 (138) -	0.10 (6) i, ns	4.53 (272) -

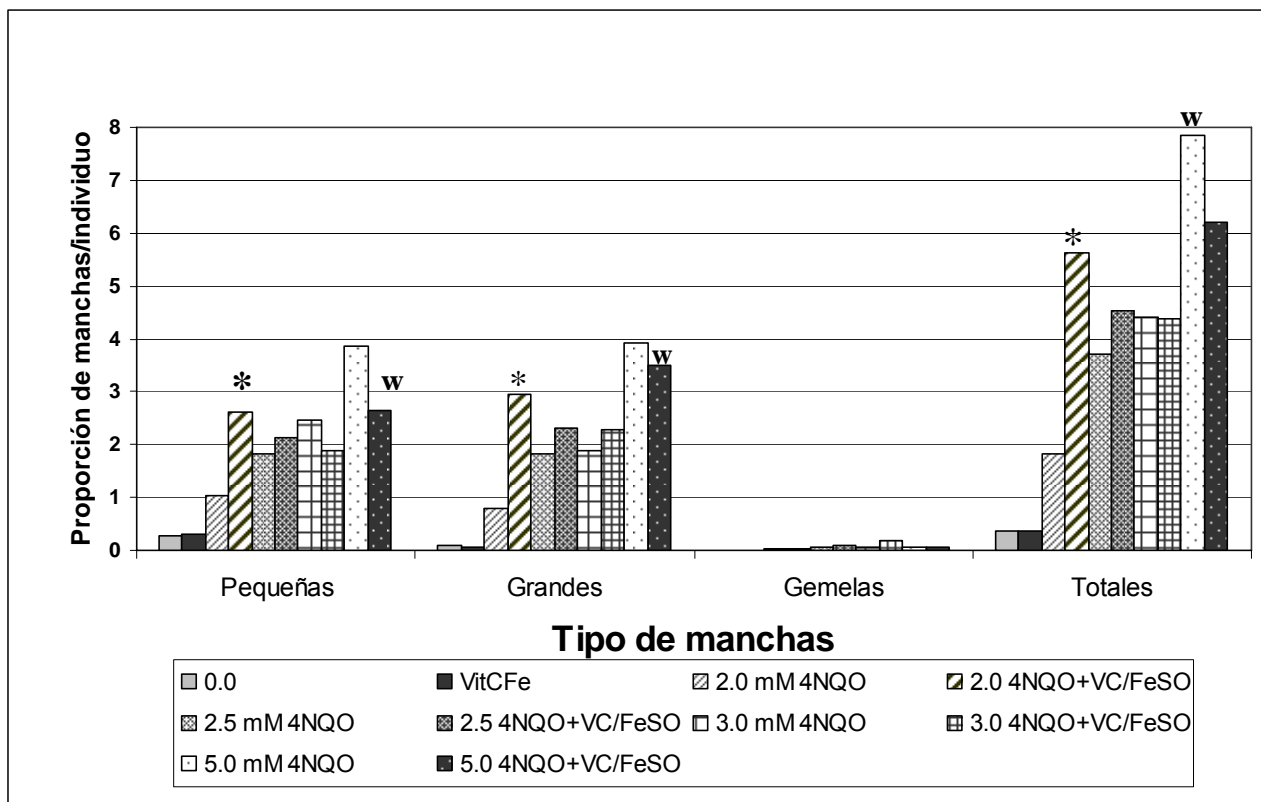
c) comparación de 4-NQO 3.0 mM contra 4-NQO 3.0 mM+VitC 5.67 mM/FeSO₄ 0.2 mM

4-NQO 3.0 mM	60	2.45 (147)	1.88 (113)	0.07 (4)	4.40 (264)
4-NQO 3.0 mM + VitC/FeSO ₄	60	1.90 (114) -	2.28 (137) -	0.18 (11) i, ns	4.37 (262) -

d) comparación de 4-NQO 5.0 mM contra 4-NQO 5.0 mM+VitC 5.67 mM/FeSO₄ 0.2 mM

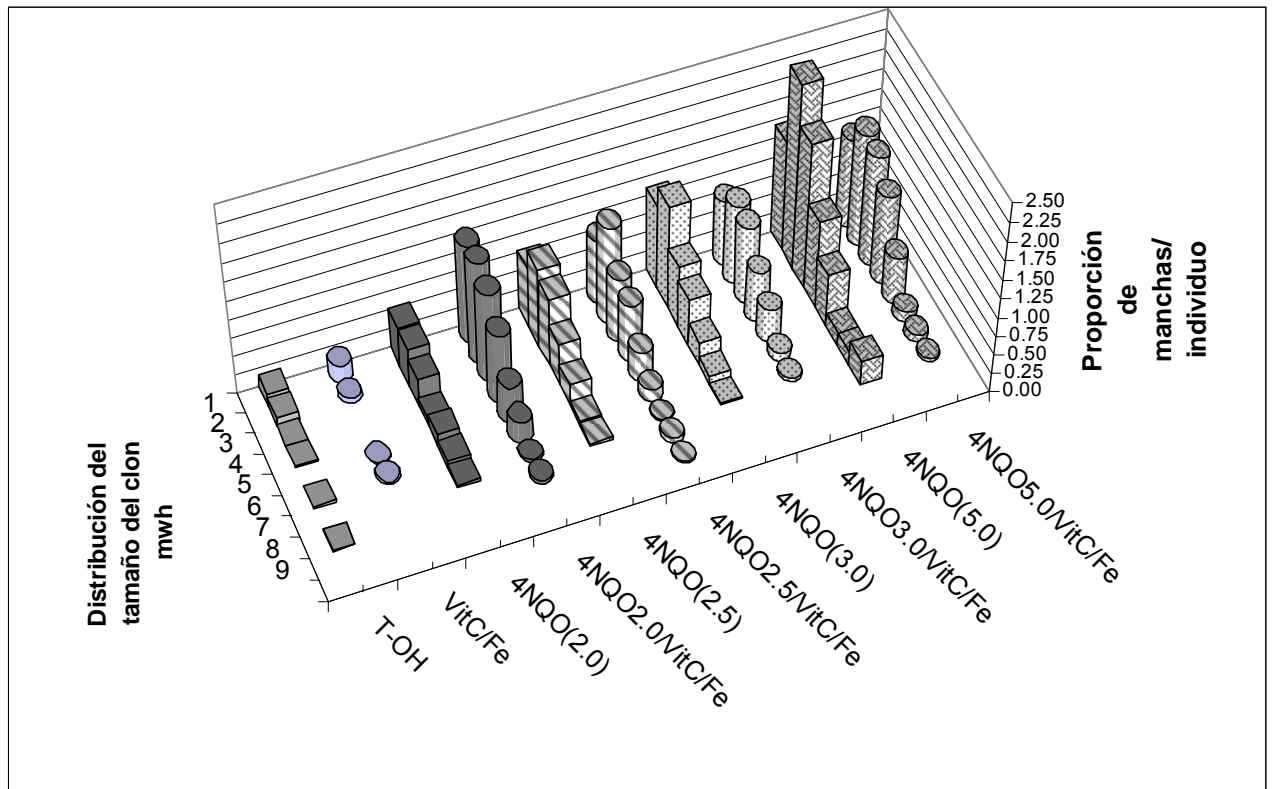
4-NQO 5.0 mM	60	3.85 (231)	3.93 (236)	0.07 (4)	7.85 (471)
4-NQO 5.0 mM + VitC/FeSO ₄	60	2.65 (159) w, ns	3.50 (210) -	0.05 (3) i, ns	6.20 (372) w, ns

¹Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei and Würigler (1988, 1995). Dónde + = positivo, - = negativo, i = indeciso, w = débil positivo, m = factor de multiplicación. Nivel de probabilidad $\alpha=\beta=0.5$ (prueba de estadística de una sola cola). A lado se presenta el diagnóstico estadístico de acuerdo con la prueba de U de Mann-Whitney con modificación para una cola. Donde ns= no significtivo con probabilidad ≤ 0.05 .



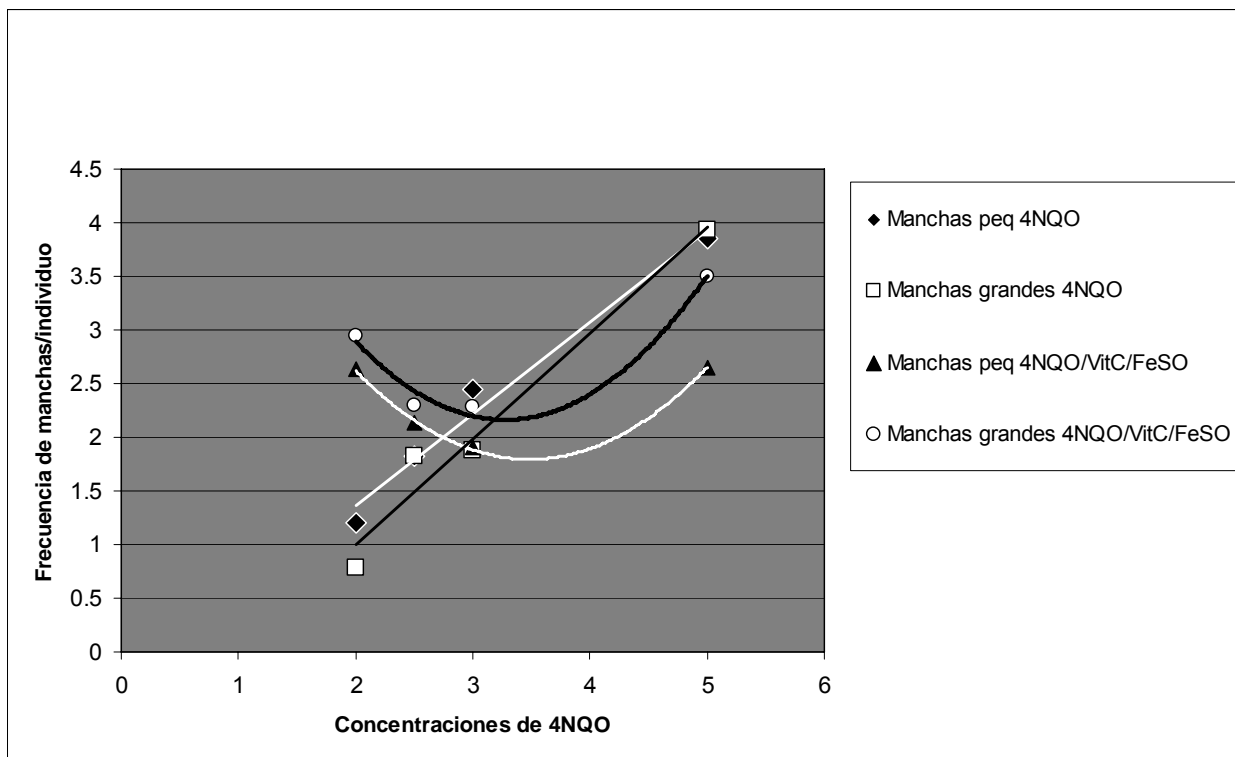
Gráfica 2. Proporciones de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales, por individuo después de exponer larvas de la cruz E en cotratamientos crónicos con 4-NQO (0, 2.0, 2.5, 3, 5.0 mM) con y sin VitC (5.6 mM)/FeSO₄ (0.2 mM).

En el Gráfica 3 se muestra la distribución de las proporciones del tamaño de los clones *mwh* por individuo, para los diferentes tratamientos de 4-NQO con y sin VitC/FeSO₄. Se observan diferencias en los cotratamientos 4-NQO (2.0, 3.0 y 5.0 mM) con y sin VitC/FeSO₄. No así en el cotratamiento 4-NQO (2.5 mM) con respecto a su equivalente sin VitC/FeSO₄.



Gráfica 3. Distribución del tamaño del clon por individuo después de exponer larvas de la cruz E en cotratamientos crónicos con 4-NQO (0, 2, 2.5, 3, 5 mM) con y sin Vit C (5.6 mM)/FeSO₄ (0.2 mM).

El gráfico 4 muestra la comparación de proporciones de manchas grandes y pequeñas encontradas en diferentes concentraciones de 4-NQO contra 4-NQO+VitC/FeSO₄. Se puede observar que en los tratamientos con diferentes concentraciones de 4-NQO siempre hay más manchas pequeñas (1-2 células) con ajuste lineal con una $r^2 = 0.97$, que grandes (más de 3 células) con comportamiento lineal y ($r^2 = 0.96$), excepto en 4-NQO (5.0 mM) donde existe igual proporción. Por otro lado, en los cotratamientos 4-NQO+Vit C/FeSO₄ las manchas grandes mostraron un comportamiento polinomial $r^2 = 0.97$ y se encuentran en mayor proporción que las pequeñas (con ajuste polinomial $r^2 = 0.99$ en todas las concentraciones).



Gráfica 4. Comparación de las proporciones de manchas grandes y pequeñas por individuo después de exponer larvas de la cruz E a cotratamientos crónicos con 4-NQO (0, 2, 2.5, 3, 5 mM) con y sin VitC (5.6 mM)/FeSO₄ (0.2 mM).

DISCUSIÓN

Considerando que las dosis recomendadas para la ingesta diaria de VitC varían, de acuerdo con la fuente, de 45-90 mg (OMS, US National Academy of Sciences Institute of Medicine, Instituto Nacional de Nutrición “Salvador Zubirán” y **NOM-086-SSA1-1994** y **NOM-035-SSA2-2002** (<http://www.normex.com>), y que la dosis diaria máxima permitida de VitC en humanos es de 2 g/día¹ (NLM y NIH <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus>), la concentración de VitC usada en este estudio fue 151 veces mayor que la dosis máxima permitida en humanos. Así mismo, la dosis recomendada de Fe²⁺ es de 8 mg y la dosis máxima permitida es de 45 mg por lo que la concentración usada en este estudio, fue 0.061 mg/g es 100 veces mayor a la dosis permitida en humanos. Estas altas concentraciones fueron calculadas con base en los contenidos de VitC y Fe²⁺ reportados para el BCO² (Ver Anexo 4) usado en experimentos previos del laboratorio de Genética Toxicológica (FESI-UNAM), en los que se encontró efecto sinérgico en cotratamientos con MMS y 4-NQO.

Altas concentraciones de VitC en presencia de iones metálicos tienen efecto prooxidante (Jiménez y Merchant 2003; Chihuailaf *et al.*, 2002), por lo que se podría esperar incremento en la proporción de manchas totales/individuo en el testigo VitC/FeSO₄ debido al aumento en la producción de EROs. Por otro lado se podría esperar efecto antioxidante (García *et al.*, 2006; Chihuailaf *et al.*, 2002; Krinsky 2001) que disminuiría la proporción de manchas con respecto al testigo solvente. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con respecto al testigo TW-OH para la cruz a E y a estas concentraciones.

Se confirmó el efecto mutagénico del 4-NQO dependiente de la concentración, al presentarse un ajuste lineal $r^2 = 0.95$ (Gráfica 1), que coincide con trabajos previos en la prueba de ala de *D. melanogaster*, en donde el 4-NQO ha mostrado un claro resultado concentración respuesta en la cruz a E para todos los tipos de manchas (Heres *et al.* 2004; Kaya *et al.*, 2002; Batiste-Alentorn *et al.*, 1995; Negishi *et al.*, 1994; Hayatsu *et al.*, 1992; Graf *et al.*, 1989).

¹ 26 mg/kg calculado para una persona de 75 kg de peso.

² Datos proporcionados por la empresa MarBran, Guanajuato México.

Todas las concentraciones de 4-NQO resultaron positivas con respecto al testigo solvente, principalmente para manchas pequeñas (1-2 células), esto debido a que el 4-NQO es un promutágeno que requiere ser activado vía CYP450 generando el metabolito 4-acetoxiaminoquinolina-1-óxido (Ac-4-HAQO), que puede ser unido covalentemente al N2 y C8 de la guanina (dGuO-N2-AQO, dGuO-C8-AQO) y/o al N6 de la adenina (dAdO-N6-AQO) provocando aductos, que pueden ser reparados por REN (Mirzayans *et al.*, 1999; Fronza *et al.*, 1992). Los aductos restantes dan como resultado transiciones o transversiones por sí mismas o como consecuencia de los sitios apurínicos (AP) (Fronza *et al.*, 1992), generando pérdida de la heterocigosis para los marcadores de SMART. Las manchas pequeñas reflejan este efecto tardío de los metabolitos sobre el material genético. El 4-NQO también puede considerarse como mutágeno directo ya que otra forma por la cual produce daños al material genético, tales como modificación en las bases y rompimientos de cadenas simples del ADN, es por producir un estado de tensión oxidante intracelular (Li *et al.*, 2005; Ramotar *et al.*, 1998). Esto se ve reflejado en las manchas grandes (> 3 células), que encontramos siempre en menor proporción que las pequeñas, excepto a 5.0 mM donde se encuentran clones pequeños y grandes en igual proporción.

Se esperaba que conforme aumentara la concentración de 4-NQO en los cotratamientos con VitC/FeSO₄ se incrementara o disminuyera la proporción de todos los tipos de manchas/individuo, dependiente de la concentración como ocurrió en los tratamientos sin VitC/FeSO₄. No obstante para los cotratamientos 4-NQO+VitC/FeSO₄, se encontró una relación polinomial ($r^2 = 0.856$) (Gráfica 2), lo que indica un efecto modulador de la mezcla VitC/FeSO₄ al 4-NQO.

El cotratamiento 4-NQO (2.0 mM)+VitC/FeSO₄ tuvo efecto sinérgico mutagénico con respecto al testigo 4-NQO (2.0 mM). Este resultado concuerda con lo observado previamente en nuestro laboratorio con la cruz E, en la que se encontró mayor proporción de manchas totales/individuo en el cotratamiento 4-NQO (2.0 mM)/ BCO que en el testigo 4-NQO (2.0 mM), (Gómez-Luna, 2008). Sin embargo, nuestros resultados no concuerdan con los obtenidos con BS (Rebollar-Vega, 2008) donde aunque se observó un incremento en la proporción

de las manchas pequeñas, éste no fue significativo. Cabe recordar que las concentraciones de la VitC y el FeSO_4 utilizadas en el presente trabajo se calcularon con base en el reporte enviado por la empresa a la que se le compró el BCO, utilizado en el trabajo de Gómez-Luna (Anexo 4), por lo que se podría suponer que las semejanzas en los resultados obtenidos en ambos trabajos se deben a que las concentraciones a las que se expusieron las larvas de *D. melanogaster* son semejantes. Las diferencias que se encontraron con el BS, del cual no se conocen sus condiciones de cultivo y manejo postcosecha y mucho menos la proporción de sus nutrientes, pueden deberse precisamente a que en el manejo postcosecha se haya perdido VitC, entre otros aspectos que se discuten en Rebollar-Vega, 2008.

Por otro lado, la VitC (25, 75 y 250 mM) ha mostrado efecto sinérgico en cotratamientos con otros iones metálicos como el Co^{2+} evaluado por Kaya *et al.*, (2002) quienes usaron CoCl_2 (8 mM) en SMART en ala de *D. melanogaster*, cruza E. El efecto sinérgico podría ser explicado por la interacción del 4-NQO que daña al material genético, por tensión oxidante intracelular (Ramotar *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2005), sumado al efecto pro-oxidante dado por la VitC en altas dosis en presencia de metales de transición (Jiménez y Merchant 2003; Kaya *et al.*, 2002 y Chihuilaf *et al.*, 2002), en este caso, por la presencia del Fe^{2+} Incrementando principalmente la proporción de manchas grandes, indicadoras del efecto directo del mutágeno.

En los co-tratamientos 4-NQO (2.5, 3.0 y 5.0mM)+VitC/ FeSO_4 , aunque se presentan variaciones en las proporciones de todos los tipos de manchas con respecto a sus testigos, éstas no fueron estadísticamente significativas. En el caso de los cotratamientos 4-NQO 2.5 y 3 mM aunque se observa un incremento en el número de manchas éste es ligeramente menor (cuadro 3.a y b Anexo 5) que en el cotratamiento 4-NQO (2.0 mM)+VitC/ FeSO_4 . Al comparar los tratamientos 4-NQO (3.0 y 5.0 mM) con respecto a 4-NQO (3.0 y 5.0 mM)+VitC/ FeSO_4 , se encontraron diferencias significativas entre las distribuciones del tamaño de los clones *mwh* (Fig 6. Anexo 6), aunque no se observaron diferencias significativas entre las proporciones de manchas. En el cotratamiento 4-NQO (5.0 mM)+VitC/ FeSO_4 se observó una disminución débil

positiva (no significativa para U de Mann-Whitney) en la proporción de manchas totales con respecto a su equivalente, observándose una tendencia a disminuir el número de manchas conforme aumenta la concentración del mutágeno. Kaya *et al.*, (2002) probaron el efecto de la VitC (25, 75 y 250 mM) ante el 4-NQO (3.0 mM), sin encontrar efecto modulador. Estos resultados aparentemente coinciden con los nuestros, a pesar de que ellos utilizaron concentraciones más altas de VitC, y no utilizaron Fe^{2+} . Sin embargo, nosotros si encontramos un efecto modulador por parte de la VitC/ FeSO_4 , ya que si se observan ambas series de tratamientos, mientras las proporciones de manchas totales se incrementan al aumentar la concentración de 4-NQO, la de los cotratamientos disminuye y éste parece ser el punto donde se cruzan ambas series, (ver gráfica 2 y cuadro 2), por lo que podríamos decir que sí hay efecto modulador por parte de la VitC/ FeSO_4 .

La disminución en el número de manchas conforme aumenta la concentración del mutágeno podría ser explicado por dos vías: 1. Efecto protector de la VitC/ FeSO_4 , que podría deberse a: i) competencia del antioxidante por sitios nucleofílicos sobre el ADN con un mutágeno nucleofílico; ii) inhibición de la bioactivación del promutágeno por bloqueo de procesos oxidativos o iii) reacción del antioxidante con metabolitos electrofílicos del promutágeno (Goncharova y Kuzhir, 1989) ó 2. Incremento del daño. Nosotros no consideramos que ninguna de las causas expuestas en el punto 1 sea la responsable de esta reducción porque la concentración de VitC/ FeSO_4 fue siempre la misma y en 4-NQO (2.0 mM) se observó sinergia. Suponemos que la mezcla VitC/ FeSO_4 y el 4-NQO actuaron como co-mutágenos, ya que en los cotratamientos se observa un aumento en la proporción de manchas grandes conforme se incrementa la concentración del cancerígeno (Gráficas 3 y 4), lo que indica un incremento del efecto directo del mutágeno. La VitC en presencia de Fe^{2+} participa en la reacción tipo Fenton. Donde el H_2O_2 puede reaccionar con el Fe^{2+} y producir el radical $\cdot\text{OH}$. La acción directa de los RL sobre los discos imagales de las larvas tratadas producen de esta manera mayor proporción de clones grandes que los encontrados en el 4-NQO solo. Este incremento en el daño pudo provocar: i) Inducción de las enzimas de reparación de los daños, vía REB o REN y las enzimas SOD, GPX, y CAT,

(Akbari *et al.*, 2007) y/o: ii) Inducción de muerte celular programada o apoptosis (Han *et al.*, 2007). Ambos eventos traerían como consecuencia una reducción en la proporción de manchas.

En investigaciones recientes realizadas *in vitro*, se ha encontrado que el 4-NQO (0.5-20 μ M) induce apoptosis a diversos tipos celulares, activando el factor de supresión tumoral p53 (Han *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2005). En las concentraciones de 4-NQO usadas en el presente trabajo (2.0-5.0 mM) aumentó la proporción de todos los tipos de manchas conforme se incrementaba la concentración. Diferente a lo ocurrido en el cotratamiento de 4NQO con VitC/FeSO₄. Sería interesante hacer pruebas a concentraciones menores y mayores a las usadas en este experimento ya que esto ayudaría a entender el efecto de la VitC y su interacción con mutágenos. Por ejemplo; para poder determinar si la proporción de manchas totales seguirá disminuyendo en los cotratamientos al aumentar la concentración de 4-NQO.

CONCLUSIONES

- a) Con las concentraciones de la VitC/FeSO₄ usadas en este trabajo, bajo estas condiciones experimentales y con este modelo biológico, podemos decir que encontramos un efecto modulador de la mezcla VitC/FeSO₄ sobre la genotoxicidad del 4-NQO por las siguientes razones:
- i) En los tratamientos con diferentes concentraciones de 4-NQO se encontró un incremento lineal en la frecuencia de manchas, proporcional a la concentración de 4-NQO, y en los cotratamientos se encontró una correlación del tipo polinomial.
 - ii) Se encontró un claro efecto sinérgico en la mezcla 4-NQO (2.0 mM)+VitC/FeSO₄, ya que se observó un incremento estadísticamente significativo en la frecuencia de todos los tipos de manchas en los individuos tratados con 4-NQO (2.0 mM)+ VitC/FeSO₄, con respecto a los testigos tratados con 4-NQO (2.0 mM).
 - iii) Al comparar los tratamientos 4-NQO (3.0 y 5.0 mM) con respecto a 4-NQO (3.0 y 5.0 mM)+VitC/FeSO₄, se encontraron diferencias significativas entre las distribuciones del tamaño de los clones *mwh*, aunque no se observaron diferencias entre las proporciones de manchas.
- b) Se demuestra la importancia de usar diferentes concentraciones de mutágenos en este tipo de ensayos, ya que de haber usado una sola concentración, por ejemplo 4-NQO (2.5 mM), no se hubiera podido observar el efecto modulador de la mezcla VitC/FeSO₄. Ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el cotratamiento de 4-NQO (2.5 mM)+VitC/FeSO₄ con respecto a su testigo 4-NQO (2.5 mM).

REFERENCIAS

- Akbari, M., Otterlei, M., Peña-Díaz J. and Krokan, H.E. (2007). Different organization of base excision repair of uracil in DNA in nuclei and mitochondria and selective upregulation of mitochondrial uracil-DNA glycosylase after oxidative stress. *Neurosci.*, **145**:1201–1212.
- Bailleul, B., Daubersies, P., Galiegue-Zouitina, S. and Loucheux-Lefebvre, M.H. (1989). Molecular basis of 4-nitroquinoline 1-oxide carcinogenesis Jpn. *J. Cancer Res.*, **80**:691-697.
- Batiste-Alentorn, M., Xamena, N., Creus, A. and Marcos, R. (1995). Genotoxic evaluation of ten carcinogens in the *Drosophila* Wing spot test. *Experientia*, **51**:73-76.
- Berlett, B.S. and Stadtman, E.R. (1997). Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, **272**:20313-20316.
- Bijur, G.N., Ariza, M.E., Hitchcock, C.L. and Williams, M.V. (1997). Antimutagenic and promutagenic activity of ascorbic acid during oxidative stress. *Env. Mol. Mut.*, **30**:339-345.
- Block, G. (1991). Epidemiologic evidence regarding vitamin C and cancer. *Am. J. Clin. Nutr.*, **54**:1310-1314.
- Cascales, A.M. (1999). Estrés oxidativo, envejecimiento y enfermedad. Instituto de España. 266 pp.
- Chen, Q., Espey, M.G., Krishna, M.C., Mitchell, J.B., Corpe, C.P., Buettner, G. R., Shacter, E. and Levine, M. (2005). Pharmacologic ascorbic acid concentration selectively kill cancer cells: Action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *PNAS Med. Science.*, **102**:13604-13609.
- Chihuailaf, R.H., Contreras, P.A., Wittwer y F. G. (2002). Patogénesis del estrés oxidativo: consecuencias y evaluación en salud animal. *Vet. Méx.*, **3**:3.

- Chu, Y. F., Sun, J., Wu, X. y Liu, R.H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *J. Agric. And Food Chem.*, **50**:6910-6916.
- Cohen, J., Kristal, R. and Stanford, J. (2000). Fruit and vegetable intakes and prostate cancer. *J. of the Nat. Cancer Inst.*, **9**:61-68.
- Collins, A.R. (1999). Oxidative DNA damage, antioxidants and cancer. *BioEssays*, **21**:238-246.
- Conaway, C. Getahun, S., Liebes, L., Pusateri, D. Topham, D., Botero-Omary, M. and Chung, F. (2000). Disposition of glucosinolates and sulforaphane in humans after ingestion of steamed and fresh broccoli. *Nutr. Cancer.*, **38**:168-178.
- Cranfor, D. R. and Davies, K.J.A. (1994). Adaptative response and oxidative stress. *Env. Health Perspect.*, **102**: 25-28.
- Deby, C. (1991). La bioquímica del oxígeno. *Mundo científico.*, **11**:287-294.
- Food and Nutrition Information Center. National Agricultural Library, United States Department of Agriculture, 4 de septiembre de 2007. Disponible en: http://fnic.nal.usda.gov/nal_display/index.php?info_center=4&tax_level=2&tax_subject=256&topic_id=1342. Fecha de acceso: 20 de febrero de 2008.
- Frei, H. and Würigler, F. E. (1995). Optimal experimental desing and sample size for the statistical evaluation of data from Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila*. *Mutat. Res.*, **334**: 247-258.
- Frei, H. and Würigler, F.E. (1988). Statiscal methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat. Res.*, **203**: 297-308.
- Friedberg, E.C., Walker, G. C. and Siede, W. (1995). DNA repair and mutagenesis. ASM Press, Washinton 698 pp.
- Fronza, G., Campomenosi, P., Iannone, R. and Abbondandolo, A. (1992). The 4-nitroquinoline-1-oxide mutational spectrum in single stranded DNA is

characterized by guanine to pyrimidine transversions. *Nucleic Acids Res.*, **20** (6):1283-1287.

García-Bellido, A. (1972) Some parameters of mitotic recombination in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.*, 115:54-72.

García, G. A., Cobos, C., Rey, C.A., Mejía, O.R., Casariego, C.A., Clavijo, D., García, A., Hernández, S. y Baez, S. A. (2006). Biología, patobiología y bioclínica de la actividad de oxidorreducción de la vitamina C en la especie humana. *Univ. Med.*, **47**:349-363.

Gómez-Luna, J.C. (2008). 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. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México (en prensa).

Goncharova, R.I. and Kuzhir, T.D. (1989). A comparative study of the antimutagenic effects of antioxidants on chemical mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, **214**: 257-265.

Graf, U., Frei, H., Kägi, A., Katz, A.J. and Würigler, F.E. (1989). Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.*, **222**:359-373.

Graf, U., Abraham, S.K., Guzmán-Rincón and Würigler, F.E. (1998). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, **402**: 203-209.

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

- Graf, U., Würigler, F.E., Katz, J.A., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B. and Kale, P.G. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutag.*, **6**:153-188.
- Greggi, A.L.M. and Takahashi, C.S. (1998). Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. *Mutat. Res.*, **419**: 137-143.
- Guzmán-Rincón, J. and Graf, U. (1995). *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change: a Handbook*. Edited by Butterworth, F. M., Corkum, L.D., and Guzmán-Rincón, J. (Eds) Plenum Publishing Corp. pp 169-181.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press New York. Third Edition. 349 p.
- Han, H., Pan, Q., Zhang, B., Li, J., Den, X., Lian, Z. and Li, N. (2007). 4-NQO induces apoptosis via p53-dependent mitochondrial signaling pathway. *Toxicol.*, **230**:151-153.
- Hartman, P.E. and Shankel, D.M. (1990). Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. *Env. Mol. Mutagen.*, **15**:145-182.
- Hayatsu, H., Inada, N., Kafutani, T., Arimoto, S., Negishi, T., Mori, K., Okuda, T. and Sakata, I. (1992). Suppression of genotoxicity of carcinogens by (-)-epigallocatechin gallate. *Prev. Med.*, **21**:370-376.
- Henle, E. S. and Linn, S. (1997). Formation, prevention and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, **272**:19095-19098.
- Heres-Pulido, M. E., Dueñas-García, I., Castañeda-Partida, L., Sánchez-García, A., Contrera-Sousa, M., Durán- Díaz, A. and Graf, U. (2004). Genotoxicity of tamoxifen citrate and 4-nitroquinoline-1-oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutag.*, **19**:187-193.

- Hernández, G. A., Ruíz, L. M. D., Sastre, G. A. y Schwartz, R. S., (2001). Nutrición clínica: implicaciones de la tensión oxidante y de los alimentos funcionales. McGraw-Hill/Interamericana. España 150 p.
- Héron-Milhavet, L., Karas, M., Goldsmith, C.M., Baum, B.J. and LeRoith, D. (2001). Insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor activation signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, **276**:18185-18192.
- Internacional Health. Disponible en: <http://www.yourhealthbase.com/database/a107j.htm>. Fecha de acceso: 21 de febrero de 2008.
- Jimenez, G.L.F. y Merchant, L.H. (2003). Biología celular y molecular. Pearson Educación, México. 853 p.
- Kaya, K., Creus, A., Velázquez, A., Yanikoglu, A. and Marcos, R. (2002). Genotoxicity is modulated by ascorbic acid studies using the wing spot test in *Drosophila*. *Mutat. Res.*, **520**:93-101.
- Krinsky, N.I. (2001). Carotenoids as antioxidants. *Nutr.*, **17**:815-817.
- Li, Y.Y., Wang, L., Li, S., Guo, T., Guo, X., Yang, P., Chen, Y., Wang, L. and Lu, Ch. (2005). p53 protein activates the transcription of human proliferating cell nuclear antigen in response to 4-nitroquinoline N-oxide treatment. *IJBCB*, **37**: 416-426.
- Lohman, P.H., Gentile, J.M., Gentile, G. and Ferguson, L. R. (2001). Antimutagenesis / anticarcinogenesis: screening methods and biomarkers. *Mutat. Res.*, **496**: 1-4.
- London, S., Yuon, J., Chung, F., Gao, Y., Coetzee, A., Ross R.K. and Yu, M.C. (2000). Isothiocyanates, glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms and lung-cancer risk: a prospective study of men in Shanghai, China. *Lancet*, **356**:724-729.
- López-Rocha, L.Z. (2004). Evaluación de la toxicidad y genotoxicidad del brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) con *Drosophila melanogaster*. Tesis de

Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.

Mirzayans, R., Bashir, S., Murray, D. and Paterson, M.C. (1999). 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.*, **20**:941-946.

Mitchell, I. and Combes, R. (1984). Mutation test with the fruit fly *Drosophila melanogaster*. In: Mutagenicity testing: a practical approach. Edited by Venitt, S. and Parry, J.M. (Eds) I. R. L. Press, U. K. p. 149-155.

Mooney, L.A., Madsen, A.M., Tang, D., Orjuela, M.A., Tsai, W., Garduno, E.R., and Perera, F.P. (2005). Antioxidant vitamin supplementation reduces benzo(a)pyrene-DNA adducts and potential cancer risk in female smokers. *Canc. Epidem. Biom. & Prev.*, **14**:237-242.

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

Nakahara, W., Fukuoka, F. and Sugimura T. (1957). Carcinogenic action of 4-nitroquinoline-N-oxide. *Gann.*, **48**:129-137.

National Library of Medicine and the National Institutes of Health, 6 de agosto de 2006. Disponible en:

<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/natural/patient-vitaminc.html>.

Fecha de acceso: 25 de febrero 2008.

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

Norma Oficial Mexicana NOM-035-SSA2-2002, prevención y control de enfermedades en la perimenopausia y postmenopausia de la mujer. Criterios para brindar la atención médica. Fecha de acceso: 25 de febrero de 2008. Disponible en: <http://www.normex>.

com.mx/component/option,com_docman/Itemid,214/task,doc_details/gid,60/

Norma Oficial Mexicana NOM-086-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales. Fecha de acceso: 25 de febrero de 2008. Disponible en: http://www.normex.com.mx/component/option,com_docman/Itemid,214/task,doc_details/gid,99/

Odin, P.A. (1997). Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of anti-mutagenic action. *Mutat. Res.*, **386**:39-67.

Ocke, M.C., Bueno-de-Mesquita, H.B., Feskens, E.J., Van-Staveren, W.A. and Kromhout, D. (1997). Repeated measurements of vegetables, fruits, β -carotene and vitamins C and E in relation to lung cancer. The Zutphen Study. *Am. J. Epidemiol.*, **145**:358-366.

Organización Mundial de la Salud disponible en: <http://www.who.int/en/>, consultado el día 21 de febrero de 2008.

Podmore, I.D., Griffiths, H.R., Herbert, K.E., Mistry, N., Mistry, P. and Lunec, J. (1998). Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature*, **392**:559.

Ramotar, D., Belanger, E., Brodeur, I., Masson, J.Y. and Drobetsky, E.A. (1998). A yeast homologue of the human phosphotyrosyl phosphatase activator PTPA is implicated in protection against oxidative DNA damage induced by the model carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *J. Biol. Chem.*, **273**:21489-21496.

Rebollar-Vega, R. G. (2008). 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. Facultad De Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Ríos, M M. (2003). El estrés oxidativo y el destino celular. *Rev. Química Viva* **2**:1
Consultado el 15 de febrero de 2008, disponible en:
[http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/estres%20oxidativo.
htm](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/estres%20oxidativo.htm).
- Rodríguez-Arnáiz, R. y Ramos, M. P. (1992). *Drosophila* como sistema para detectar agentes genotóxicos. Serie: "Los pequeños manuales", Facultad de Ciencias. UNAM. 50pp.
- Rubin, G.M. (1988). *Drosophila melanogaster* as an experimental organism. *Science*, **240**:1453-1459.
- Russell, P. (1998). Genetics. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Fifth Edition U.S.A., pp.805.
- Santos-Cruz, L.F. (2006). Interacción del brócoli (*Brassica oleracea*, var. Italica) – uretano (carbamato de etilo) en la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en ala de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Biología. Facultad De Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sharpe, C.R., Collet, J-P., Belzile, E., Hanley, J. A. and Boivin, J.F. (2002). The effects of tricyclic antidepressants on breast cancer risk. *Br. J. Cancer*, **86**: 92-97.
- Spanó, M.A., Frei, H., Würigler, F.E. and Graf, U. (2001). Recombinogenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutag.*, **16**:385-394.
- Stanley, J.S. and Benson, A.M. (1988). The conjugation of 4-nitroquinoline 1-oxide, a potent carcinogen by mammalian glutathione transferases. *Biochem. J.*, **256**:303-306.
- Steinberg, D. (1997). Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.*, **272**:20963-20966.

- Verhagen, H., De Vries, A., Nijhoff, W. A., Schouten, A., Van Poppel, G., Peters W. H. and Van den B. H. (1997). Effect of brussels sprouts on oxidative DNA-damage in man. *Cancer. Lett.*, **114**: 127-130.
- Verhoeven D.T.H., Verhagen, H., Goldbohm, R. A., Van den Brandt, P.A. and Van Poppel, G.. (1997). A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chem-Biol. Interac.*, **103**: 79-129.
- Vogel, E.W., Graf, U., Frei, H.J., and Nirvad, M.M. (1999). The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. IARC, *Scient. Publ.*, **146**:427-470.
- Weitberg, A.B. (1987). Antioxidants inhibit the effect of Vitamin C on oxygen radical-induced sister-chromatid exchanges. *Mutat Res.*, **191**:53-56
- Yamamoto, K., Inoue, S. and Kawanishi, S. (1993). Site-specific DNA damage and 8- hydroxydeoxy-guanosine formation by hydroxylamine y 4- hydroxyaminoquinoline 1-oxide in the presence of Cu (II): role of active oxygen species. *Carcinog.*,**14**:1397-1401.
- Yanaida, Y., Kohno, H., Yoshida, K., Hirose, Y., Yamada, Y., Morr, H. and Tanaka, T. (2002). Dietary Silymarin suppresses 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in male F344 rats. *Carcinog.*, **23**:787-794.
- Yang, J.J., McCart, C., Woods, D.J., Terhzaz, S., Greenwood, K.G., Ffrench-Constant, R.H. and Dow, J.A.T. (2007). A *Drosophila* systems approach to xenobiotic metabolism. *Physiol. Genomics*, **30**: 223–231.
- Yong, L.C., Brown, C.C. and Schatzkin, A. (1997). Intake of vitamins E, C and A and risk of lung cancer. The NHANES I epidemiologic follow-up study. First national health and nutrition examination survey. *Am J. Epidemiol.*, **146**:231-243.
- Zhu, C. Y. and Loft, S. (2001). Effects of brussels sprouts extracts on hidrogen peroxide-induced DNA strand breaks in human lymphocytes. *Food. Chem. Toxicol.*, **39**: 1191-1197.

Zhu, C. Y. and Loft, S. (2003). Effect of chemopreventive compounds from *Brassica* vegetables on NAD(P)H:quinone reductase and induction of DNA strand breaks in murine hepa1c1c7 cells. *Food. Chem. Toxicol.*, **41**: 455-462.

ANEXO 1

Drosophila melanogaster

La mosca de la fruta *D. melanogaster* (figura 3) ha sido empleada como organismo para el estudio de la Genética, desde el nacimiento de la disciplina a principios del siglo XX. Las investigaciones iniciales las realizó en 1909 el Dr. Thomas Hunt Morgan en la universidad de Columbia, Nueva York (Rubin, 1988).



Figura 3. Mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*

Desde que T. H. Morgan y sus colaboradores Bridges, Sturtevant y Müller la eligieron como modelo, la mosca del vinagre ha sido un modelo de

investigación importante para los genetistas y biólogos del desarrollo. Al ser un organismo eucariota y pluricelular, este insecto díptero es un excelente modelo en Toxicología Genética. Presenta sólo cuatro pares de cromosomas, claramente distintos unos de otros por su forma y tamaño. Se conoce todo su genoma, y además presenta genes implicados en el metabolismo de xenobióticos y en la reparación de daños al ADN, similares a los de los humanos (Russell, 1998; Friedberg *et al.*, 1995).

Muchos conceptos básicos de la Genética clásica, la molecular y la evolutiva se han obtenido empleando a *D. melanogaster* como organismo en la biología experimental. Además, el cúmulo de conocimientos generados sobre la estructura y función del genoma de *D. melanogaster*, así como de diversos procesos esenciales de la biología, tales como el patrón de la formación del embrión, el desarrollo y funciones de los órganos de los sentidos y del sistema nervioso, han propiciado el que la mosca de la fruta se considere un organismo modelo (Rubin, 1988). La ventaja que presenta, es la de ser un organismo vivo de tamaño pequeño, con un ciclo de vida corto, ya que dura aproximadamente 10 a 12 días con estadios de desarrollo bien definidos al mantenerse a 25°C con una humedad relativa de 60%,. Esta característica permite analizar el efecto de posibles compuestos genotóxicos en dosis crónicas, agudas y fraccionadas de manera controlada.

Su ciclo de vida comienza con la oviposición, 24 horas después eclosionan las larvas que pasan por tres estadios, antes de pasar a prepupa, pupa y adulto (figura 4). Después de que emergen las moscas, los machos son fértiles, en aproximadamente 6 a 8 horas, mientras que las hembras tardan de 10 a 12 horas. Durante la fase de larva la ingestión de alimento es continua, llegando a consumir de tres a cinco veces su peso, incrementándolo de 0.05 a 2.0 mg (Mitchell y Combes, 1984). Lo anterior es relevante para el análisis genético, ya que permite cultivar un gran número de organismos en espacios reducidos y obtener varias generaciones en poco tiempo.

El hecho de que *Drosophila* es un eucarionte, con el cual es posible realizar experimentos con el organismo *in vivo*, constituye una ventaja adicional. Aspectos cruciales como las interacciones con el ambiente o los contactos

célula-célula no pueden entenderse cuando se trabaja con células o tejidos que derivan de organismos multicelulares cultivados *in vitro* (Rodríguez-Arnáiz y Ramos, 1992).

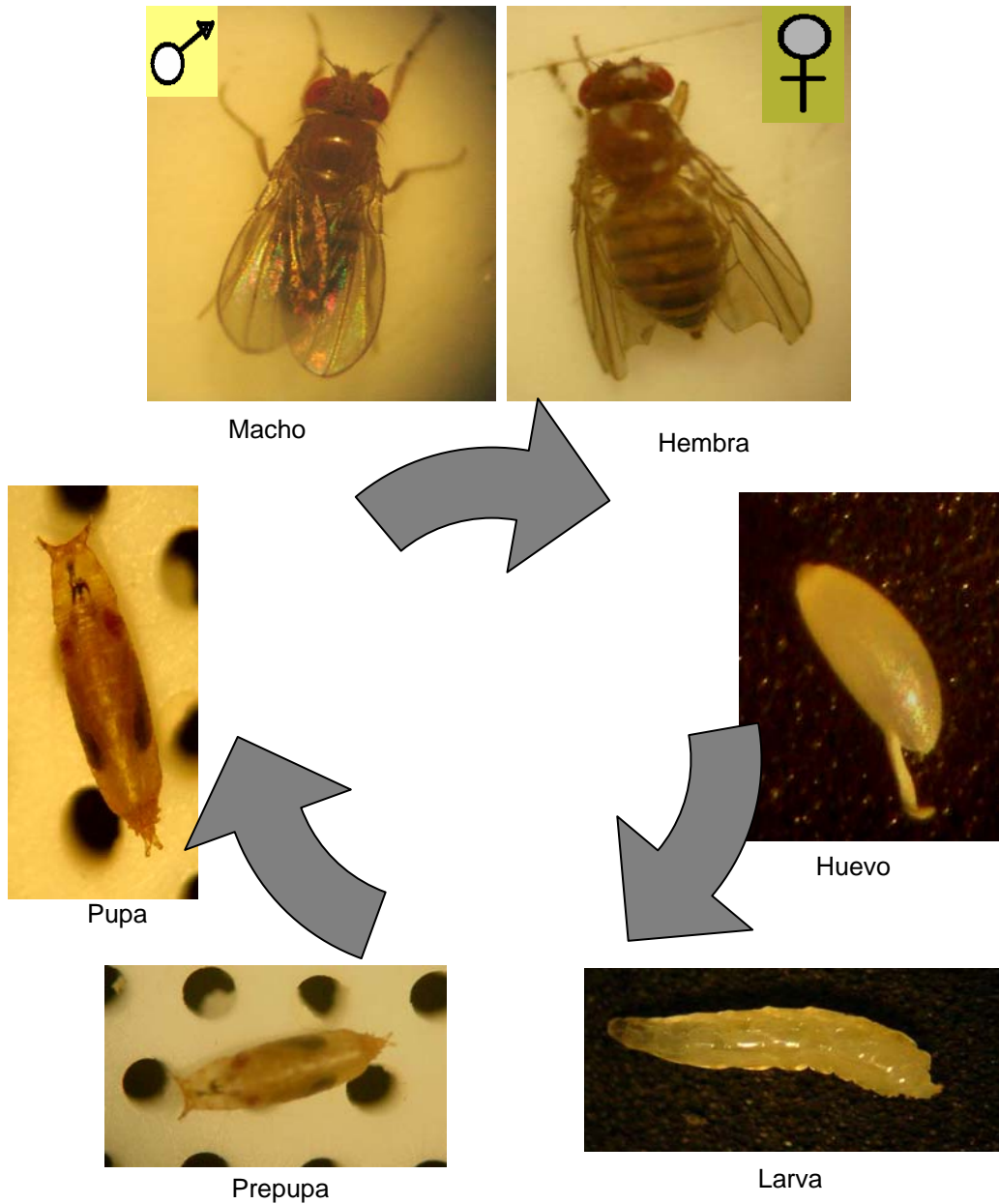


Figura 4. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

Las larvas de *D. melanogaster* tienen dos linajes celulares: larval e imagal (discos imagales), el primero está implicado exclusivamente en el crecimiento y en la fisiología de la larva; el segundo, son bolsas epiteliales que permanecen

indiferenciadas durante el estadio embrionario. En la metamorfosis, los discos se invaginan y diferencian para formar las estructuras particulares del cuerpo del adulto, como antenas, ojos, alterios, genitales externos, etc (Russell, 1998). Desde el punto de vista genético, los discos imagales constituyen un excelente material de estudio. Cada disco aparece como primordio desde el primer estadio larval y consiste en 25 a 50 células. A partir de ese momento, el número de células por cada disco se incrementa por mitosis hasta el final de la fase de larva, en la que llega a tener miles de células por disco. Al final del tercer estadio larvario se inicia el periodo de pupa, en el que parte del material larval degenera, las células indiferenciadas forman tejidos y las estructuras del adulto que se derivan de cada disco imagal. De tal manera de que si ocurriera daño genético en una célula de los discos imagales, éste se expresaría en el adulto como un clon de células mutantes en el tejido correspondiente al disco (Mitchell y Combes, 1984).

ANEXO 2

Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART por sus siglas en inglés)

La recombinación somática fue descubierta en *D. melanogaster* por Stern en 1936 y su inducción por rayos X ha sido empleada para estudiar el desarrollo de los discos imagales en este organismo (García-Bellido, 1972).

Uno de los estudios a corto plazo que ha dado grandes resultados es la SMART, que detecta mutaciones puntuales, aneuploidías y recombinaciones mitóticas provocadas por la exposición a distintas dosis de algún agente químico o físico, utilizando como modelo experimental a *Drosophila melanogaster* (Guzman-Rincon y Graf, 1995).

SMART emplea dos diferentes sistemas fenotípicos: mutaciones en las células de los ojos o en los tricomas de las alas. Ambos sistemas tienen como fundamento, la pérdida de la heterocigosis de genes marcadores en las células de los discos imagales de las larvas. Al exponer a las larvas portadoras de los marcadores, a un agente sospechoso, el daño se expresará como clones o manchas de células mutantes en las alas o en los ojos de los organismos adultos, los clones se pueden observar y contabilizar con ayuda de un microscopio óptico y analizar por medio de métodos estadísticos, comparando el tipo y proporción de manchas en los tejidos correspondientes con la proporción obtenida en organismos no expuestos (Guzmán-Rincón y Graf, 1995). Las alteraciones genéticas pueden ser debidas a recombinación mitótica, mutación somática, rompimientos cromosómicos (deleción) y no disyunción (Graf *et al.*, 1984).

SMART en ala ha demostrado ser eficaz en la detección de agentes genotóxicos al confirmarse con más de 400 agentes físicos y químicos, puros y en mezclas (Guzmán-Rincón y Graf, 1995; Graf *et al.*, 1996; Vogel *et al.*, 1999), y con un estudio epidemiológico sobre el posible riesgo de padecer cáncer de mama y el uso de antidepresivos tricíclicos, en el que se demostró que los

resultados obtenidos con SMART, años antes, concordaban con los de dicho estudio (Sharpe *et al.*, 2002).

La prueba requiere una sola generación para obtener resultados y presenta un sistema de activación (*in vivo*) para la detección de procancerígenos o promutágenos, además de ser uno de los tres sistemas eucarióticos, *in vivo*, que puede medir de manera cuantitativa la recombinación mitótica (Spanó *et al.*, 2001). Tiene la posibilidad de exponer a gran número de células mitóticas, en los discos imagales de las larvas, los cuales dan origen a una cantidad mayor de células en estado adulto, por lo que este ensayo permite analizar aproximadamente 25,000 células por ala, al revisar una sola mosca (Graf *et al.*, 1984).

La prueba SMART utiliza cepas mutantes de *D. melanogaster* con marcadores recesivos: con estas cepas se realiza la cruce E (hembras vírgenes *flare*³ con machos *mwh*). En esta cruce se producen 2 tipos de descendientes: transheterocigotos *mwh +/+ flr*³ con alas de tipo silvestre y heterocigotos *mwh +/TM3, Bd*⁶ con alas de fenotipo *Beaded Serratia* (Graf *et al.*, 1989). *mwh/mwh*: Mutación autosómica recesiva localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 a 0.3 unidades de mapa (3-0.3). En homocigosis total o en mosaicos somáticos tiene la expresión fenotípica de la aparición de tres o más tricomas por célula en lugar de uno, como es el caso del fenotipo silvestre (Graf *et al.*, 1996; 1984). *flr*³/*TM3, Bd*⁶ (*flare*³): Mutación autosómica recesiva ubicada en el cromosoma 3 a 38.8 unidades de mapa (3-38.8). La expresión fenotípica son tricomas malformados y cortos en forma de "flama" o "rosetas de maíz". En condición homocigota es letal por lo que posee el cromosoma balanceador *TM3* con inversiones múltiples que le permiten mantenerse en heterocigosis; este cromosoma balanceador se reconoce indirectamente por la presencia del gen dominante *Bd*⁶ (*Beaded Serratia*), el cual se expresa presentando muescas en el borde de las alas (Graf *et al.*, 1996; 1984).

En el ensayo de las alas, se trata a las larvas transheterocigotas para los marcadores *mwh* y *flr*³, en esta disposición, la recombinación somática entre el centrómero y *flr*³ genera una mancha gemela que consiste en dos clones adyacentes de células que muestran tricomas *flr*³ y *mwh*; la recombinación

somática entre los dos marcadores, así como la delección o mutación, generan clones con un solo tipo de marcador (Graf *et al.*, 1984) (Figura 5).

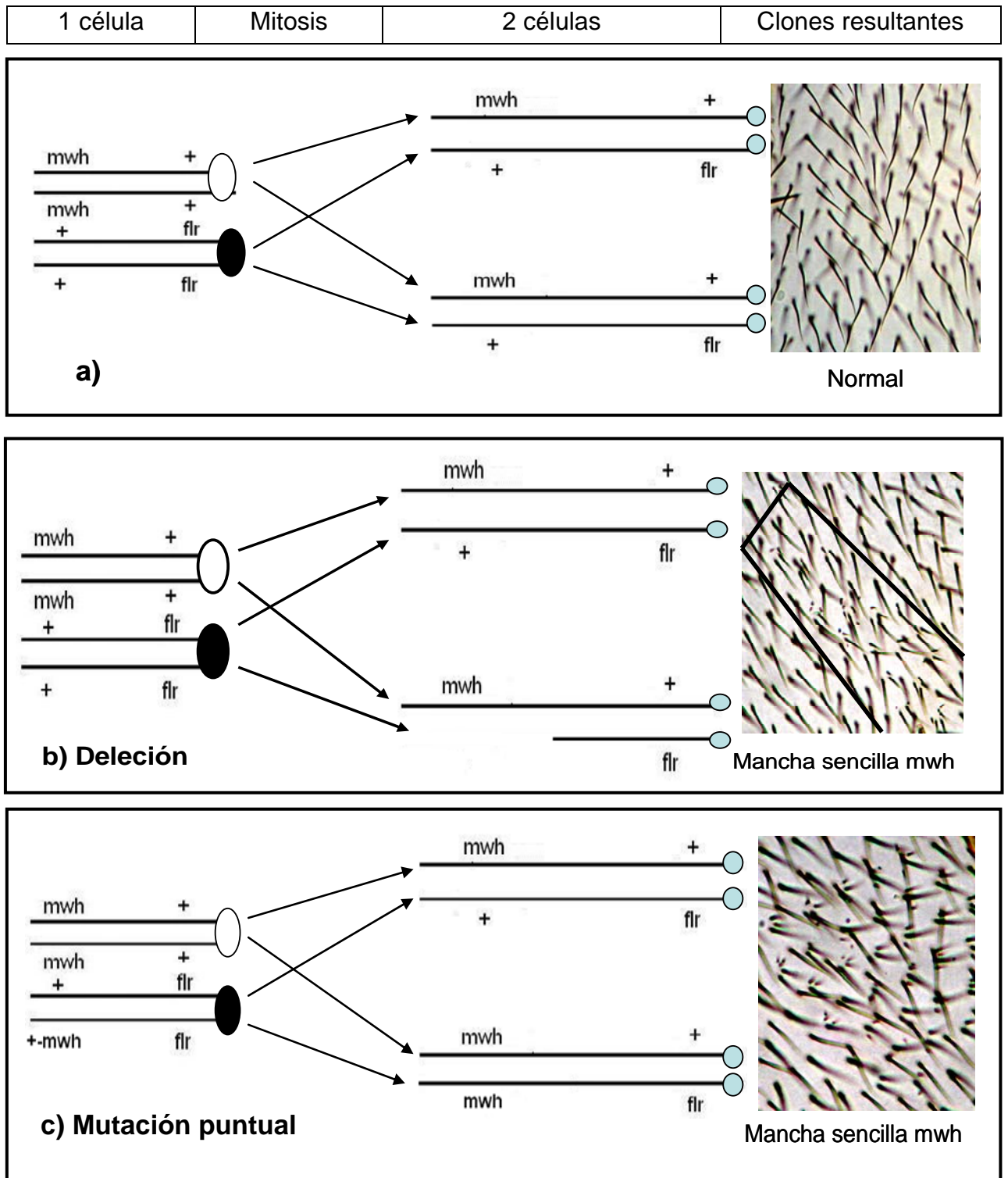


Figura 5. Eventos genéticos que conducen a la pérdida de heterocigosis de los marcadores *flr*³ y *mwh* en alas de *D. melanogaster*.

1 célula	Mitosis	2 células	Clones resultantes
----------	---------	-----------	--------------------

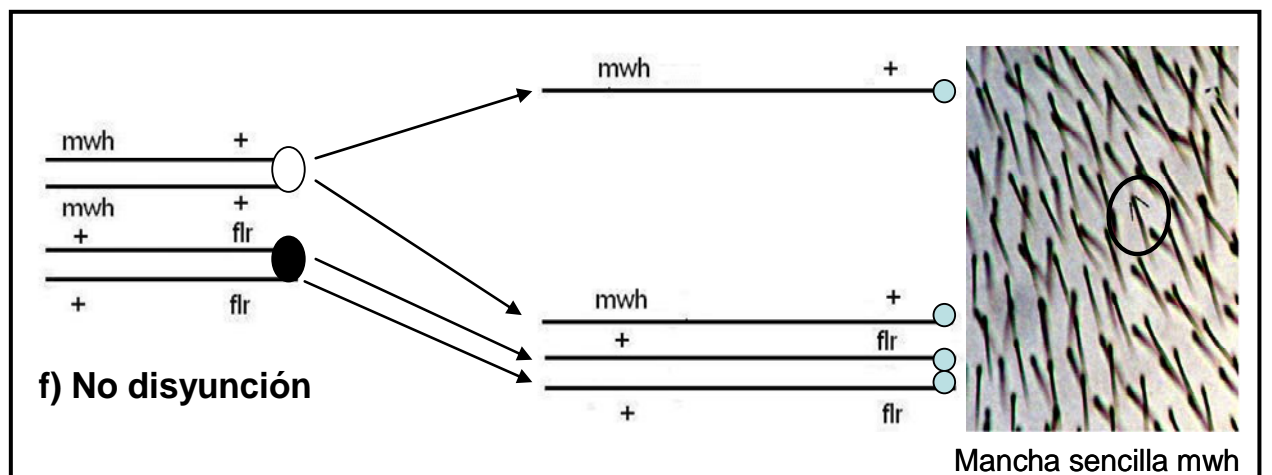
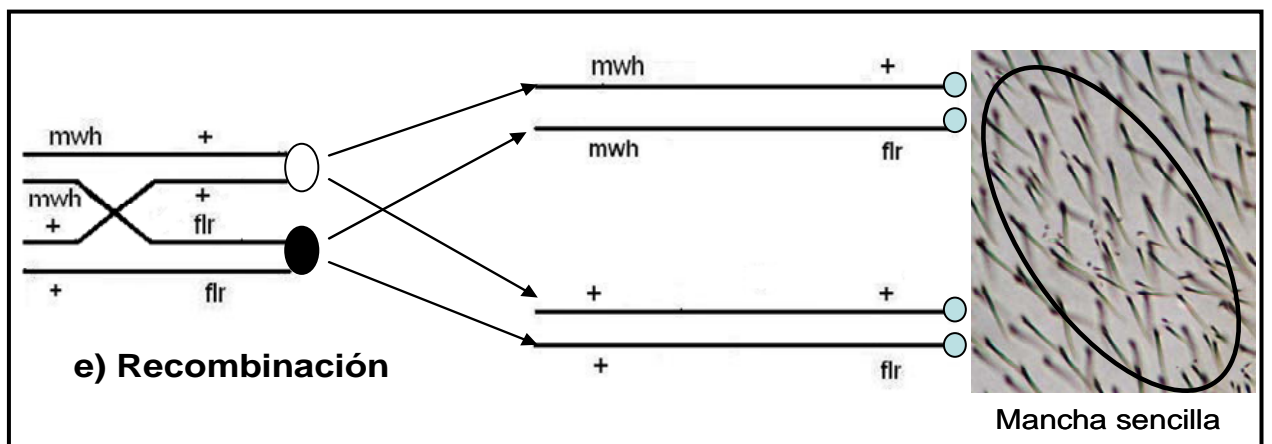
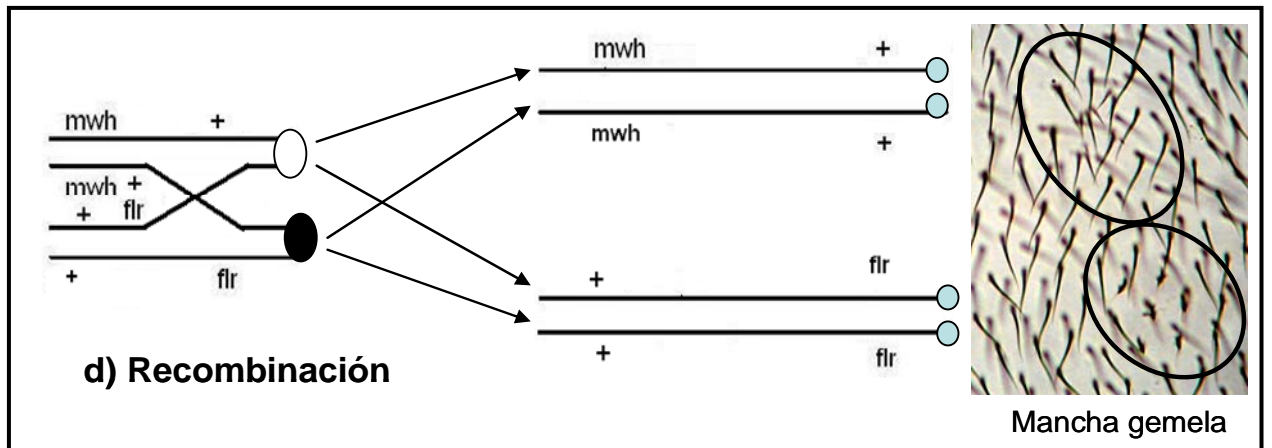


Figura 5 (continuación). Eventos genéticos que conducen a la pérdida de heterocigosis de los marcadores flr^3 y mwh en alas de *D. melanogaster*.

ANEXO 3

Análisis estadístico.

Se analizaron 55-60 individuos por tratamiento (tamaño de muestra óptimo para la prueba) (Frei y Würigler, 1995) con el programa estadístico SMART para PC-versión 2.1 (Frei y Würigler, 1988) que analiza estadísticamente los resultados de SMART en ala detectando las diferencias que puedan existir entre los valores espontáneos entre un testigo y las series de tratamientos experimentales. Este análisis está basado en la prueba no paramétrica de ji^2 para proporciones. En ésta, el efecto genotóxico es diagnosticado porque la proporción de manchas verdadera de los tratamientos es al menos, el doble de la proporción obtenida en los testigos negativos. Esta proporción es $m = 2$ para manchas pequeñas y totales y $m = 5$ para manchas grandes y gemelas.

Con esta prueba se tiene la probabilidad de definir un riesgo genotóxico mínimo inaceptable. Si se puede excluir este riesgo con una significancia estadística, entonces los resultados son negativos. Si la muestra no es lo suficientemente grande, los datos pueden ser insuficientes y el resultado es no concluyente; es decir, que en los casos no concluyentes no se puede excluir la hipótesis nula pero tampoco la alterna. Los resultados con esta prueba tienen cuatro categorías: positivos (+), negativos (-), débiles positivos (w) e indecisos (i). Para evitar estos últimos en al menos 95 % de los casos se recomienda revisar como mínimo 110 alas por tratamiento (Frei y Würigler, 1995).

HIPOTESIS ESTADÍSTICAS

- 1) Nula: la proporción de mutación (inducida + espontánea) de las moscas tratadas no es diferente que la proporción de mutación espontánea del control.
- 2) Alterna: la proporción de mutación (inducida + espontánea) de las moscas tratadas es diferente que la proporción de mutación espontánea del control.

Cada hipótesis fue probada al 5% de significancia. En base a estas hipótesis pueden ser posibles las siguientes decisiones:

- 1) Aceptar ambas hipótesis: resultado indeciso.
- 2) Aceptar la primera hipótesis y rechazar la segunda: resultado negativo.
- 3) Rechazar la primera hipótesis y aceptar la segunda: resultado positivo.
- 4) Rechazar ambas hipótesis: efecto débil (Graf *et al.*, 1984).

A los resultados indecisos y débiles positivos obtenidos con SMART se les realizó la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney, que considera la variabilidad entre los individuos y no requiere una distribución normal de los datos con modificaciones para una cola para datos individuales usando el programa estadístico STAT GRAPHICS versión 6.0.

Esta prueba se usa cuando no se puede definir el riesgo genotóxico mínimo inaceptable basándose en la proporción de las manchas en los testigos negativos; por lo tanto sólo se compararán los datos contra la hipótesis nula. Los resultados son no significativos o significativos. La ausencia de significancia nos dice que uno no puede concluir que el tratamiento produjo daño genotóxico, sin embargo, no se puede eliminar completamente esta posibilidad, por lo tanto es lo mismo que un resultado no concluyente. Los resultados significativos nos permiten concluir con certeza que los resultados son positivos y por lo tanto el efecto genotóxico observado es debido a la sustancia evaluada (Frei y Würigler, 1995).

ANEXO 4

Nutrientes del BCO (datos proporcionados por la empresa MarBran, Guanajuato, Méx.).

Brócoli. NDB No: 11095 Día: 1/3/2006 9:16. Peso (tamaño de porción): 100.00 g

Origen: USDA National Nutrient Database for Standard Reference.

Nutrientes	Valor	U	Nutrientes	Valor	U
Agua	90.72	g	Ác.grasos monoinsaturados totales	0.008	g
Energía	28	Kcal	16:1 indiferenciados	0	g
Energía	117	Kj	18:1 indiferenciados	0.008	g
Proteínas	3.10	g	20:01	0	g
Lipidos totales (grasas)	0.11	g	22:1 indiferenciados	0.008	g
Cenizas	0.71	g	Ác. grasos poliinsaturados totales	0.055	g
Carbohidratos	5.35	g	18:2 indiferenciados	0.013	g
Fibra total en la dieta	3.0	g	18:3 indiferenciados	0.042	g
Azucares totales	1.44	g	18:04	0	g
Calcio, Ca	51	mg	20:4 indiferenciados	0	g
Hierro, Fe	0.61	mg	20:5 n-3	0	g
Magnesio, Mg	20	mg	22:5 n-3	0	g
Fosforo, P	55	mg	22:6 n-3	0	g
Potasio, K	180	mg	Colesterol	0	mg
Sodio, Na	24	mg	Triptofano	0.032	g
Zinc, Zn	0.30	mg	Treonina	0.101	g
Cobre, Cu	0.043	mg	Isoleucina	0.121	g
Manganesio, Mn	0.325	mg	Leucina	0.145	g
Selenio, Se	1.9	mcg	Lisina	0.156	g
Vitamina C total	40.1	mg	Metionina	0.037	g
Vitamina B-1(tiamina)	0.055	mg	Cisteina	0.22	g
Vitamina B-2 (riboflavina)	0.081	mg	Fenilalanina	0.094	g
Vitamina B-3(niacina)	0.458	mg	Tirosina	0.070	g
Ácido pantoténico	0.274	mg	Valina	0.142	g
Vitamina B-6 (piridoxina)	0.130	mg	Arginina	0.161	g
Folato total	30	mcg	Histidina	0.055	g
Ácido fólico	0	mcg	Alanina	0.131	g
Folato alimenticio	30	mcg	Ácido aspártico	0.236	g
Folato DFE	30	mcg	Ácido glutámico	0.417	g
Vitamina B-12 (cobalamina)	0	mcg	Glicina	0.105	g
Vitamina A (retinol)	1118	UI	Prolina	0.127	g
Vitamina A, RAE	56	mcg	Serina	0.111	g
Vitamina E (β-tocoferol)	1.32	mcg	β-caroteno	663	mcg
Vitamina K (filoquinona)	99.5	mg	α-caroteno	15	mcg
Ác. grasos saturados totales	0.018	mcg	β-Criptoxantina	1	mcg
Lutein+Zeaxantina	1498	mcg			

Donde: U es unidad

ANEXO 5

Resultados de SMART y Ji cuadrada para proporciones donde se comparan la distribución de la proporción del tamaño de los clones.

Cuadro 3. Resumen de resultados obtenidos en la prueba SMART en ala de *Drosophila melanogaster* cruza estándar. Comparación de diferentes concentraciones 4-NQO contra 4-NQO+VitC 5.6mM/FeSO₄ 0.2 mM

		Proporción del número de manchas/individuo y el diagnóstico estadístico ¹			
Sustancia/concentración	Número de individuos	Manchas pequeñas (1-2 células)	Manchas grandes (>2 células)	Manchas gemelas	Manchas totales
		m=2	m=5	m=5	M=2

a) comparación de 4-NQO 2.5 mM/VitC/FeSO₄ contra 4-NQO 2.0 mM+VitC 5.67 mM/FeSO₄ 0.2

4-NQO 2.5 mM+VitC/FeSO ₄	60	2.13 (128)	2.30 (138)	0.10 (6)	4.53 (272)
4-NQO 2 mM+VitC/FeSO ₄	60	2.63 (158) -	2.95 (177) w	0.03 (2) -	5.62 (337)-

b) comparación de 4-NQO 2.0 mM/VitC/FeSO₄ contra 4-NQO 3.0 mM+VitC 5.67 mM/FeSO₄ 0.2 mM

4-NQO 3.0 mM+VitC/FeSO ₄	60	1.90 (114)	2.28 (137)	0.18 (11)	4.37 (262)
4-NQO 2.0 mM + VitC/FeSO ₄	60	2.63 (158) w	2.95 (177) w	0.03 (2) -	5.62 (337) w

¹diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei and Würigler (1988, 1995). Dónde += positivo, -= negativo, i= indeciso, W= débil, m= factor de multiplicación. Nivel de probabilidad $\alpha=\beta=0.5$ (prueba de estadística de una sola cola).

Fig. 6. A)

	A	B	C	D	E
1	4NQO(2.0)VitC/FeSO4			Jl	4NQO 2.0
2	78	-18.145	329.241025	3.424421707	96.145
3	80	-13.0295	169.7678703	1.82488211	93.0295
4	71	1.655	2.739025	0.039498522	69.345
5	54	32.56	1060.1536	49.44746269	21.44
6	28	-3.021	9.126441	0.294202024	31.021
7	17	1.4895	2.21861025	0.143039248	15.5105
8	3	-3.1975	10.22400625	1.649698467	6.1975
9	4	0.8845	0.78234025	0.251112261	3.1155
10	335			57.07431703	s
11					
12					
13					
14					
15					
16					

Fig. 6. B)

	A	B	C	D	E
14					
15					
16					
17	4NQO(2.5)VitC/FeSO4				4NQO 2.5
18	51	-6.0836	37.01018896	0.648350646	57.0836
19	77	1.6954	2.87438116	0.038170061	75.3046
20	51	-14.569	212.255761	3.237135857	65.569
21	46	4.7168	22.24820224	0.538916611	41.2832
22	24	3.3584	11.27885056	0.54641358	20.6416
23	10	-47.0836	2216.865389	38.83541663	57.0836
24	7	3.3824	11.44062976	3.162491641	3.6176
26	266			3.923656564	ns
27					
28					
29					
30					

Figura 6. Análisis estadístico (Ji cuadrada para proporciones) donde se comparan las distribuciones de la proporción del tamaño de los clones *mwh* de los cotratamientos 4-NQO (2.0, 2.5, 3.0 y 5.0 mM)+VitC/FeSO₄ con su respectivo testigo. Se observan resultados significativos para las concentraciones 4-NQO (2.0, 3.0 y 5.0) Figuras A), C) y D) respectivamente. **A)** P= 0.05, $\nu = 7$, $t = 14,0671$; **B)** P= 0.05, $\nu = 6$, $t = 12,59$.

Fig. 6. C)

	A	B	C	D	E
27					
28					
29					
30					
31	4NQO(3.0)VitC/FeSO4				4NQO 3.0 mM
32	51	-12.7038	161.3865344	2.533389444	63.7038
33	63	-15.1865	230.6297823	2.949739178	78.1865
34	61	14.6654	215.0739572	4.641757071	46.3346
35	40	3.3289	11.08157521	0.302188241	36.6711
36	26	8.6308	74.49070864	4.288666642	17.3692
37	7	0.2481	0.06155361	0.009116487	6.7519
38	3	1.0924	1.19333776	0.625570224	1.9076
39	251			15.35042729	s
40					
41					
42					

Fig. 6. D)

	A	B	C	D	E
40					
41					
42					
43	4NQO(5.0)VitC/FeSO4				4NQO 5.0 mM
44	70	2.0671	4.27290241	0.062898867	67.9329
45	89	-25.5745	654.0550503	5.70855688	114.5745
46	86	-4.0729	16.58851441	0.184167651	90.0729
47	70	16.2736	264.830057	4.929235105	53.7264
48	37	4.6018	21.17656324	0.653633944	32.3982
49	8	0.1034	0.01069156	0.001353945	7.8966
50	6	5.2251	27.30167001	35.23250743	0.7749
51	3	1.4502	2.10308004	1.357000929	1.5498
52				48.12935475	s
53					
54					
55					
56					

Figura 6 (continuación). Análisis estadístico (Ji cuadrada para proporciones) donde se comparan las distribuciones de la proporción del tamaño de los clones *mwh* de los cotratamientos 4-NQO (2.0, 2.5, 3.0 y 5.0 mM)+VitC/FeSO₄ con su respectivo testigo. Se observan resultados significativos para las concentraciones 4-NQO (2.0, 3.0 y 5.0) Figuras A), C) y D) respectivamente. **C)** P= 0.05, $\nu = 6$, $t = 12,59$ y **D)** P= 0.05, $\nu = 7$, $t = 14,0671$.