



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“Incremento del daño genotóxico del 4-NQO
inducido por pretratamientos con licopeno en
SMART en ala de *Drosophila melanogaster*
(Cruza estándar)”**

**TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGA**

PRESENTA:

JOSELIN DE LA CRUZ NÚÑEZ

DIRECTORA DE TESIS:

M. en C. IRMA ELENA DUEÑAS GARCÍA





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 todos aquellos que confiaron en mí para la realización de esta tesis, especialmente a mi máma MARÍA DE LA LUZ y a mi pápa VALENTIN que a lo largo de mi vida me han enseñado a aprovechar y a valorar cada instante y que han sacrificado gran parte de su vida por sacarme adelante a costa de lo que sea y brindarme todo el amor y apoyo incondicional. Los ADMIRO y AMO papas.

A mis hermanas:

GUADALUPE: que me has alentado co tus sabios consejos para salir adelante y no dejarme vencer, así como por tu fidelidad y tú apoyo. También por que me has enseñado que lo que uno se propone lo puede lograr si se es persistente. TQM hermanita.

GEMA: por que me has brindado todo tu apoyo incondicional, por tu comprensión, fidelidad y por enseñarme a ser fuerte cuando hay que serlo. También les agradezco a ti y a OMAR el que hallan traído a este mundo a ese pequeñito ser que ha llenado a mi vida de bondad, paz y de una inmensa felicidad YOLOTZIN. Los QUIERO MUCHO.

AGRADECIMIENTOS

A **dios** por dejarme llegar hasta donde me encuentro y darme una familia única

A la **vida** por darme esta oportunidad de existir

A mi familia académica:

A la **M. en C. Irma Elena Dueñas** por brindarme su apoyo, sus conocimientos, su comprensión, su paciencia y su cariño incondicional.

A la **M. en C. María Eugenia Heres** por darme su cofianza, sus consejos, su apoyo, sus palabras de aliento y su buen humor.

A la **M. en C. Laura Castañeda** por compartirnos sus conocimientos, sus experiencias profesionales y aventureras.

A **Luis Felipe Santos** por todo su apoyo, su paciencia, su cofianza, sus consejos y por hacer de mi estancia en este laboratorio un ambiente amigable.

A **Andrea, Carmen y Noemí** por su cariño, cofianza y por todos esos momentos de desahogamiento, risas, ocurrencias, de desesperación, de tristezas que compartimos en el laboratorio. Las QUIERO MUCHO hermanitas académicas.

A mis revisores: a la **Dr. Ana María García Bores, Dr. Victor Ramon Moreno Torres y Luis Barbo Hernández Portilla**, por brindarme sus conocimientos y contribuir en la revisión de este trabajo.

A **Victor Esparza** por compartirme sus conocimientos, por su apoyo y por sus sabios consejos.

A mis puerquitas y puerquitos por haber recorrido junto a mí los mejores 5 años de mi vida: **Viridiana**: por todo tu apoyo incondicional, tu sencillez, tus sabios y acertados consejos, tu compañía, tu comprensión, tu paciencia, tu sinceridad y por acudir en los momentos que más te necesite. TQM mi paquetito. **Angelica**: por esos momentos agradables, por tus consejos, tu paciencia, tu bondad, tu compañía, tu apoyo incondicional y por que he aprendido de ti a vivir la vida con calma. TQM angie. **Dalia**: por escucharme, aconsejarme, por tu cofianza, comprensión, tus atenciones y brindarme tu apoyo incondicional. Tambien por que he aprendido de ti a ser paciente. TQM dalia. **Alejandra y Vladimir**: por llenar mi vida en estos años de ocurrencias, risas y críticas constructivas. Los QUIERO MUCHO. **Sergio**: por tu amistad, tu compañía, tu cofianza, tu cariño, tu apoyo incondicional y tu sinceridad. TQM serch.

A mis amigas inseparables **Mariel y Paola** por esos momentos únicos e inolvidables que hemos vivido durante estos siete años, por escucharme y aconsejarme. Las EXTRAÑO y las QUIERO MUCHO.

A mis **abuelos**: por que trajeron al mundo a las personas más importantes de mi vida e hicieron de ellas personas excepcionales.

A mis tios: **Pedro Sánchez, Teresa Martínez, Maricruz Nuñez y Gregorio Talavera** por todo su apoyo y cariño incondicional. Los QUIERO MUCHO.

A mis primos: **Lizbeth, Hugo, Ingrid, Luis** por esos momentos de diversión, su apoyo y por que he aprendido de ustedes a no dejarme caer y salir adelante. Los QUIERO MUCHO.

A la familia **De la Cruz** por su gran cariño que nos han demostrado y por su compañía. Los ADMIRO mucho.

Y a todos aquellos que no mencione pero que han formado parte de mi vida GRACIAS.

"QUE CURIOSO ES EL HOMBRE:

NACER NO PIDE,

VIVIR NO SABE Y MORIR NO QUIERE"

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS	4
ANTIOXIDANTES EXÓGENOS	5
CAROTENOS.....	6
LICOPENO.....	8
ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)	11
DAÑO AL ADN.....	12
DAÑO A LÍPIDOS.....	12
4-NITROQUINOLINA-1-ÓXIDO (4-NQO)	15
PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H₂O₂)	17
METABOLISMO XENOBIÓTICO (MX)	18
ANTECEDENTES	20
JUSTIFICACIÓN	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVO GENERAL	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
QUÍMICOS.....	26
PROPAGACIÓN DE LAS LÍNEAS (FLR ³ Y MWH), REALIZACIÓN DE LA CRUZA ESTÁNDAR (CE) Y COLECTA DE HUEVOS.....	26
PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICAS (SMART).....	27
RESULTADOS	30
TESTIGOS LYCO.....	33
INTERACCIÓN LYCO/4-NQO.....	35
INTERACCIÓN LYCO/H ₂ O ₂	37
DISCUSIÓN	39
TESTIGOS LYCO.....	40
INTERACCIÓN LYCO /4-NQO.....	41
INTERACCIÓN LYCO/H ₂ O ₂	45
CONCLUSIONES	46
REFERENCIAS	47
ANEXO 1	62
<i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	62
PRUEBA SMART EN ALA.....	64
ANEXO 2	69
PRUEBA KOLMOGOROV-SMIRNOV.....	69

ABREVIATURAS

ADN ácido desoxiribonucleico

ACT acetona

ACT-H acetona-hexano

Ac-4HAQO acetoxiaminoquinolina-1-
óxido

A:T adenina: timina

Bd^s beaded serratia

CAT catalasa

CAR carotenoide

CAR-OO[•] radical catotenoide
peroxil

CE cruza estándar

CYP450 citocromo P450

dGuo-N2-AQO 3-
(desoxiguanosina-N2-il)-4-
aminoquinolina 1-óxido

dGuo-C8-AQO N-
(desoxiguanosina-C8-il)-4-
aminoquinolina 1-óxido

dAdo-N6-AQO 3-
(desoxiadenosina-N6-il)-4-
aminoquinolina 1- óxido

G: C guanina: citocina

flr³ flare³

GPx glutatión peroxidasa

GRx glutatión reductasa

GSSG glutatión oxidada

GSH glutatión reducida

GST glutatión-S-transferasa

H₂O₂ peróxido de hidrógeno

IUPAC Unión Internacional de
Química Pura y Aplicada

LYCO Licopeno

MDA malondialdehído

MID medio instantáneo carolina

mwh multiple wing hair

MX metabolismo xenobiótico

MON 4-metil-8-oxo, 2,4, 6-
nonatrial

NADPH nicotidamina adenosin
dinucleótido fosfato

NO[•] óxido nítrico

NO[•]₂ dióxido de nitrógeno

O₃ ozono

¹O₂ oxígeno singulete

O₂^{-•} superóxido

[•]OH radical hidroxilo

ONOO⁻ peroxinitrito

pO₂ presión parcial de oxígeno

ROS especies reactivas de
oxígeno

RH[•] o LH[•] radical

ROO[•] o LOO[•] radical peroxilo

RNS especies reactivas de
nitrógeno

SMART somatic and
recombination test

SOD superóxido dismutasa

SULT sulfotransferasa

TM³ three multiple three

UGT glucoronosiltransferasa

UV ultravioleta

UVA ultravioleta de tipo A

4-HNE hidroxinonenal

4-NQO 4-nitroquinolina-1-
óxido

4HAQO 4-hidroxiaminoquinilina

8OHdG 8-hidroxideoguanosina

4HAQO 4-

hidroxiaminoquinolina

8OHdG 8-hidroxideoguanosina

RESUMEN

El licopeno (LYCO) es un carotenoide destacado por su efecto antioxidante, antimutagénico y pro-apoptótico, ha sido relacionado con la disminución del riesgo de cáncer y el daño oxidativo en el ADN. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de pre-tratamientos con LYCO en la reducción del daño genotóxico producido por el cancerígeno y promutágeno 4-NQO mediante el ensayo del ala de *Drosophila melanogaster* Cruza Estándar (CE). Larvas de 72 ± 4 h fueron pre-tratadas (6 h) con LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μM), acetona 2% v/v /hexano 0.17 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (acetona-hexano) o agua. Posteriormente fueron trasvasadas a los tratamientos: 4-NQO [2.0 mM], acetona (2% v/v), H_2O_2 [20 mM] o agua. Se contó el número de eventos genéticos (manchas) en alas de 55-60 individuos/ tratamiento. Los datos obtenidos se analizaron con el programa SMART para PC; para los resultados indecisos y débiles positivos se utilizó la prueba U de Mann-Whitney-Wilcoxon mientras que para la distribución de clones *mwh* la de Kolmogorov-Smirnov. Contrario a lo esperado el testigo positivo acetona-hexano/ H_2O_2 presentó una modulación en la división celular. Por otra parte el testigo LYCO [1.8 μM]/agua disminuyó la tasa de daño espontánea. El pre-tratamiento con LYCO a las concentraciones de 0.45 y 0.9 μM incrementaron el daño producido por el 4-NQO y únicamente LYCO 0.45 $\mu\text{M}/4\text{-NQO}$ presentó una posible modulación de la división celular, debido a que se observaron diferencias significativas en la distribución del tamaño de los clones *mwh*. En la interacción LYCO/ H_2O_2 sólo LYCO 0.09 $\mu\text{M}/\text{H}_2\text{O}_2$ presentó un efecto modulador en la división celular. Se concluye que los pre-tratamientos con LYCO no redujeron el daño producido por el 4-NQO.

Palabras clave: quimiopreventivo, Licopeno, 4-nitroquinolina-1-óxido, incremento

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una causa muy importante de mortalidad en la especie humana. Según la OMS, para los próximos años el número de defunciones por cáncer puede aumentar en un 50 % llegando a alcanzar cifras de aproximadamente 200,000 defunciones anuales. También señala que una dieta baja en frutas y verduras, el sedentarismo, exposición a agentes químicos, físicos (radiaciones ionizantes y UV) y/o biológicos son las principales causas para desarrollar la enfermedad (INEGI, 2009). La Fundación Mundial de Investigación del Cáncer estimó que del 30 al 40% de los cánceres pudieron haberse prevenido mediante una alimentación balanceada, por lo que se ha propuesto que una ingesta de frutas, verduras y hortalizas es un factor preventivo contra diversos tipos de cáncer (Pineda, 1999; Greenwald *et al.*, 2001) por su alto contenido en micronutrientes y fitoquímicos considerados quimiopreventivos por sus propiedades antioxidantes (Pineda, 1999).

Las sustancias quimiopreventivas son aquellas que poseen la característica de contrarrestar ciertos tipos de daño a biomoléculas mediante diversas actividades como: antioxidantes, moduladores de las fases I y II del metabolismo xenobiótico (MX) y pueden actuar mejorando la comunicación celular o regulando la expresión de genes supresores de tumores. Sin embargo, esta "quimiopreención" puede ser atribuida a que esta sustancia al entrar al organismo genere más daño al ADN y por lo tanto induzca enzimas de reparación, inhibidores del crecimiento celular o induzca las señales de apoptosis. Esto se ha observado en estudios en los que a líneas celulares cancerosas *in vitro* se les administran determinadas dosis de algún agente considerado protector, y el efecto que se observa es una disminución en la sobrevivencia de estas células (Müller *et al.*, 2002; Hwang y Bowen 2005).

La mayoría de estos quimiopreventivos se caracterizan por presentar actividades antioxidantes. La palabra antioxidante es definida como cualquier sustancia que retrasa, impide o elimina el daño oxidativo a moléculas blanco (Halliwell y Gutteridge, 2007). Estas sustancias mantienen el equilibrio pro-oxidante/antioxidante dentro del medio celular, evitando la alteración de biomoléculas, como lípidos, proteínas y ADN (Venereo, 2002). Los antioxidantes pueden ser endógenos o exógenos (provenientes de los alimentos) (Avello y Suwalsky, 2006)

Antioxidantes endógenos

El sistema antioxidante endógeno es llevado a acabo por enzimas y no enzimas. Este sistema de defensa se encuentra ampliamente distribuído en los organismos como en *Drosophila melanogaster* (Anexo 1). Esta especie ha servido de modelo para conocer la importancia de este sistema (Plant, 2003; Halliwell y Gutteridge, 2007).

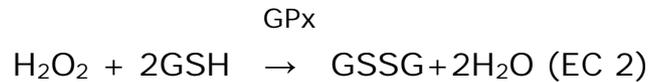
A este sistema lo componen una variedad de defensas enzimáticas y no enzimáticas en las que se encuentran:

- **Superóxido dismutasa (SOD):** familia de enzimas que catalizan la dismutación¹ del superóxido ($O_2^{\bullet-}$) produciendo peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (O_2) (Konigsberg, 2008).
- **Catalasas (CAT):** las CAT son parte del grupo de las peroxidasas y responsables de descomponer al H_2O_2 directamente en O_2 y agua (EC 1) (Konigsberg, 2008).

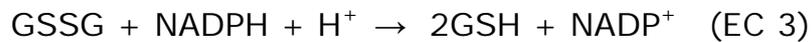


¹ Dismutación: es una reacción en la que un sustrato es oxidado y reducido simultáneamente

- **Glutación peroxidasa (GPx):** la GPx es una enzima selenio dependiente que requiere del glutati3n reducido (GSH) para a su vez reducir los per3xidos (principalmente org3nicos) en agua (EC 2) (Konigsberg, 2008).



- **Glutati3n reductasa (GRx):** es una enzima que cataliza la conversi3n de glutati3n oxidado (GSSG) a su forma reducida (GSH) (EC 3) (Halliwell y Gutteridge, 2007).



- **Glutati3n (GSH):** el GSH es un trip3ptido formado por los amino3cidos glutamato-ciste3na-glicina. Una de sus funciones es la desintoxicaci3n de los xenobi3ticos o de sus metabolitos. Estos compuestos forman conjugados con el GSH mediante la actividad de la GSH-S-transferasa. Esta conjugaci3n da como resultado la remoci3n del compuesto. Su funci3n antioxidante, est3 acoplada a la actividad de la GPx (Konigsberg, 2008).

Antioxidantes ex3genos

Son un grupo de sustancias que se encuentran en los alimentos y que son requeridos para mantener en equilibrio las reacciones redox del metabolismo celular. Dentro de este grupo se encuentran una gran variedad de fitoqu3micos, como los componentes organosulfurados (s3lfidos en cebollas y ajo), los polifenoles (3cido cafeico y resveratrol), indoles (indol-3-carbinol) y los carotenos (β -caroteno, licopeno, lute3na, α -caroteno, β -criptoxantina, astaxantina) (Greenwald *et al.*, 2001).

Carotenos

Los carotenoides son pigmentos terpenoides con 40 átomos de carbono, con dobles o simples enlaces. Estos pigmentos son clasificados en dos grupos: carotenos (en su estructura solo presentan carbono e hidrógeno) y xantofilas (también presentan uno o más oxígenos) (Martínez, 2003; Halliwell y Gutteridge, 2007).

Los carotenoides son moléculas extremadamente lipofílicas, con poca o nula solubilidad en agua. Su principal función es la de absorber luz, esta propiedad se deriva de sus enlaces dobles conjugados, los cuales presentan un cromóforo conformado por siete o más enlaces dobles conjugados, los cuales son capaces de absorber la luz en la región visible, por eso se pueden observar los colores amarillo, naranja y rojo. Este sistema de dobles enlaces hace a la molécula extremadamente sensible a la degradación oxidativa y a la isomerización inducida por luz, calor, ácidos y peróxidos (Sánchez *et al.*, 1999; Begoña *et al.*, 2001). Por esta razón se les ha considerado como antioxidantes, ya que son muy buenos eliminadores de ROS, lo que les confiere su capacidad quimiopreventiva (Nagao *et al.*, 2000; Vitale *et al.*, 2010).

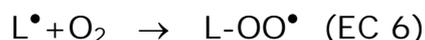
Los carotenoides (CAR en las ecuaciones siguientes) pueden interactuar principalmente con las ROS, por medio de: a) transferencia de electrones (EC 1); b) remoción de iones hidrógeno (EC 2) y c) adición de especies radicalares (EC 3)



Por otro lado diversos factores como la concentración o la presión parcial de oxígeno (pO_2), pueden alterar las actividades antioxidantes de los carotenos. A una alta pO_2 , el carotenoide radical reacciona con el O_2 para generar un carotenoide radical peroxilo ($CAR-OO^\bullet$) (EC 4):



La reacción anterior es un proceso de autooxidación. El carotenoide radical peroxil actúa como pro-oxidante, al promover la peroxidación lipídica (EC 5 y 6) (Britton, 1995; Young *et al.*, 2001)



Los carotenoides son denominados de manera común, conforme a la fuente de la cual se aislaron la primera vez. Sin embargo la IUPAC ha establecido un esquema sistemático para denominar a los carotenoides (Tabla 1) (Sánchez *et al.*, 1999).

Tabla 1. Nombre común y sistemático de los carotenoides

Nombre Común	IUPAC
Astaxantina	3,3'-dihidro-4,4'-diceto- β -caroteno
Antaxantina	4,4'-diceto- β -caroteno
α -caroteno	α -caroteno
β -caroteno	β -caroteno
Licopeno	ι,ι -caroteno
Luteína	β,ϵ -caroteno-3,3'-diol
Zeaxantina	β,β -caroteno-3,3'-diol

Dentro del grupo de los carotenos, se encuentra el LYCO, el cual en diversos estudios se ha mostrado como el carotenoide que se encuentra en mayor concentración en plasma humano y en otros órganos; ha presentado una fuerte actividad quimiopreventiva, y se ha demostrado que presenta una fuerte actividad antioxidante en comparación con otros carotenoides (Miller *et al.*, 1996).

Licopeno

El LYCO (Figura 1) es sintetizado por plantas y microorganismos, absorbe la luz durante la fotosíntesis y los protege del daño oxidativo (Rao y Agarwal 1999). Este carotenoide le da el color característico al jitomate y a otros frutos rojos, no presenta actividad de pro-vitamina A debido a que carece en su estructura del anillo β -ionona, pero presenta una actividad antioxidante dos veces más alta que otros carotenoides, por lo que su presencia en la dieta es de gran interés.

El LYCO es el carotenoide más abundante en el jitomate fresco, ya que abarca del 80 al 90% de los pigmentos presentes (Waliszewski *et al.*, 2010), sus concentraciones varían entre 3.1 mg/100 g y 43.1 mg/100 g (Fernández-Ruiz *et al.*, 2007), esto va a depender de la especie, la madurez y las condiciones naturales.

La fórmula química del LYCO consta de 40 átomos de carbono con 11 dobles enlaces conjugados y dos no conjugados (Rao y Agarwal, 1999), lo que le confiere una potente actividad antioxidante, ya que puede reaccionar con radicales libres y las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*). A partir de la estructura acíclica del LYCO se derivan los demás carotenoides (Waliszewski *et al.*, 2010).

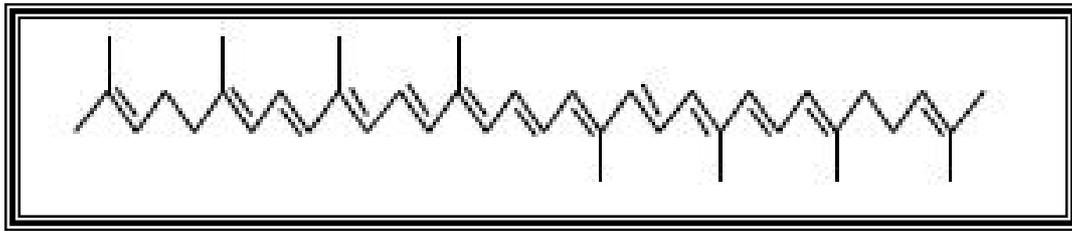


Fig. 1: Estructura del LYCO

El LYCO presenta isomerización en los dobles enlaces en las formas *trans* o *cis* por la luz, la temperatura y reacciones químicas. Todas las formas isoméricas *trans* constituyen el 95% de este caroteno en jitomates frescos mientras que durante el proceso de cocción ocurre la isomerización de *trans* a *cis*. Las formas *cis* son las que se encuentra principalmente en el organismo (50%) ya que son más cortas, fácilmente solubles y transportadas a nivel celular (Britton, 1995; Rao y Agarwal, 1999, 2000; Bramley, 2000; Periago *et al.*, 2001). En relación a sus propiedades químicas derivadas de su estructura, este carotenoide es fácilmente degradable por temperaturas elevadas, exposición a la luz, al oxígeno, valores de pH extremos (Periago *et al.*, 2001).

La absorción del LYCO en el organismo ocurre una vez que se ha consumido, por lo que es incorporado dentro de las micelas de los lípidos de la dieta y absorbido en la mucosa intestinal por difusión pasiva, posteriormente es unido a los quilomicrones y liberado al sistema linfático de donde es trasladado al hígado. El LYCO es transportado por las lipoproteínas del plasma y distribuido a diferentes órganos. En insectos los carotenoides son transportados en las lipoforinas de la hemolinfa, estas son relacionadas con las lipoproteínas en mamíferos (Parker *et al.*, 1996 y Tsuchida *et al.*, 1998 citados en Kiefer *et al.*, 2002). La absorción del LYCO en el humano se encuentra en un rango de 10-30%, con un remanente que es excretado; sin embargo factores biológicos y el estilo de vida

influyen en la absorción de este carotenoide (Waliszewsky *et al.*, 2010). Los principales tejidos de distribución son los testículos (4.34-21.60 nmol/g), la glándula adrenal (1.9-21.60 nmol/g), el hígado (1.28-5.72 nmol/g), el tejido adiposo (0.2-1.3 nmol/g), la próstata (0.8 nmol/g), las glándulas mamarias (0.78 nmol/g), el páncreas (0.7 nmol/g), el pulmón (0.22-0.57 nmol/g), los ovarios (0.3 nmol/g), la piel (0.42 nmol/g) y el estómago (0.2 nmol/g) (Rao y Agarwal, 1999); en el plasma el LYCO se encuentra en un rango de 0.22 a 1.06 nmol/mL, ocupando el 21 y 43% del total de los carotenoides, con una vida media de 2 a 3 días (Stahl *et al.*, 1996).

Las propiedades químicas del LYCO han despertado gran interés a muchos investigadores que han tratado de conocer a fondo el mecanismo de acción por el cual este compuesto presenta efectos quimiopreventivos en enfermedades crónico degenerativas como el cáncer. Estudios epidemiológicos reportan que una ingesta rica en jitomate y productos a base de éste, se relacionan con la disminución del riesgo de algunos tipos de cáncer (Giovannucci *et al.*, 1999; Stahl *et al.*, 1996). Estos efectos se le atribuyen a que el LYCO tiene actividad antioxidante, además es modulador del metabolismo xenobiótico (MX), induce apoptosis, es antiproliferativo (induce arresto de las fases G0/G1 en líneas celulares cancerosas) y mejora la comunicación célula-célula (Bramley, 2000; Rao y Agarwal, 2000; Periago *et al.*, 2001; Heber y Lu, 2002; Fernández-Ruiz *et al.*, 2007; Breemen y Pajkovic, 2008). Sin embargo la mayoría de estos estudios se ha realizado *in vitro* con líneas celulares cancerosas, o con modelos murinos a los que se les induce algún tipo de cáncer, por lo que es de gran interés conocer cómo son sus efectos con otros modelos biológicos y con agentes que inducen daño al ADN.

Especies reactivas de oxígeno (ROS)

En los procesos biológicos, participan moléculas capaces de regular el funcionamiento de los organismos aerobios, una de ellas es el O_2 . La estructura química del O_2 es muy reactiva, ya que presenta dos electrones desapareados, por lo que se le ha denominado como bi-radical; así también se le considera como tóxico a cualquier concentración ya que puede generar algunas especies reactivas a partir de procesos redox o agentes físicos. Estas especies son denominadas ROS, término que incluye a los radicales libres y a otras especies no radicalares. Los radicales libres, son aquellas especies químicas que poseen en su estructura atómica un electrón desapareado en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una gran inestabilidad (Venereo, 2002; Ramos *et al.*, 2006), pueden ser formados por fragmentación homolítica de enlaces covalentes (Konigsberg, 2008)

Dentro del grupo de las ROS se encuentra: el ozono (O_3), el oxígeno singulete (1O_2), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$). El O_2 también forma compuestos con el nitrógeno como el monóxido de nitrógeno u óxido nítrico (NO^{\cdot}), el dióxido de nitrógeno (NO^{\cdot}_2) y el peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), pero a estas tres últimas se les denomina especies reactivas de nitrógeno (RNS del inglés *Reactive Nitrogen Species*) (Konigsberg, 2008).

Las ROS son formadas por el propio organismo, ya que son productos de procesos celulares (Venereo 2002; Miquel y Ramírez-Bosca, 2004; Ramos *et al.*, 2006). Son requeridas para la expresión de genes que participan en el desarrollo embrionario, en procesos de regulación del ciclo celular (Hernández-García *et al.*, 2010) y en otras funciones celulares (Jackson *et al.*, 2002; Venereo 2002; Konigsberg, 2008). Las ROS interaccionan fácilmente con las biomoléculas y cuando hay

una sobreproducción de las ROS en el ambiente celular, debido a factores internos o externos (químicos, físicos o biológicos) se produce daño oxidativo. Este daño si no es reparado, puede acumularse y llevar a la célula principalmente tres eventos: envejecimiento, necrosis, apoptosis o cáncer.

Daño al ADN

El ADN es una de las biomoléculas más afectadas por la sobreproducción de ROS. Los principales daños de ROS con el ADN son: 1) alteración de bases nitrogenadas por la formación de aductos, principalmente en las guaninas y pueden ser generados por $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$, ONOO^- , $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Konigsberg, 2008). Los aductos provocados en bases producen transiciones y transversiones; 2) daño oxidativo a las pentosas que producen rompimientos de cadenas simples o dobles, y sitios abásicos (apurínicos o apirimidínicos) y 3) enlaces cruzados (unión entre bases, azúcares o fosfatos que forman enlaces covalentes entre ellos, o enlaces puente entre los O y N en una cadena o cadenas opuestas del ADN). Cuando no son reparados estos daños, se producen mutaciones puntuales, aberraciones cromosómicas o cromatídicas, micronúcleos y aumento en la frecuencias del intercambio de cromátides hermanas (Heres y Castañeda, 2008).

Daño a lípidos

Las membranas celulares son una bicapa lipídica que están compuestas por fosfolípidos anfipáticos. La fluidez de la membrana se debe a la presencia de las dobles ligaduras de los ácidos grasos poliinsaturados, por lo que son esenciales para la regulación del funcionamiento de la célula, sin embargo, son vulnerables al ataque oxidativo iniciado por algunas ROS y radicales libres (Konigsberg, 2008), que ocasionan la alteración de la fluidez y permeabilidad de

las membranas provocando una pérdida en la estructura y función de estas. Los productos de las reacciones de ROS con los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana promueven a una serie de reacciones en cadena que son llevadas a cabo en un proceso denominado peroxidación lipídica o lipoperoxidación (Konigsberg, 2008).

La peroxidación lipídica presenta tres etapas (Konigsberg, 2008):

Inicio: es desencadenada cuando una ROS le quita un átomo de hidrógeno a un ácido graso, por lo que el residuo de este queda como radical libre (L^\bullet). Este último puede ser estabilizado por un rearrreglo molecular que da lugar a un dieno conjugado, el cual reacciona con el oxígeno molecular y forma el radical peroxilo (LOO^\bullet) que presenta el suficiente poder oxidante para abstraer el hidrógeno de otro ácido graso adjunto, para quedar como lipoperoxido ($LOOH$). Además el $LOOH$ puede inactivar a algunas enzimas debido a que oxida a los residuos de aminoácidos que las forman (Figura 2).

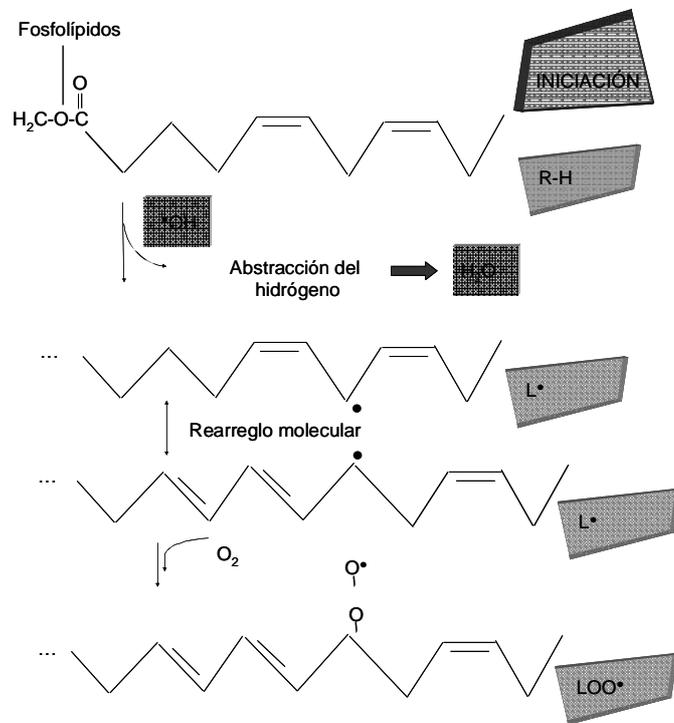


Fig 2. Etapa de inicio de la peroxidación lipídica

Propagación: el radical LOO^\bullet abstraerá un hidrógeno a la molécula del ácido graso poliinsaturado adyacente, por lo que se establecerá un mecanismo en cadena, propagándose la lipoperoxidación en la membrana. Así también, cuando el ROOH se encuentra con un metal de transición, principalmente $\text{Fe}^{+2,+3}$ o Cu^{+2} , puede reaccionar y fraccionarse dando como resultado un nuevo radical peroxilo (LOO^\bullet), el cual puede propagar la peroxidación (Figura 3).

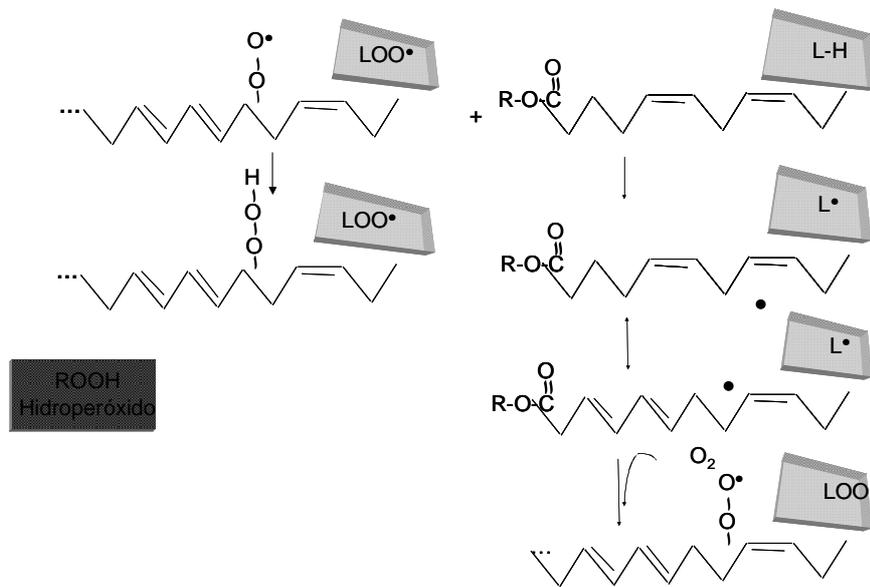


Fig 3. Etapa de propagación de la peroxidación lipídica

Terminación: Cuando el radical LOO^\bullet reacciona con un antioxidante, se forma de nuevo el LOOH terminando la cadena de reacciones. Otro mecanismo es la ciclización, en la cual las moléculas de oxígeno quedan englobadas, sin embargo son muy poco estables (Konigsberg, 2008).

Los productos originados de la peroxidación son principalmente malondialdehído (MDA) (Frankel y Neff, 1983), hexanal y 4-hidroxinonenal (4-HNE) (Konigsberg, 2008).

4-Nitroquinolina-1-óxido (4-NQO)

El 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO) (Figura 4) es un mutágeno que ha sido utilizado como testigo positivo en pruebas de genotoxicidad como en Ensayo de Mutación y Recombinación Somática (por sus siglas en inglés *SMART*) *SMART* en ala de *Drosophila melanogaster* (Anexo 1) (Negishi *et al.*, 1994; Kaya *et al.*, 2002; Heres-Pulido *et al.*, 2004) y en ojo (Gaivão *et al.*, 1999); también se ha encontrado que es un gran inductor de cáncer de lengua en modelos murinos (Tanuma *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2006; Wilkey *et al.*, 2009), se ha probado como agente genotóxico en otros modelos biológicos como *E. coli*, en la línea celular Vero (Nikolić *et al.*, 2011) y en *Salmonella typhimurium* (Melo-Cavalcante *et al.*, 2008).

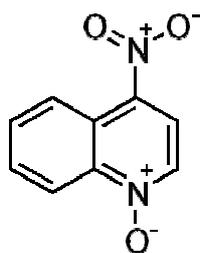


Fig.4. Estructura química del 4-NQO

El 4-NQO presenta efectos similares a los de radiaciones ionizantes y a los de la luz UV, siendo esta última a la que se le asemejan mayormente sus lesiones al ADN y la forma en las que son reparadas (Kondo, 1977). También se ha demostrado que el daño ocasionado por este agente, induce la expresión de la proteína P53 (proteína reguladora de los procesos apoptóticos) mediante un mecanismo semejante a la luz UV (Mirzayans *et al.*, 1999).

La acción mutagénica del 4-NQO comienza con el metabolismo de esta molécula generándose dos metabolitos principales 4-AQO y 4-HAQO (Bailleul *et al.*, 1989). Éste último es el que presenta efectos genotóxicos y carcinógenos. Este metabolismo es llevado a cabo por

una variedad de enzimas, entre las que se encuentra la quinona oxidoreductasa o NAD(P)H-quinolina-óxidoreductasa (DT-diaforasa, NADH- citocromo b5 reductasa) (Bailleul *et al.*, 1989; Kitano, 2000). El 4-HAQO es acetilado, los productos de esta reacción son: acetoxiaminoquinolina-1-óxido (Ac- 4HAQO) y el diacetilado (O, O'-diacetil (diAc-4HAQO) (Bailleul *et al.*, 1989). El metabolito monoacetilado se ha probado en cepas de *E. coli* que causa aductos al ADN, en el C8 (80%) y el N2 (8%) de las guaninas y en el N6 (12%) de las adeninas (Fronza *et al.*, 1992).

Los metabolitos del 4-NQO (principalmente el Ac-4-HAQO) interaccionan con el ADN mediante enlaces covalentes, formando tres tipos de aductos: (i) 3-(desoxiguanosin-N2-il)-4-aminoquinolina 1-óxido (dGuo-N2-AQO); (ii) N-(desoxiguanosin-C8-il)-4-aminoquinolina 1-óxido (dGuo-C8-AQO) en las guaninas (1 y 2); (iii) 3-(desoxiadenosin-N6-il)-4-aminoquinolina 1-óxido (dAdo-N6-AQO) en las adeninas (Bailleul *et al.*, 1989). Kohda *et al.* (1991), propuso un nuevo aducto N⁴-(guanosin-7-il)-4-aminoquinolina 1-óxido. Por la cantidad de aductos generados en las guaninas, el 4-NQO es un mutágeno de sustitución de bases actuando preferentemente sobre los residuos de guanina, ocasionando transversiones de G a pirimidinas y en menor frecuencia transiciones de G a A (Fronza *et al.*, 1992).

Por otra parte, Arima *et al.*, 2006 encontraron que los daños ocasionados por el 4-NQO también se deben a la formación de ROS como el H₂O₂, O₂^{•-} y NO₂⁻ (Blaglow *et al.*, 1977) el cual es originado por la conjugación del 4-NQO con el GSH, sin embargo estos conjugados pueden suprimir la síntesis intracelular del GSH. Estos eventos pueden llevar a la producción de grandes cantidades de 8-OHdG, la cual es una forma de lesión oxidativa (Figura 5), que causa

transversiones de G: C a A: T mutaciones que pueden desencadenar un cáncer (Moriya, 1993).

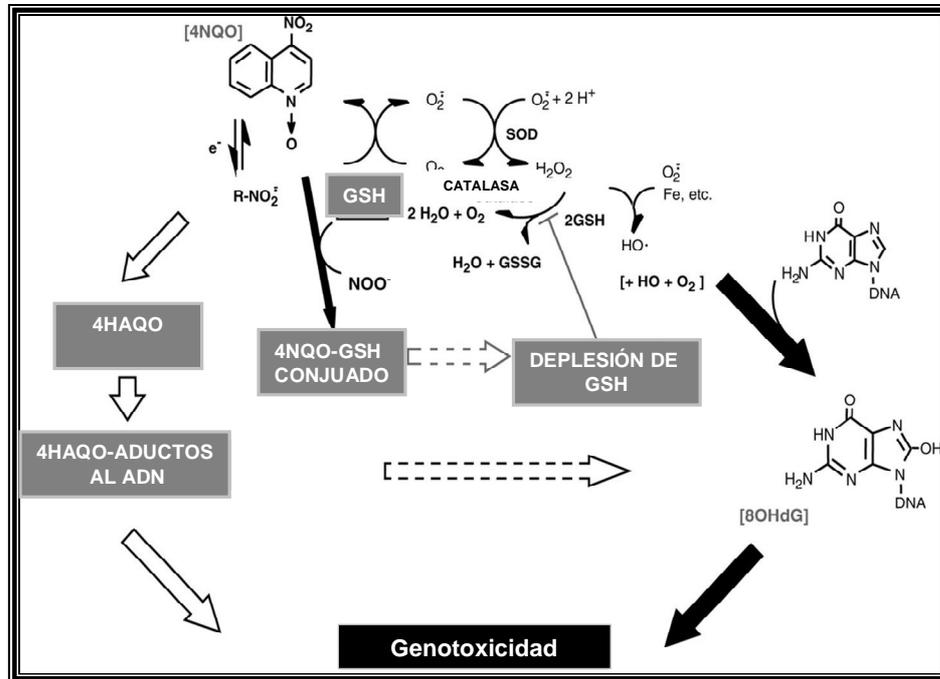


Fig.5. Mecanismo de acción del 4-NQO. Modificado de Arima et al. (2006).

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

En diversos trabajos el H_2O_2 ha presentado efectos citotóxicos, genotóxicos y mutagénicos en líneas celulares como: fibroblastos de pulmón V79 y de linfoma de ratón (L5178Y $tk+/-$) (Moreira et al, 2007; Brink *et al.*, 2009), también altera algunas enzimas antioxidantes (Röhrdanz y Kahl, 1998). Otras investigaciones han reportado efectos apoptóticos en células neuronales (Zuo *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2009), un decremento en la viabilidad celular y un incremento en el estado oxidativo (células astroglial C6) (Spasojević *et al.*, 2009). Por otra parte se ha encontrado que el H_2O_2 es responsable de los efectos pro-oxidantes del ácido ascórbico ya que es un producto de la autooxidación de éste. Cuando el H_2O_2 interactúa con algún metal de transición (comúnmente hierro) se

forma el radical $\cdot\text{OH}$ mediante la reacción Fenton (Duarte *et al.*, 2007); así también este radical se forma con la interacción de H_2O_2 con cobre (Wang *et al.*, 2011).

Metabolismo xenobiótico (MX)

Los organismos vivos estamos expuestos a la acción de numerosos agentes potencialmente tóxicos (físicos, químicos o biológicos) que provocan efectos fisiológicos, bioquímicos, patológicos y en algunos casos genéticos. La mayoría de las sustancias químicas tóxicas presentes en el ambiente son sintetizadas por el humano. Sin embargo, existen cientos de venenos producidos por hongos, plantas y animales que son muy tóxicos para otros seres vivos. La exposición a estos agentes puede presentarse en forma aguda (generalmente accidental y en grandes cantidades) o crónica (exposición continua a bajas dosis que es acumulada y presenta una respuesta tóxica después de mucho tiempo). La forma de ingreso al organismo de dichas sustancias puede ser por inhalación, vía oral o por contacto a través de la piel (Rodríguez-Arnaiz, 2003). Sin embargo, nuestro organismo presenta una maquinaria celular que va ayudar a biotransformar dichos compuestos para poder eliminarlos.

La biotransformación es un proceso que lleva a una conversión metabólica de los compuestos extraños conocidos como xenobióticos presentes en el organismo. Esta transformación se realiza principalmente en las células hepáticas que contienen diversas enzimas y proteínas que reaccionan con los xenobióticos. El proceso de biotransformación consiste en tres Fases: Fase I: el xenobiótico es modificado mediante la incorporación de grupos funcionales (hidroxilo, carboxilo, amino) a su estructura, por lo general esas reacciones vuelven al compuesto más reactivo que la molécula precursora (metabolito) o lo eliminan. Estas reacciones son catalizadas

principalmente por los citocromos P450 (CYP450s) (Figura 6) (Konigsberg, 2008). Fase II: el metabolito reactivo originado en la Fase I es conjugado por algunas enzimas que llevan a cabo procesos de glucoronidación [(UDP-glucoronosiltransferasa (UGT)], sulfatación (sulfotransferasa (SULT)) y por glutatiónización (glutatión-S-transferasa (GST)). Las enzimas anteriormente mencionadas incrementan la hidrosolubilidad de los metabolitos activados. Y por último la Fase III en la cual que se eliminan los conjugados vía orina, sudor y bilis (Plant, 2003).



Fig. 6 Componentes de la Fase I: CYP450 como oxidasa terminal, una reductasa de P450 dependiente de NADPH, que contiene grupos flavin como FAD/FMN (CYP450 reductasa) y el citocromo b5, que puede servir como una fuente de electrones alternativa para los CYP450s (modificado: http://www.uv.es/jcastell/Metabolismo_de_xenobioticos.pdf DONATO)

ANTECEDENTES

Existen una variedad de investigaciones en las cuales se evalúan los mecanismos de acción del LYCO en los cuales ejerce actividades quimiopreventivas como antioxidante (Tabla 2), como modulador de las Fases I y II del MX y de algunas enzimas antioxidantes (Tabla 3), por la producción de metabolitos (Tabla 4), por la inducción de apoptosis (Tabla 6). Sin embargo también existe reportes en los que el LYCO ha presentado efectos pro-oxidantes (Tabla 5).

Tabla 2. Actividades antioxidantes del LYCO

AUTOR	AÑO	OBJETIVO	RESULTADOS
Miller <i>et al.</i>	1996	Evaluaron la capacidad de una variedad de carotenos y xantofilas de eliminar el radical catión ABTS ^{•+} <i>in vitro</i> .	Encontraron que los carotenos son más eficientes en eliminar el radical ABTS ^{•+} que las xantofilas y dentro de los carotenos encontraron que el LYCO es más eficaz en eliminar ese radical.
Shi <i>et al.</i>	2007	Evaluaron la acción antioxidante del LYCO sólo y en combinación con otros antioxidantes presentes en el tomate sobre el efecto producido por el azo-iniciador 2,2'-azobis (2,4-dimetilvaleronitrilo) (AMVN) <i>in vitro</i> .	Encontraron que la interacción LYCO/ vitamina E fue más eficiente atrapando radicales inducidos por el AMVN que el LYCO sólo.
Scolastici <i>et al.</i>	2007	Evaluaron la capacidad del LYCO para prevenir el daño al ADN y el rompimiento o pérdida de cromosomas inducidos por el metil metano sulfonato (MMS), 4NQO y H ₂ O ₂ , utilizando cultivos de células de ovario de hámster chino (por sus siglas en inglés CHO) <i>in vitro</i> .	Obtuvieron que el LYCO presentó efectos quimiopreventivos sobre los efectos producidos por el H ₂ O ₂ . Para el 4-NQO sólo ejerce esta actividad a bajas concentraciones (10 µM) en los pre-tratamientos, La actividad quimiopreventiva del LYCO depende del tipo de protocolo, la dosis y tipo de mutágeno utilizado.
Scolastici <i>et al.</i>	2008	Investigaron la actividad quimiopreventiva del LYCO sobre el daño inducido en el ADN en células de hepatoma HepG2 por un mutágeno directo (H ₂ O ₂) y uno indirecto (n-nitrosodietilamina (DEN)) mediante los ensayos de micronúcleos (MN) y cometa <i>in vitro</i> .	El LYCO redujo la genotoxicidad del H ₂ O ₂ y DEN. Ellos sugieren que la reducción de la genotoxicidad del promutágeno DEN se debe a que el LYCO puede modular el metabolismo de este.

Rios <i>et al.</i>	2009	Evaluaron el efecto modulador de los carotenos bixina y LYCO, ante la producción de ROS generadas por el cisplatino en ADN humano en un modelo experimental libre de células <i>in vitro</i>	Los resultados que obtuvieron fueron que a la concentración de 100 μM el LYCO y la bixina inhibieron la generación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ al 90% y 82% y la generación total de ROS al 44% y 42% respectivamente.
Srinivasan <i>et al.</i>	2009	Valoraron el efecto del LYCO ante la inducción del daño al ADN por radiación γ en linfocitos humanos cultivados <i>in vitro</i> .	Obtuvieron que los pre-tratamientos con LYCO redujeron el número de MN y aberraciones dicéntricas (DC) y elevaron la actividad de SOD, CAT, GPx y GSH en los linfocitos.

Tabla 3. Modulación de enzimas metabolizadoras de xenobióticos y enzimas antioxidantes

Autor	Año	Objetivo	Resultados
Breinholt <i>et al.</i>	2000	Investigaron el efecto modulador del LYCO en la fracción microsomal de células de hígado y colon de ratas (hembras) alimentadas con la amina heterocíclica 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b] piridina (PhIP) <i>in vivo</i> .	El LYCO indujo las enzimas antioxidantes GRx GPx y de la Fase II a la glucuronosiltransferasa (UGT). Moduló las enzimas de Fase I, (CYP1A y 3A4). El LYCO no redujo la formación de aductos por PhIP y no protegió contra la peroxidación lipídica, debido a la pobre absorción de este pigmento en ratas.
Tang <i>et al.</i>	2007	Evaluaron la modulación de un extracto de LYCO (10%) contra los efectos tóxicos y la activación metabólica de la aflatoxina AFB1 en ratas de la cepa F344 <i>in vivo</i> .	Obtuvieron que los pre-tratamientos con LYCO bloquearon el metabolismo de la Fase I de AFB1 e indujeron su eliminación por Fase II, sugiriendo una gran inducción de GST. Por otra parte no encontraron una reducción en los niveles de 8-OHdG, marcador del daño oxidativo al ADN.
Wang y Leung	2010	Valoraron la regulación que presenta el LYCO sobre las enzimas de las Fase I y II por la inducción de dimetilbencil α -antraceno (DMBA) en células de pecho (MCF-7) <i>in vitro</i> .	Encontraron que el LYCO disminuye la actividad de EROD (un indicador de CYP1A1 y 1B1) e induce la UGT.

Tabla 4. Metabolitos del LYCO

AUTOR	AÑO	OBJETIVO	RESULTADOS
Khachik <i>et al.</i>	1995	Realizaron una revisión acerca de los metabolitos del LYCO	Alguno de los metabolitos que reportan son: el 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrolipopeno (en jitomate y suero humano), licopeno 5,6 epóxido (en jitomate), el cual puede ser un intermediario en la formación de 5,6 dihidroxi-5,6-dihidrolipopeno.
dos Anjos <i>et al.</i>	2004	Investigaron el metabolismo del LYCO en mucosa intestinal y en presencia de lipogenasa <i>in vitro</i> .	Encontraron dos tipos de productos: los de la escisión del LYCO (3,4-dihidro, 5, 6-dihidro-15,15'-apolicopenal) y los de su oxidación (licopeno 5,6, 5',6' di-epóxido, licopeno 5,8-furanóxido, licopeno 5-8 epóxido).

Tabla 5. Efectos pro-oxidantes del LYCO

AUTOR	AÑO	OBJETIVO	RESULTADOS
Yeh y Hu	2000	Investigaron los efectos antioxidante y pro-oxidante del LYCO en comparación con el β -caroteno en células de fibroblastos humanos (Hs68) bajo estrés oxidativo inducido por: AMVN, 2,29-azobis[2-amidinopropane]dihidroclorido (AAPH) y nitrilotriacetato férrico (Fe/NTA).	Reportan que el β -caroteno y LYCO <i>per se</i> incrementaron la formación de cometas y no modularon el daño inducido por Fe/NTA, AAPH o AMVN
Young <i>et al.</i> y Lowe <i>et al.</i>	2001 y 2003	En sus revisiones proponen algunos factores que pueden intervenir en los efectos antioxidantes y pro-oxidantes del LYCO y otros carotenoides.	Proponen los siguientes factores: 1) formación de metabolitos; 2) la estructura; 3) Localización o sitio de acción; 4) interacción con otros antioxidantes; 5) concentración y 6) concentración de la pO_2
Yeh <i>et al.</i>	2005	Examinaron en células de fibroblastos de ratón (C3H) si diferentes concentraciones de LYCO inhibían los daños inducidos por la luz ultravioleta de tipo A (UVA) y midieron la expresión de la hemo oxigenasa-1 (HO-1) indicadora de estrés oxidativo.	El LYCO (10 μ M) incrementó el daño al ADN y la expresión de HO-1 cuando las células fueron irradiadas y cuando este fue irradiado LYCO.
McNulty <i>et al.</i>	2007	Examinaron la interacción con la membrana liposomal de los carotenos: astaxantina, zeaxantina, luteína, β -caroteno, LYCO <i>In vitro</i>	El LYCO y β -caroteno perturbaron la estructura de la membrana y aumentaron la peroxidación lipídica

Tabla 6. Inducción de apoptosis e inhibición del crecimiento celular

AUTOR	AÑO	OBJETIVO	RESULTADOS
Zhang <i>et al.</i>	2003	Realizaron un estudio para identificar productos de la autooxidación del LYCO y evaluaron su actividad para inducir apoptosis en células HL-60	Encontraron un producto de la autooxidación del LYCO: 4-metil-8-oxo, 2,4, 6-nonatrial (MON), el cual induce apoptosis mediante la reducción de la tasa de las proteínas antiapoptóticas y la activación de la caspasa 8 y 9. Los autores sugieren que su actividad proapoptótica de este metabolito es semejante al 4HNE
Hwang y Bowen	2005	Caracterizaron los efectos antioxidantes y pro-oxidantes de un extracto de tomate-hexano (TP) y LYCO solubilizado en agua a diferentes concentraciones usando una línea celular de cáncer de próstata LNCaP	El LYCO y el extracto TP-hexano inhibieron el crecimiento celular en una dosis dependiente. La inhibición del crecimiento fue de 55% y 35% a 1 μ M de LYCO y extracto TP-hexano respectivamente. Los niveles del 8OHdOG se incrementaron a 5 μ M y los niveles de MDA fueron reducidos (LYCO 0.1-1 μ M).

JUSTIFICACIÓN

Debido a la gran incidencia de enfermedades crónico degenerativas, tales como algunos tipos de cáncer y a la necesidad de prevenir dichas enfermedades se ha propuesto el consumo de frutas y verduras. Éstas son ricas en fitoquímicos, tales como el LYCO, al que en una variedad de investigaciones *in vitro* se le han atribuido propiedades quimiopreventivas mediante sus actividades como antioxidante, modulador de las Fases I y II del MX, como inductor de apoptosis e inhibidor de las fases del ciclo celular. Así también porque se conoce muy poco acerca del mecanismo de acción del LYCO en ensayos *in vivo*, por tal motivo este estudio pretende contribuir en el entendimiento del efecto protector del LYCO.

HIPÓTESIS

Si el LYCO presenta las actividades antioxidante y modulador de las Fases I y II del MX y de algunas enzimas antioxidantes, entonces esperaríamos una reducción en la tasa de mutación inducida por el 4-NQO, ya sea porque inhibió las enzimas que metabolizan al 4-NQO e indujo su eliminación (Fase II) y/o actuó como antioxidante capturando las ROS generadas por 4-NQO.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de los pre-tratamientos con LYCO (0.45, 0.9, 1.8 μ M) en la reducción el daño genotóxico del cancerígeno y promutágeno 4-NQO en el ensayo del ala de *Drosophila melanogaster* Cruza Estándar (CE).

MATERIALES Y MÉTODOS

Químicos

El LYCO (CAS No. 502-65-8, 90% de pureza), 4-NQO (CAS No.56-57-5, 97% de pureza), acetona (CAS No. 67-64-1, 99.9% pureza) y H₂O₂) (CAS 7722-84-1, 30% de pureza) fueron obtenidos de Sigma Aldrich (Saint Louis, MO).

1 mg de LYCO fue disuelto en 1 mL de acetona 99.9% y 200 µL de hexano (CAS No. 110-54-3 60-66% n-hexano, Grado HPLC, marca Burdick & Jackson) y después aforado en 49 mL de agua de la calidad miliQ, quedando a una concentración de 20 µg/mL el cual fue distribuido en alícuotas depositadas al vacío, en viales cubiertos con papel aluminio y almacenados a -70° C para evitar su fotólisis y oxidación hasta el momento de ser utilizados. Cabe aclarar que de acuerdo con la literatura el LYCO fue manipulado en la oscuridad con una lámpara de luz roja (15 W) y en un cuarto frío (2° C) para evitar su degradación.

Al momento del experimento esta concentración del LYCO (20 µg/mL) se fue diluyendo hasta tener las concentraciones utilizadas (0.45, 0.9, 1.8 µM). El 4-NQO fue disuelto en acetona al 2% (v/v). El H₂O₂ fue disuelto en agua para obtener la concentración de 20 mM. Las preparaciones permanentes de las alas de las moscas se realizaron con Entellan® (Merck, Darmstadt, Germany).

Propagación de las Líneas (flr³ y mwh), realización de la cruce estándar (CE) y colecta de huevos

Las líneas *flare* (*flr³Δn(3LR)TM3,ri p⁰ sep I(3)89Aa bx^{34e} e^S Bd^S*; de forma abreviada: *flr³/TM3, Bd^S*) y *multiple wing hair* (*mwh* por sus siglas en inglés) (*mwh/mwh*) de *Drosophila melanogaster* se propagaron a 25° C y 60% de humedad, en frascos lecheros de 250 mL previamente esterilizados, conteniendo 5 g de hojuelas de papa

deshidratada (Maggi ®) y 20 mL de solución conservadora como medio de cultivo (Dueñas *et al.*, 2002). Posteriormente, se realizó la CE con hembras vírgenes de la línea *flare* y machos de la línea *mwh*. Tres días después se procedió a la colecta de huevos que se realizó en frascos lecheros de 250 mL, conteniendo levadura fresca (Florida ®) la cual fue activada con sacarosa y agua del grifo y posteriormente expuesta a 3 períodos de 5 min c/u en "Baño María" a 36-40° C. La colecta se realizó durante 8 h, en oscuridad a 25° C y 60% de humedad. Concluido este tiempo se retiraron los adultos de los frascos, cuidando de que quedaran únicamente los huevos en la levadura y almacenándolos en la estufa a 25 °C y 60% de humedad para posteriormente recuperar larvas de tercer estadio.

Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART)

Tres días después de la colecta de huevos, en una coladera de malla fina, se vertió el contenido de los frascos con levadura activada para recuperar larvas de 72 ± 4 h, se enjuagaron con agua a 25 °C hasta que no hubiera rastro de levadura.

Las larvas recuperadas fueron pretratadas con LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μ M), acetona 2%/hexano 0.17 μ L/mL y agua, estos últimos fueron utilizados como testigos negativos. Para los tratamientos se ocuparon tubos con una organza en uno de los extremos, con 1 g de Medio Instantáneo *Drosophila* (MID) (Carolina Biological supply Co., Burlington N C, USA), el cual fue molido en licuadora para facilitar la recuperación de larvas y se adicionaron 18 mL de c/u de las soluciones antes mencionadas. Estos pre-tratamientos se realizaron en un cuarto oscuro con una lámpara de luz roja (15 W), se incubaron a 25 °C durante 6 h y transcurrido ese tiempo se recuperaron larvas de 78 ± 4 h, que se colocaron en tubos con 0.5 g de MID y 2 mL de cada uno de los diferentes tratamientos crónicos:

4-NQO (2mM); H₂O₂ (20mM) como testigo oxidante, acetona 2% y agua (Tabla 7). Posteriormente, se incubaron hasta terminar su desarrollo (42 h) a 25 °C. Se realizaron tres experimentos independientes y cada uno de ellos se hizo por triplicado.

Los adultos de cada uno de los tratamientos se recuperaron y se conservaron en viales con alcohol al 70%. Posteriormente se seleccionaron de 55-60 individuos (procurando tener la misma cantidad de hembras que de machos) y se procedió al montaje de alas con fenotipo silvestre (genotipo *mwh flr³⁺ / mwh⁺ flr³*) en preparaciones permanentes con Entellan®. Las laminillas fueron etiquetadas a doble ciego para evitar el prejuicio en la determinación de los efectos del LYCO. Las preparaciones permanentes se analizaron en un microscopio óptico 40X donde se contabilizaron la frecuencia y el tamaño de los clones o manchas de células mutantes provocadas por la pérdida de heterocigosis de los genes marcadores (*flr³* y *mwh*).

Los datos obtenidos se procesaron con el programa estadístico SMART para PC que se basa en la prueba estadística ji cuadrada para proporciones de Frei y Würzler (1988). Los resultados débiles positivos e indecisos fueron analizados con la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney STAT graphics versión 6.0 en el paquete de computo minitab Versión 15 y para la distribución de clones la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Tabla 7. Diseño experimental.

Pre-tratamientos (6 h)	Tratamientos crónicos (42 h)			
	4-NQO (2mM)	Acetona 2%	H ₂ O ₂ (20mM)	Agua
LYCO 0.45 μ M	+	+	+	+
LYCO 0.9 μ M	+	+	+	+
LYCO 1.8 μ M	+	+	+	+
Acetona 2%/Hexano	+	+	+	+
Agua	-	-	+	+

RESULTADOS

En la Tabla 8 y Figuras 7, 9, 11 y 13 se muestra el tipo (sencillos o gemelos), el tamaño (pequeños o grandes) y la frecuencia de clones mutantes (manchas) por individuo y en las Figuras 8, 10, 12 y 14 se presentan las distribuciones de los tamaños de los clones *mwh*. Los resultados del análisis estadístico de la prueba Kolmogorov-Smirnov se encuentra en el Anexo 2.

Como se esperaba los testigos acetona-hexano/acetona y acetona-hexano /agua no presentaron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias de manchas con respecto al testigo agua/agua (Tabla 8 apartado 8A y Figura 7), sin embargo en las distribuciones de los tamaños de los clones *mwh* si presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) (Figura 8).

El testigo positivo acetona-hexano/4-NQO incrementó significativamente la frecuencia de manchas pequeñas, grandes y totales con respecto al testigo disolvente acetona-hexano/acetona (Tabla 8, Apartado 8B y Figura 7). En la Figura 8 se observa que este testigo positivo presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) en la distribución del tamaño de los clones *mwh* con respecto a su testigo disolvente, lo cual nos confirma la actividad del 4-NQO como pro-mutágeno al obtener una mayor frecuencia en la clase de 2 células. Además el incremento significativo en la frecuencia de clones de más de 2 células nos sugeriría su efecto directo (pro-oxidante).

Contrario a lo esperado, el testigo positivo acetona-hexano/H₂O₂ no presentó un incremento significativo en la frecuencia de manchas (Tabla 8, apartado 8B' y Figura 7), pero sí se encontraron diferencias significativas en la distribución del tamaño de los clones *mwh*, en comparación con el testigo acetona-hexano/agua (Figura 8) ($P < 0.05$).

Tabla 8. Resumen de los resultados obtenidos, después de alimentar a larvas con pre-tratamientos de LYCO (0.45, 0.9, 1.8 μM), acetona-hexano o agua y tratamientos crónicos de 4-NQO (2 mM), H_2O_2 (20 mM), acetona 2% (v/v) o agua; y analizar las alas con fenotipo silvestre de *D. melanogaster* CE de SMART en ala.

Pre-tratamiento / Tratamiento crónico	No. de Individuos	Manchas por individuo (número de manchas) diagnóstico estadístico* / **											
		Manchas pequeñas (1-2 células) m=2		Manchas grandes (> 2 células) m=5			Manchas gemelas m=5		Manchas totales m=2		Clones mwh		
A. Testigos negativos													
agua / agua	60	0.57	(34)	0.05	(3)		0.0	(0)	0.62	(37)		36	
Acetona-hexano/acetona	60	0.65	(39)	- 0.10	(6)	i/ns	0.0	(0)	- 0.75	(45)	-	44	
Acetona-hexano /agua	59	0.59	(35)	- 0.10	(6)	i/ns	0.0	(0)	- 0.69	(41)	-	41	
B. Testigo positivo 4-NQO (2.0 mM)													
Acetona-hexano/acetona	60	0.65	(39)	0.10	(6)		0.0	(0)	0.75	(45)		44	
Acetona-hexano /4-NQO	58	0.98	(57)	+ 0.45	(26)	+	0.02	(1)	- 1.45	(84)	+	82	
B'. Testigo positivo H_2O_2 (20 mM)													
Acetona-hexano / agua	59	0.59	(35)	0.10	(6)		0.0	(0)	0.69	(41)		41	
Acetona-hexano/ H_2O_2	59	0.46	(27)	- 0.10	(6)	-	0.0	(0)	- 0.56	(33)	-	33	
C. Testigos LYCO/ acetona (2%)													
Acetona-hexano /acetona	60	0.65	(39)	0.10	(6)		0.0	(0)	0.75	(45)		44	
LYCO 0.45 μM /acetona	60	0.55	(33)	- 0.03	(2)	-	0.0	(0)	- 0.58	(35)	-	35	
LYCO 0.9 μM /acetona	60	0.60	(36)	- 0.13	(8)	-	0.0	(0)	- 0.73	(44)	-	42	
LYCO 1.8 μM /acetona	57	0.58	(33)	- 0.09	(5)	-	0.0	(0)	- 0.67	(38)	-	38	
D. Testigo LYCO/ Agua miliQ													
Acetona-hexano/agua	59	0.59	(35)	0.10	(6)		0.0	(0)	0.69	(41)		41	
LYCO 0.45 μM /agua	58	0.50	(29)	- 0.09	(5)	-	0.02	(1)	- 0.60	(35)	-	34	
LYCO 0.9 μM /agua	64	0.37	(24)	- 0.12	(8)	-	0.0	(0)	- 0.50	(32)	-	27	
LYCO 1.8 μM /agua	59	0.34	(20)	↓ 0.14	(8)	-	0.0	(0)	- 0.47	(28)	-	26	
E. Cotratamientos LYCO/ 4-NQO (2 mM)													
Acetona-hexano / 4-NQO	58	0.98	(57)	0.45	(26)		0.02	(1)	1.45	(84)		82	
LYCO 0.45 μM / 4-NQO	57	1.49	(85)	+ 0.89	(51)	w/ns**	0.02	(1)	- 2.40	(137)	+	136	
LYCO 0.9 μM / 4-NQO	58	1.28	(74)	- 0.84	(49)	w/ns**	0.12	(7)	+ 2.24	(130)	w/s**	128	
LYCO 1.8 μM / 4-NQO	55	1.16	(64)	- 0.56	(31)	-	0.0	(0)	- 1.73	(95)	-	95	
F. Cotratamientos LYCO/ H_2O_2 (20 mM)													
Acetona-hexano / H_2O_2	59	0.46	(27)	0.10	(6)		0.0	(0)	0.56	(33)		33	
LYCO 0.45 μM / H_2O_2	61	0.46	(28)	- 0.08	(5)	-	0.02	(1)	i/ns**	0.56	(34)	-	34
LYCO 0.9 μM / H_2O_2	60	0.27	(16)	- 0.10	(6)	-	0.02	(1)	i/ns**	0.38	(23)	-	23
LYCO 1.8 μM / H_2O_2	61	0.38	(23)	- 0.10	(6)	-	0.0	(0)	- 0.48	(29)	-	27	

* Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei Würigler (1988) comparado con su testigo correspondiente. Niveles de probabilidad α, β (0.05); positivos: +; negativos: -; débil positivo: w; indecisos: i. ** Diagnóstico estadístico con la prueba de U (Mann, Whitney y Wilcoxon de acuerdo a Frei y Würigler (1995) modificado para una cola: no significativo: ns; significativo: s ($P < 0.05$).

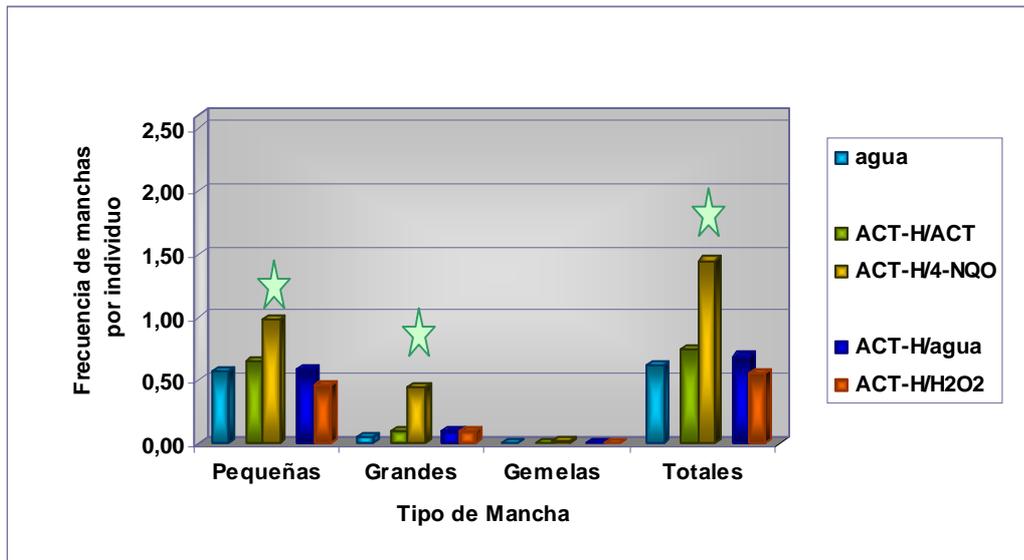


Fig. 7. Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo de los testigos negativos y positivos. Se observa un efecto genotóxico del testigo acetona-hexano (ACT-H)/4-NQO (★) en comparación con su testigo acetona-hexano/acetona (ACT-H/ACT) ($P < 0.05$).

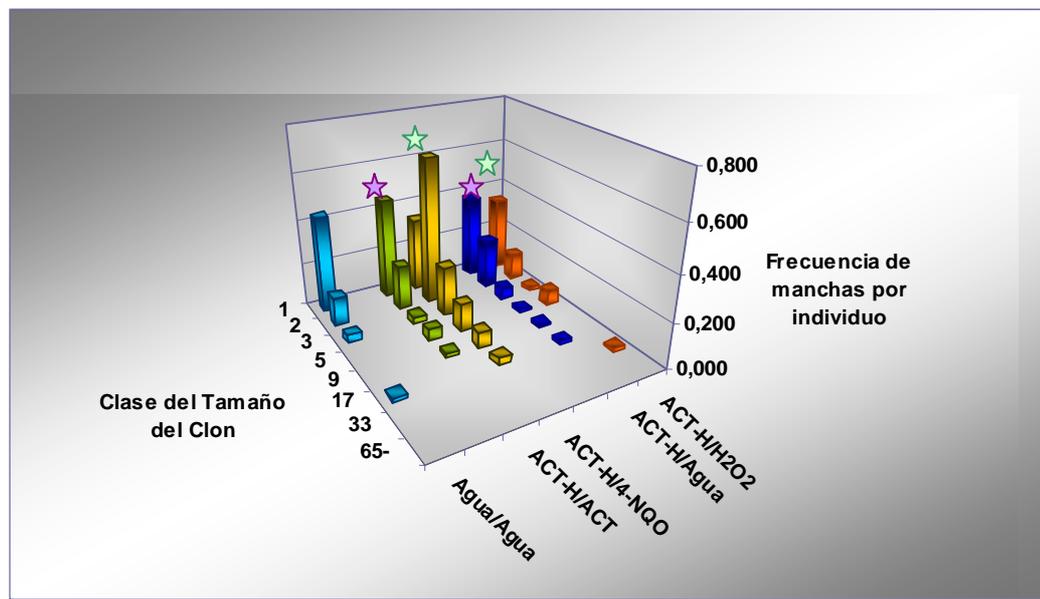


Fig. 8. Distribución del tamaño de los clones *mwh* de los testigos negativos y positivos. Las distribuciones de los testigos negativos son diferentes al testigo agua/agua (★). Así mismo las distribuciones de los testigos positivos son diferentes a la de sus respectivos testigos (★). $P = < 0.05$. Las clases del tamaño de los clones *mwh* son: 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 17-32, 33-64, >65 células. Donde: ACT-H = acetona-hexano y ACT = acetona

Testigos LYCO

Algunas de las larvas pretratadas con LYCO (1.8 μM) migraron hacia la parte superior del tubo (las cuales fueron eliminadas) y las que quedaron embebidas en el medio estaban aletargadas. También se observó que conforme se reducía la concentración de LYCO las larvas presentaban mayor movilidad y menor migración.

Los testigos LYCO 0.45 μM y 0.9 μM no presentaron diferencias estadísticas en las frecuencias de manchas pequeñas, grandes o gemelas en comparación con sus testigos correspondientes acetona-hexano/acetona (Tabla 8, apartado 8C y Figura 9) y acetona-hexano/agua (Tabla 8, apartado 8D y Figura 9). Sin embargo LYCO 0.45 μM /acetona, y LYCO 0.45 y 0.9 μM /agua presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la distribución del tamaño de los clones *mwh* en comparación con sus respectivos testigos (Figura 10). El testigo LYCO 1.8 μM /agua presentó una disminución estadísticamente significativa en la frecuencia de manchas pequeñas (Tabla 8, apartado 8D y Figura 9) y diferencias significativas en la distribución del tamaño de los clones *mwh* al igual que LYCO 1.8 μM /acetona con respecto a los testigos acetona-hexano/agua y acetona-hexano/acetona (Figura 10)

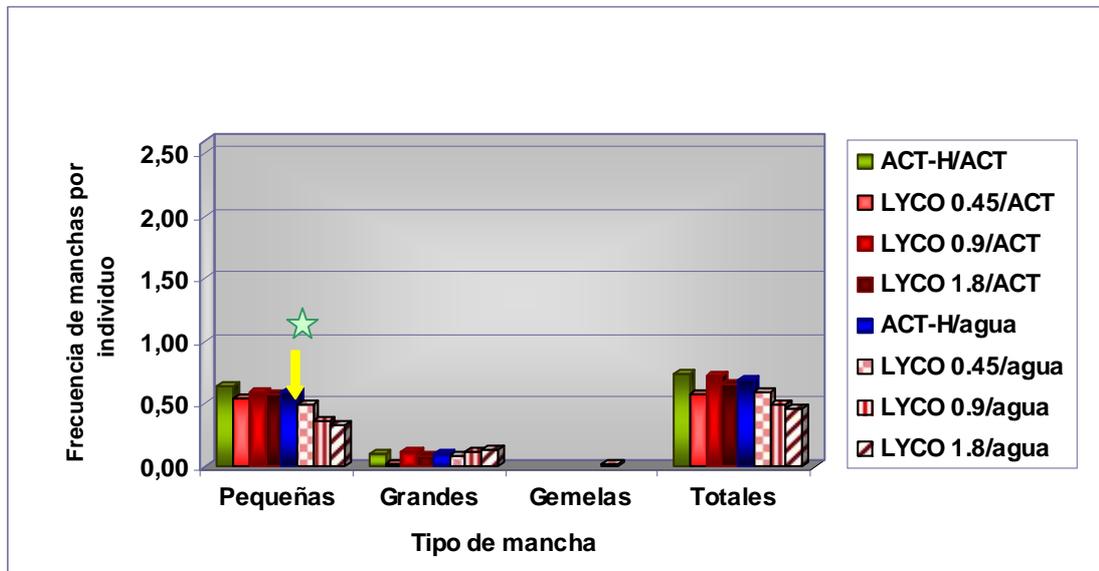


Fig. 9. Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo de los testigos LYCO. Se observa una disminución significativa ($P < 0.05$) en la tasa de mutación espontánea por parte del testigo LYCO 1.8 $\mu\text{M}/\text{Agua}$ (☆) en comparación con su testigo correspondiente. Donde: ACT-H = acetona-hexano y ACT = acetona.

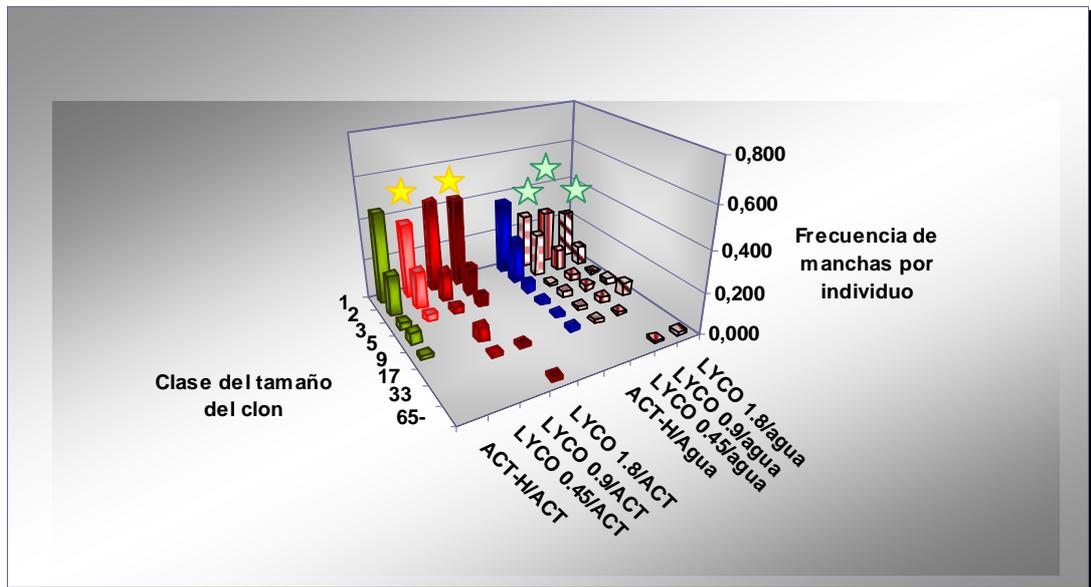


Figura 10. Distribución del tamaño de los clones *mwh* del LYCO. Las distribuciones de LYCO 0.45 μM y 1.8 $\mu\text{M}/\text{acetona}$ (☆) y LYCO 0.45, 0.9, 1.8 $\mu\text{M}/\text{agua}$ (☆) presentaron diferencias significativas en comparación con sus respectivos testigos ($P < 0.05$). Donde: ACT-H = acetona-hexano y ACT = acetona. Las clases del tamaño de los clones *mwh* son: 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 17-32, 33-64, >65 células.

Interacción LYCO/4-NQO

Los pre-tratamientos a las diferentes concentraciones de LYCO/4-NQO, se muestran en el apartado 8E de la Tabla 8 y en la Figura 11, donde se observa que el LYCO no presentó efecto protector si no que hay una interacción contraria a la esperada entre éstos, ya que el tratamiento LYCO 0.45 μM /4-NQO incrementó significativamente la frecuencia de manchas pequeñas y totales con respecto al testigo acetona-hexano/4-NQO. Esto indica que el LYCO, a esta concentración, potenció el efecto genotóxico del 4-NQO. En la Figura 12 se observan diferencias estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre esta interacción en la distribución de clones *mwh*, y un incremento en la frecuencia de manchas de una célula, ya que se duplicó la frecuencia de clones de este tipo con respecto al testigo acetona-hexano/4-NQO. Esto podría indicar que el mayor daño ocurrió al final del desarrollo larvario o que el daño impidió la división celular. La interacción de LYCO 0.9 μM /4-NQO produjo un incremento significativo en la frecuencia de manchas gemelas y totales (Figura 11). En el caso de las gemelas sugiere una actividad recombinogénica que se podría derivar de la ruptura de dobles cadenas de ADN (Friedberg *et al.*, 2006).

En el tratamiento LYCO 1.8 μM /4-NQO, aunque se presentó un ligero aumento en las frecuencias de manchas pequeñas, grandes y totales, éstas no resultaron estadísticamente significativas. Cabe destacar que conforme aumenta la concentración de LYCO, disminuye la frecuencia de manchas pequeñas y esto se ve reflejado en las frecuencias de manchas totales (Figura 11).

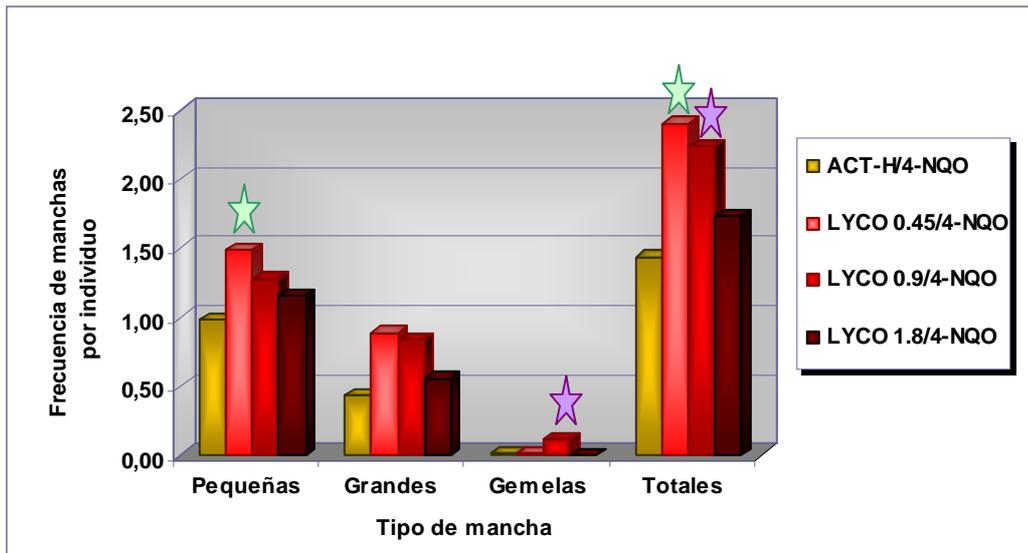


Figura 11. Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales de la interacción LYCO/4-NQO. En la frecuencia de manchas pequeñas y totales de los tratamientos LYCO 0.45 μ M /4-NQO se observó un efecto genotóxico (★) y en LYCO 0.9 μ M /4-NQO (★) en la frecuencia de manchas gemelas y totales en comparación con su testigo correspondiente. Donde ACT-H= acetona-hexano

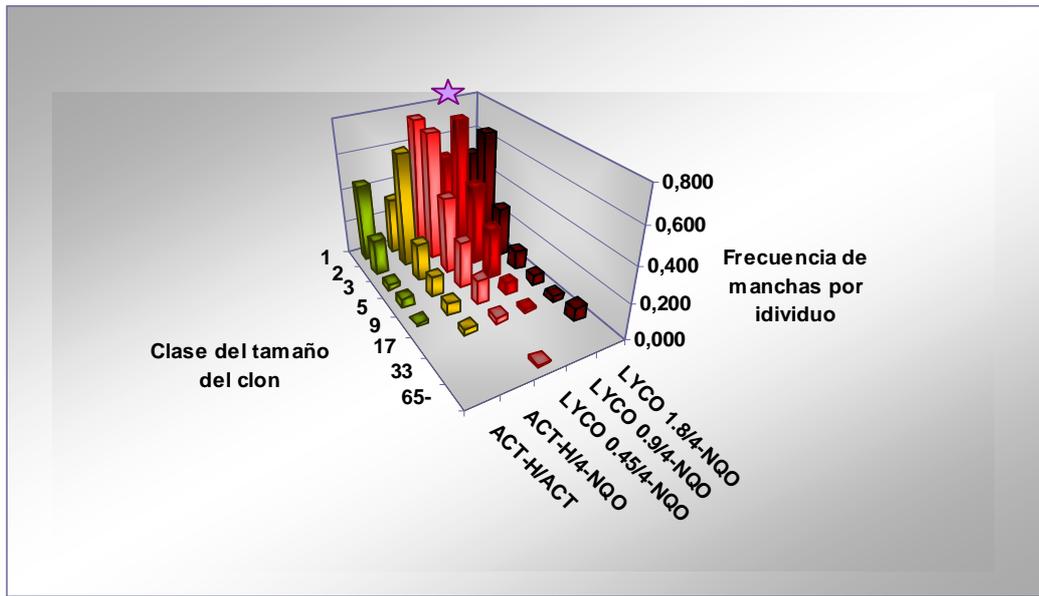


Figura 12. Distribución del tamaño de los clones *mwh* de la interacción LYCO/4-NQO. Hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) en la distribución de los clones de los tratamientos LYCO 0.45 μ M/4-NQO (★) en comparación con el testigo acetona-hexano/4-NQO. Donde: ACT-H = acetona-hexano y ACT = acetona. Las clases de los tamaños de los clones *mwh* son: 1,2,3-4,5-8,9-16,17-32 , 33-64, >65 células.

Interacción LYCO/H₂O₂

Los resultados obtenidos para los pre-tratamientos a diferentes concentraciones de LYCO/H₂O₂ (apartado 8F de la Tabla 8 y Figura 13) no mostraron diferencias significativas en las frecuencias de ningún tipo de manchas en comparación con el testigo acetona-hexano/H₂O₂. En el tratamiento LYCO 0.9 μM/H₂O₂ existen diferencias significativas (P<0.05) en las distribuciones de los tamaños de clones en comparación con el testigo acetona-hexano /H₂O₂ (Figura 14), lo que nos sugiere un efecto modulador del LYCO sobre el H₂O₂ al alterar la división celular.

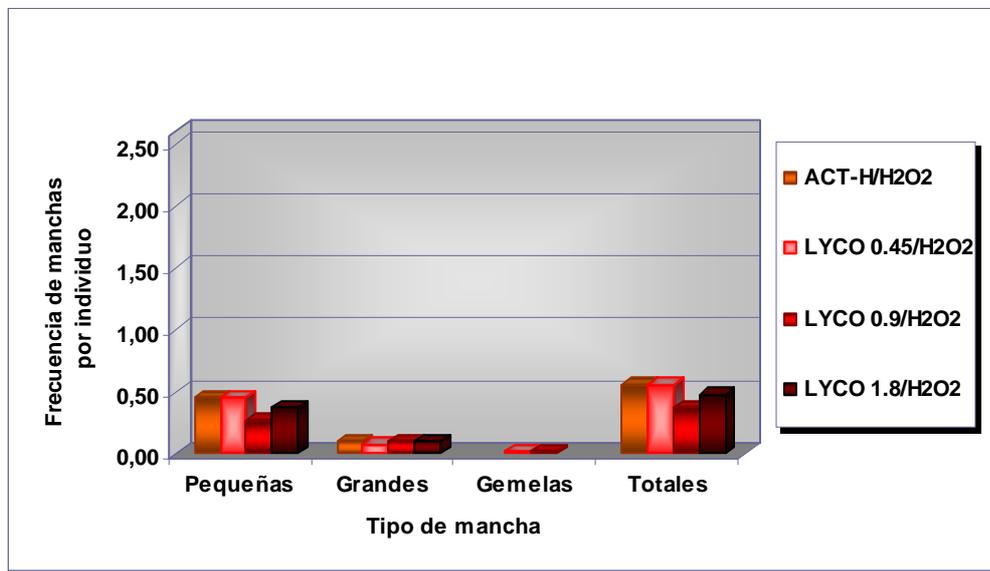


Fig. 13. Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales de la interacción LYCO/H₂O₂. No existen diferencias significativas entre ninguna de las concentraciones de LYCO/ H₂O₂ en comparación con su testigo acetona-hexano (ACT-H)/H₂O₂.

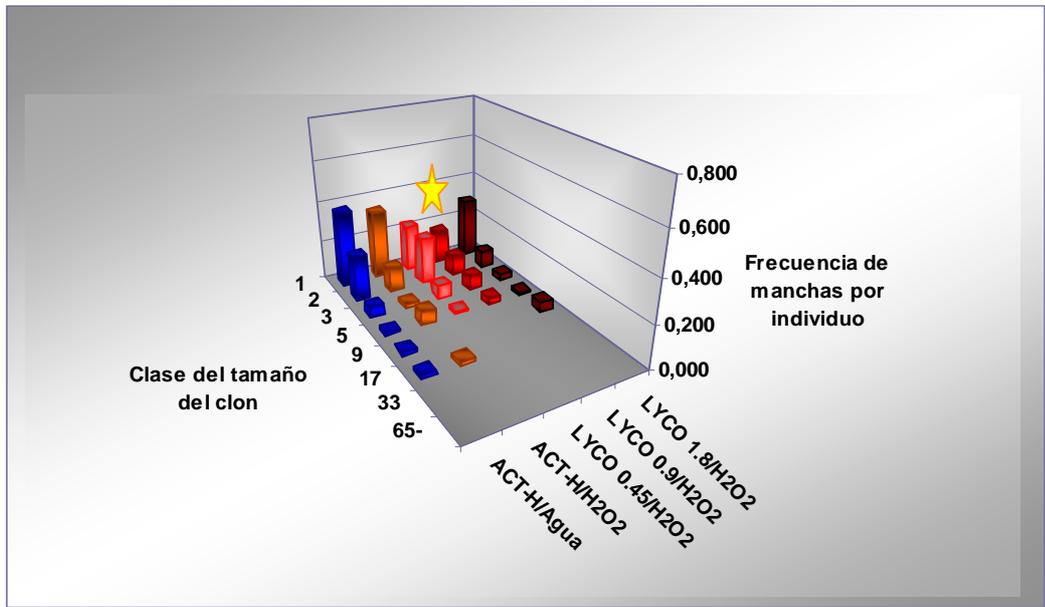


Fig. 14. Distribución del tamaño de los clones *mwh* de la interacción LYCO/H₂O₂. En las distribuciones de los clones del testigo LYCO 0.9μM/H₂O₂ hubo diferencias significativas (P<0.05) (★) en comparación con su testigo. Donde ACT-H= acetona-hexano Las clases del tamaño de los clones son: 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 17-32, 33-64, >65 células.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó la interacción del LYCO, carotenoide estudiado por sus diversas propiedades para prevenir enfermedades crónico degenerativas, con el efecto del 4-NQO promutágeno y cancerígeno con actividad oxidante. En diversas investigaciones con LYCO han determinado diferentes solventes para solubilizar el carotenoide como el dimetil sulfóxido (Srinivasan *et al.*, 2009); tween (Scolastici *et al.* 2007, Scolastici *et al.*, 2008); aceite de maíz (Breinholt *et al.* 2000; Atessahin *et al.*, 2005; Sahin *et al.*, 2006); hexano (Balachandran *et al.*, 2003); agua : dextrosa (Vertzoni *et al.*, 2006) aceite de girasol (Carrapeiro *et al.*, 2007); tetrahidrofurano : butilato de hidroxitolueno (Fornelli *et al.*, 2007; Lo *et al.*, 2007) y acetona 1% (Burgess *et al.*, 2008), entre otros. En este trabajo se utilizó la acetona como solvente del LYCO debido a que es fácil de manipular y a que no ha presentado efectos tóxicos para el modelo *D. melanogaster* (Heres-Pulido *et al.*, 2008), a la mezcla de LYCO con acetona se le agregó una pequeña cantidad de hexano para incrementar la solubilidad. Los testigos acetona-hexano/acetona y acetona-hexano/agua no presentaron efectos genotóxicos en comparación con el agua/agua, aunque sí se alteraron la división celular. Sin embargo esto no afectó en los resultados pues la presencia de la acetona-hexano y la acetona sola a esa concentración fue constante durante todos los experimentos.

De acuerdo con Kaya *et al.* (2002); Heres-Pulido *et al.* (2004) en SMART en ala y con Gaivão *et al.* (1999) en SMART en ojo, el testigo positivo 4-NQO incrementó significativamente la frecuencia de manchas pequeñas, grandes y totales confirmándose su efecto genotóxico en la CE, debido a sus actividades como pro-oxidante al generar ciertas ROS (H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$) (Blaglow *et al.*, 1977; Arima *et al.*, 2006) y promutágenas. Esto último se infiere al observar un incremento en la frecuencia de manchas pequeñas, sobre todo los clones de dos células, lo que nos sugiere que el daño

ocasionado por este mutágeno fue debido a la formación de su metabolito 4HAQO (Bailleul *et al.*, 1989, Kitano, 2000).

En este trabajo se utilizó el H₂O₂ como testigo oxidante por ser considerada como una ROS que puede generar [•]OH al interactuar con metales de transición como el Fe^{+3,+2} y el Cu⁺² (Desesso *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2011). Además, ha sido utilizada en estudios *in vitro* donde se ha evaluado el efecto antioxidante del LYCO (Scolastici *et al.*, 2007 y Scolastici *et al.*, 2008; Rios *et al.*, 2009). Concordando con otros ensayos realizados con *D. melanogaster* (Furukawa *et al.*, 1993; Kawai *et al.*, 1995), el testigo H₂O₂ no incrementó la frecuencia de manchas, lo que podría ser explicado considerando que las enzimas antioxidantes como las CAT (Thayer, 1986; Furukawa *et al.*, 1993; Kawai *et al.*, 1995; Röhrdanz y Kahl, 1997) y la glutatión peroxidasa, estén metabolizando el peróxido. Sin embargo, esta aparente inocuidad queda en duda, ya que hubo una alteración en la división celular, que pudo ser debida a cualquiera de sus actividades biológicas reportadas como lo es la inducción de apoptosis (Zuo *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2009), efectos citotóxicos (Brink *et al.*, 2009) y/o los genotóxicos (Moreira *et al.*, 2007). Debido al alcance de la prueba SMART no se puede demostrar esta hipótesis por lo que se sugiere realizar pruebas moleculares con marcadores apoptóticos y de estrés oxidativo.

Testigos LYCO

A diferencia de Yeh y Hu (2000) y de acuerdo con Scolastici *et al.* (2007 y 2008) y Jian *et al.* (2008), los testigos LYCO a las tres concentraciones no incrementaron la frecuencia de clones mutantes. Por el contrario, LYCO a la concentración de 1.8 µM/agua presentó una disminución en la tasa de mutación espontánea que podría ser explicada por un efecto antioxidante (efecto protector), al contrarrestar los radicales libres generados del propio metabolismo de la larva. Pero también cabe la posibilidad de que

el LYCO, a esta concentración, haya tenido efecto pro-oxidante (Yeh y Hu, 2000; McNulty *et al.*, 2006) que ocasionara incremento del daño e indujera apoptosis (Müller *et al.*, 2002). Al analizar la distribución del tamaño de los clones *mwh* se encontraron diferencias entre los tratamientos y el testigo negativo (excepto 0.9 μM /acetona), esto nos está indicando que el LYCO está modulando la división celular ya que se observa una ligera disminución en la frecuencia de clones de los testigos LYCO/acetona, y en el caso de los LYCO/agua esta disminución se ve muy marcada, efecto que podría apoyar a cualquiera de las dos opciones mencionadas anteriormente. Cabe destacar que en el pre-tratamiento de LYCO 1.8 μM se observó que algunas larvas presentaron efectos de aletargamiento y migraron prematuramente a la parte superior de los tubos con "intención" de pupar, lo cual nos podría sugerir que el LYCO esté alterando el desarrollo embrionario de las larvas. Por lo que se sugiere que se hagan estudios sobre los efectos que podría tener este carotenoide en el desarrollo de *D. melanogaster* para confirmar esta posible hipótesis, así como hacer pruebas de sobrevivencia en diferentes etapas del desarrollo a esta concentración de LYCO, para descartar que el compuesto no sea tóxico.

Interacción LYCO /4-NQO

En otros ensayos (*in vitro* e *in vivo*) se ha reportado la capacidad quimiopreventiva del LYCO, ya sea como: a) antioxidante (Miller *et al.*, 1996; Scolastici, *et al.*, 2007, Scolastici, *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2007; Srinivasan *et al.*, 2009y Rios *et al.*, 2009), b) anticancerígeno: contra la leucoplasia oral *in vivo* (Singh *et al.*, 2004) y cáncer de lengua inducido por el 4-NQO (Husseini, 2010); c) inductor o inhibidor de enzimas del MX e inductor de enzimas antioxidantes en ensayos *in vitro* (Srinivasan *et al.*, 2009; Wang y Leung, 2010) e *in vivo* (Breinholt *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2007); d) pro-apoptótico (Müller *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003); e) anti-proliferativo (Hwang y Bowen, 2005); f) mejorador de la comunicación célula-célula (Zhang *et al.*, 1992; Aust *et al.*, 2003). No obstante, ninguna de las tres concentraciones

utilizadas en el presente estudio demostró efecto quimiopreventivo contra el 4-NQO.

Los resultados encontrados en las interacciones LYCO 0.45 μ M / 4-NQO y LYCO 0.9 μ M/ 4-NQO se podrían explicar si se asume que el efecto oxidante del 4-NQO pudo potenciar el débil efecto prooxidante del LYCO, reportado previamente en ensayos *in vitro* como el de Yeh y Hu (2000), quienes aunque no encontraron efecto potenciador con otros oxidantes (AMVN, AAPH y Fe/NTA) reportaron que el LYCO pueden ser antioxidante o pro-oxidante dependiendo del tipo de oxidante utilizado y que *per se*, el LYCO presenta efecto pro-oxidante. Lowe *et al.* (2003) mencionan algunos factores que pueden influir en el efecto pro-oxidante de los carotenos como lo es la concentración, la localización en la célula y la interacción con otros antioxidantes. Los resultados encontrados en este trabajo son semejantes a lo reportado por Yeh *et al.* (2005), quienes encontraron que el LYCO expuesto a la radiación UVA generó metabolitos oxidativos los cuales pueden ser responsables del incremento del daño reportado en su estudio.

En este trabajo se plantearon tres hipótesis para explicar las causas por las cuales el LYCO pudo haber presentado efectos pro-oxidantes al interactuar con el 4-NQO:

Productos del metabolismo del LYCO

Por sus propiedades lipofílicas y moduladoras de la Fase I del MX (Breinholt *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2007; Wang y Leung, 2010) el LYCO puede ser metabolizado (vía CYP450 o por autooxidación) y originar epóxidos (Fernández-Ruiz *et al.*, 2007) y otros productos oxidativos del rompimiento de cadenas (apocarotenales y/o apocarotenoides) (Lowe *et al.*, 2003). Algunos de estos metabolitos son: el licopeno 5, 6, 5', 6' di-epóxido, licopeno 5, 8-furanóxido, licopeno 5-8 epóxido (dos Anjos *et al.*, 2004); dialdehido2, 7, 11-trimetil-tetradecahexaeno-1, 14-dial, y el 5, 6-

dihidroxi-5, 6-dihidrolipoceno. Este último fue identificado en el suero sanguíneo de consumidores de jitomate. Los metabolitos del LYCO han sido considerados por varias investigaciones como los responsables de los efectos quimiopreventivos de este carotenoide (Khachik *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2003; dos Anjos *et al.*, 2004) mientras que otros investigadores han sugerido que son los responsables de sus actividades pro-oxidantes (Yeh y Hu, 2000 y Yeh *et al.*, 2005). Por lo que a partir de esta hipótesis, se pueden derivar dos posibles explicaciones para los resultados obtenidos en el presente trabajo: a) los epóxidos (Britton, 1995; Fernández-Ruiz *et al.*, 2007) y furanóxidos pudieron haber interactuado directamente con el ADN y cuando le fue agregado el mutágeno, se sumó el efecto de los dos, ocasionando la elevada frecuencia de eventos mutacionales y b) el LYCO puede estar modulando el metabolismo del 4-NQO, por medio de la inducción de enzimas que metabolizan a este promutágeno, lo cual pudo haber generando más 4HAQO (Bailleul *et al.*, 1989; Kitano *et al.*, 2000). Esto permitiría explicar el particular incremento de manchas pequeñas y grandes.

Interacción con la membrana

a) el LYCO es incorporado por quilomicrones dentro de las membranas celulares. Este caroteno pudo alterar la cadena acilo de los fosfolípidos, al grado de presentar perturbaciones en la membrana, esto se ha relacionado con un incremento en los niveles de peroxidación lípídica (McNulty, 2006); b) las ROS del medio celular o las generadas por la incorporación del 4-NQO pudieron lipoperoxidar al LYCO ya sea por abstracción del hidrógeno o adición de una especie radical y el producto originado (radical carotenoide peroxilo) pudo propagar la peroxidación de lípidos (Young *et al.*, 2001; Lowe *et al.*, 2003; Konigsberg, 2008).

El resultado de esta peroxidación lípídica es la formación de diversos productos principalmente: malonaldehído (MAD) el cual se ha mostrado que daña al ADN ocasionando rompimientos de cromátides, deleciones y aneuploidías (Bird *et al.*, 1982), el 4HNE el cual es un producto altamente

reactivo y en una investigación sugieren que MON, uno de los metabolitos del LYCO, presenta una actividad similar a la de 4HNE para inducir apoptosis (Zhang, *et al.*, 2003). El aumento en la peroxidación lipídica por este carotenoide también fue observado en estudios *in vivo* (Rao *et al.*, 1998; Breinholt *et al.*, 2000). Esta hipótesis, podría explicar el incremento de manchas pequeñas, ya que estas son formadas por aneuploidías.

Hwang y Bowen 2005; Yeh *et al.*, 2005; Scolastici *et al.*, 2007, encontraron efecto pro-oxidante del LYCO a concentraciones $>5 \mu\text{M}$. Young *et al.* (2001) y Lowe *et al.* (2003) sugirieron que cuando los carotenoides se encuentran a altas concentraciones tienden a agregarse en la membrana (los isómeros *cis*, tienen una baja tendencia en comparación con las *trans*), incrementando la fluidez y permeabilidad de la membrana permitiendo el paso de algunos tipos de ROS. Sin embargo este trabajo no concuerda con lo antes mencionado, ya que se utilizaron concentraciones más bajas de LYCO y aun así se observó un incremento en el daño causado por el 4-NQO, posiblemente atribuible al efecto pro-oxidante del LYCO.

Inducción de apoptosis

Algunos estudios, con varios tipos de líneas celulares (como LNCaP, línea celular de cáncer de próstata) muestran la evidencia de que el LYCO, induce mecanismos de acción independientes de su comportamiento antioxidante, como inductor de apoptosis o como regulador del ciclo celular (Hwang y Bowen, 2005; Salman *et al.*, 2007). También se ha demostrado que algunos metabolitos de este carotenoide como MON, pueden inducir apoptosis, mediante la activación de las caspasas 8 y 9 (Zhang, *et al.* 2003). Por otro lado Müller *et al.*, 2002 proponen que los carotenos como el β -caroteno y el LYCO inducen apoptosis en células Jurkat E6.1 debido a su efecto pro-oxidante. En este trabajo se sugiere que la administración del LYCO ($1.8 \mu\text{M}$) como pre-tratamiento a la aplicación con 4-NQO, posiblemente tiene un efecto pro-apoptótico debido a la acumulación del daño ocasionado al ADN. Esta hipótesis es

planteada ya que en la frecuencia de manchas se observa una tendencia no significativa a disminuir inversa a la concentración. Debido a lo anterior se sugiere medir la inducción de marcadores apoptóticos con este mismo protocolo. Cabe la posibilidad de que al 4-NQO se le pueda adjudicar este efecto apoptótico, ya que el daño que ocasiona induce la expresión de la proteína P53 (proteína reguladora de los procesos apoptóticos) (Mirzayans *et al.*, 1999).

El incremento del daño del 4-NQO por parte del LYCO también concuerda con otros trabajos en donde se ha trabajado con este mutágeno pero con vitamina C en SMART en ala (Kaya *et al.*, 2002; Arellano, 2008), esto nos sugiere que el 4-NQO es un agente oxidativo potente

Expuestas las posibles hipótesis por las cuales el LYCO no presentó el efecto protector esperado en este estudio *in vivo* se propone que se estudien sus actividades quimiopreventivas junto con otro tipo de antioxidantes, como las vitaminas C y E, las cuales se han observado que ayudan a estabilizar algunos productos de la interacción radical carotenoide peroxilo (Young *et al.*, 2001 y Shi *et al.*, 2007). También se sugiere realizar los protocolos de co y pos-tratamiento de LYCO, para determinar más sobre la interacción de este carotenoide y el 4-NQO.

Interacción LYCO/H₂O₂

Interesantemente los resultados obtenidos del LYCO/H₂O₂, no presentaron ningún tipo de efecto en la prueba SMART, contrario a lo obtenido en otros trabajos en donde se observa una protección contra esta ROS (Scolastici *et al.*, 2007 y Scolastici *et al.*, 2008; Ríos *et al.*, 2009). Sin embargo en las distribuciones del tamaño de los clones se observaron diferencias significativas en la interacción de LYCO 0.9 µM/ H₂O₂, lo cual indica que sí hubo una interacción que está afectando al ciclo celular. Por lo anterior se propone que se realice un protocolo en el que se evalué la sobrevivencia de las larvas alimentándolas con LYCO/H₂O₂, así como determinar que fase o fases de la división celular se están alterando.

CONCLUSIONES:

- El testigo positivo H_2O_2 no incrementó la frecuencia de manchas por individuo en este modelo, pero sí moduló la división celular.
- Los testigos LYCO no incrementaron la frecuencia de manchas, pero sí modularon la división celular.
- El testigo LYCO $1.8\mu M$ /agua redujo la tasa de mutación espontánea.
- Los pre-tratamientos de LYCO a las concentraciones ($0.45\mu M$ y $0.9\mu M$) aumentaron el daño ocasionado por el mutágeno 4-NQO ($2mM$).
- Las interacciones LYCO/ H_2O_2 no modificaron la frecuencia de clones mutantes por individuo, aunque LYCO $0.45\mu M$ / H_2O_2 produjo una alteración en la división celular.

REFERENCIAS

- Arellano L. M. R. Modulación del daño producido por parte de la Vitamina/FeSO₄ en función de los niveles de CYP450 en *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura FES-Iztacala. México. 2008; 91 p.
- Arima Y., C. Nishigori, T. Takeuchi, S. Oka, K. Morimoto, A. Utani, Y. Miyachi. 4-Nitroquinoline 1-Oxide forms 8-hydroxydeoxyguanosine in human fibroblasts through reactive oxygen species. *Toxicol Scienc.* 2006; 91(2): 382-392.
- Atessahin A., S. Yilmaz, I. Karahan, A. Osman y A. Karaoglu. Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicol.* 2005; 212: 116–123.
- Aust O., N. Ale-Agha, L. Zhang, H. Wollersen, H. Sies y W. Stahl. Lycopene oxidation product enhances gap junctional communication. *Food Chemi Toxicol.* 2003; 41: 1399-1407.
- Avello M. y M. Suwalsky. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea 494.* 2006; 161-172.
- Bailleul B., P. Daubersies, S. Galiègue-Zouitina y M.-H. Loucheux-Lefebvre. *Jpn J Cancer Res.* 1989; 80: 691-697.
- Balachandran B. y A. Rao. Time-dependent uptake and antiperoxidative potential of lycopene in multilamellar liposomes. *Food Res Internat.* 2003; 36: 611-616.
- Begoña O. A., F. Granado y I. Blanco. Carotenoides y salud humana. *F.E.N., Unid Vit, Sec Nutr.* 2001; 11-63.

- Bird R. P., H. H. Draper y P. K. Basrur. Effect of malonaldehyde and acetaldehyde o cultured mammalian cells. Production of micronuclei and chromosomal aberrations. *Mut Res.* 1982; 101: 237-246.
- Blaglow J. E., B. E. Jacobson y O. F. Nygaard. Metabolic reduction of 4- Nitroquinoline N-Oxide and other radical-producing drugs to oxygen-reactive intermediates. *Cancer Res.* 1977; 37: 3306-3313.
- Bramley P. M. Is lycopene beneficial to human health? *Phytochem.* 2000; 54: 233-236
- Breemen R. y N. Pajkovic. Multitargeted therapy of cancer by lycopene. *Cancer Lett.* 2008; 269: 339-351.
- Breinholt V., S.T. Lauridsen, B. Daneshvar y J. Jakobsen. Doses-response effects of lycopene on selected drug-metabolizing and antioxidant enzymes in the rat. *Cancer Lett.* 2000; 154: 201-210.
- Brink A., I. Richter, U. Lutz, P. Wanek, H. Stopper y W. K. Lutz. Biological significance of DNA adducts: comparison of increments over background for various biomarkers of genotoxicity in L5178Y tk+/- mouse lymphoma cells treated with hydrogen peroxide and cumene hydroperoxide. *Mut Res.* 2009; 678: 123-128.
- Britton G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* 1995; 9: 1551-1558.
- Burgess L.C., E. Rice, T. Fischer, J. R. Seekins, T. P. Burgess, S. J. Sticka y K. Klatt. Lycopene has limited effect on cell proliferation in only two of seven human cell lines (both cancerous and

noncancerous) in an in vitro system with doses across the physiological range. *Toxicol in vitro*. 2008; 22: 1297–1300.

- Camera E., A. Mastrofrancesco, C. Fabbri, F. Daubrawa, M. Picardo, H. Sies y W. Stahl. Astaxanthin, canthaxanthin and β -carotene differently affect UVA-induced oxidative damage and expression of oxidative stress-responsive enzymes. Publicado en línea DOI:10.1111/j.1600-0625.2008.00790.x en www.blackwellpublishing.com/EXD.
- Carrapeiro M.M., J. Donato., R.C. ConÇalves, M.L.G. Saron, H. T. Godoy y I. A. Castro. Effect of lycopene on biomarkers of oxidative stress in rats supplement with ω -3 polyunsaturated fatty acids. *Food Res Internat*. 2007; 40: 939-946.
- Castañeda P. L., M.E. Heres y I.E. Dueñas. *Drosophila melanogaster*: un modelo experimental. FES Iztacala. México. 2008. 86 p.
- Chen L., L. Liu. J. Yin, Y. Luo y S. Huang. Hydrogen peroxide – induced neuronal apoptosis is associated with inhibition protein phosphatase 2A and 5, leadins to activation of MAPK pathway. The Internat. *J of Biochem Cell Biol*. 2009; 41: 1284-1295.
- Desesso J. M., A. L. Lavin, S. M. Hsia y R. D. Mavis. Assessment of the carcinogenicity associated with oral exposures to hydrogen peroxide. *Food and Chemi Toxicol*. 2000; 38: 1021-1041.
- dos Anjos F. A.L., K.-J. Yeum, R. M. Russell, N. I. Krinsky y G. Tang. Enzymatic and oxidative metabolites of lycopene. *J Nutr Biochem*. 2004; 15: 493-502.

- Duarte T. L., G. M. Almeida y G. D.D. Jones. Investigation of the role of extracellular H₂O₂ and transition metal ions in the genotoxic action of ascorbic acid in cell culture models. *Toxicol Lett.* 2007; 170: 57-65.
- Dueñas I.E. Efecto mutagénico y recombinogénico de la P-Fenilenediamina y la O-Fenilenediamina, mediante la prueba de mutación somática en alas de *Drosophila melanogaster* Cruzas E y BE. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. México. 2002. pp 16-22.
- Dueñas, I. E., M. E. Heres, P. L. Castañeda y U. Graf. Easy raising of *Drosophila melanogaster* on a medium consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. *Dros Inf Serv.* 2002; 84: 166.
- En línea fecha de acceso 8 de septiembre del 2011, disponible en: http://www.uv.es/jcastell/Metabolismo_de_xenobioticos.pdf DONAT O.
- Fernández-Ruiz V., M. Cámara y J. C. Quintela. Ingredientes bioactivos del tomate: el licopeno. *Nutr Clin Diet Hosp.* 2007; 27(3): 36-40.
- Ferreira de A. M. C., D. Gomes, L. M. da Silva, S. Vitorino, J. Alvarez y M. A. Vieira. Immunohistochemical evaluation of metallothionein in palatal mucosal cells of mice treated with 4NQO. *Med Oral Patol Oral.* 2006; 11: E315-318.
- FlyBase. En línea fecha de acceso 8 de septiembre del 2011, disponible en: <http://www.flybase.bio.idiana.edu>.

- Fornelli F., A. Leone, I. Verdesca, F. Minervini, G. Zacheo. The influence of lycopene on the proliferation of human breast cell line (MCF-7). *Toxicol in vitro*. 2007; 21: 217–223.
- Frankel E. N. y W. E. Neff. Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products. *Biochim Biophys Acta*. 1983; 754: 264-270.
- Frei H. y F. Würgler. Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutag*. 1996; 11(4): 315-325.
- Friedberg C. E., G. C. Walker, W. Siede, R. D. Wood, R. A. Shultz, T. Ellenberger. DNA repair and Mutagenesis. Edt. ASM PRESS. Washington D. C. 2006. pp 663-665.
- Frölich F. E. y F. Würgler. New tester strains with improved high bioactivation capacity for the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res*. 1989; 216: 179–187.
- Fronza G, P. Campomenosi, R. Iannone y A. Abbondandolo. The 4-nitroquinoline-1-oxide mutational spectrum in single stranded DNA is characterized by guanine to pyrimidine transversions. *Nucleic Acids Res*. 1992; 20: 1283-1287.
- Furukawa H., K. Kawai y T. M. Yazawa. Low-level chemiluminescence from *Drosophila melanogaster* fed with hydrogen peroxide. *Mut Res*. 1993; 292(3): 263-264.
- Gaivão I., L. M. Sierra y M. A. Comendador. The w/w+SMART assay of *Drosophila melanogaster* detects the genotóxico effects of

- reactive oxygen species inducing compounds. *Mut Res.* 1999; 440: 139-145.
- Giovannucci E., Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and Cancer: review of the epidemiologic literature. *J of the National Cancer Inst.* 1999; 91(4): 318-331.
 - Graf U., S.K. Abraham, J. Guzmán-Rincón y F. E. Würgler. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res.* 1998; 402: 203–209
 - Graf U., F. E. Würgler, A. J. Katz, H. Frei, H. Juon, C. B. Hall y P.G. Kale. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Envirom Mutag.* 1984; 6: 153-188.
 - Greenwald P., C.K. Clifford y J.A. Milner. Dieta y prevención del cáncer. *Europ J Cancer.* 2001; 1: 365-382.
 - Halliwell B., y J.M.C Gutteridge. Free radicals in Biology and Medicine. 4ta ed., Oxford. 2007. pp 174-179.
 - Heber D., Q. Lu. Overview of Mechanisms of Action of Lycopene. *Society for Experim Biol and Med.* 2002; 920-923.
 - Heres-Pulido M. E., S. Lombera-Hernández, I. Dueñas-García, I. Perales-Canales, L. Castañeda-Partida, C. Rocha-Ortiz, S. Flores-Maya, A. Durán-Díaz y U. Graf. Genotoxicity of triasulfuron in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is modulated by winter wheat seedlings. *Mut Res.* 2008; 653: 70–75.
 - Heres-Pulido M. E.I. y A.N. Castañeda. Flujo de la información Genética: 1 Dogma central de la biología molecular. México. 2008. pp 75-81.

- Heres-Pulido M.E., I. Dueñas-García, L. Castañeda-Partida, A. Sánchez-García, M. Contreras-Sousa, A. Durán-Díaz y U. Graf. Genotoxicity of tamoxifen citrate and 4-nitroquinoline-1-oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutag*. 2004; 19(3): 187-193.
- Hernández-García D., C. D. Wood, S. Castro-Obregón y L. Covarrubias. Reactive oxygen species: A radical role in development? *Free Biol Med*. 2010; 49: 130-143.
- Hussein D. Histological and immunohistochemical evaluation of the chemopreventive role of lycopene in tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline-1-oxide. *Arch of oral Biol*. 2011; 56: 664-671
- Hwang E.-S. y P. E. Bowen. Effects of lycopene and tomato paste extracts on DNA and lipid oxidation in LNCaP human prostate cancer cells. *Biofact*. 2005; 23(2): 97-105.
- INEGI. En línea fecha de acceso 3 de diciembre del 2009, disponible en [http:// www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx).
- Jackson M. J., S. Papa, J. Bolaños, R. Bruckdorfer, H. Carlsen, R. M. Elliott, J. Flier, H. R. Griffiths, S. Heales, B. Holst, M. Lorusso, E. Lund, J. Ø. Moskaug, U. Moser, M. Di Paola, M. C. Polidori, A. Signorile, W. Stahl, J. Viña-Ribes y S. B. Astley. Antioxidants, reactive oxygen and nitrogen species, gene induction and mitochondrial function. *Molec Asp of Med*. 2002; 23: 209-285.
- Kaya B., A. Creus, A. Velásquez, A. Yanikoglu y R. Marcos. Genotoxicity is modulated by ascorbic acid. Studies using the wing spot test in *Drosophila*. *Mutat Res*. 2002; 520(1-2): 93-101.

- Kawai K. y H. Furukawa. Oxidative damage of *Drosophila melanogaster* fed with hydrogen peroxide. *Mut Res.* 1995; 334(3): 385-427.
- Khachik F., G. R. Beecher y J.C. Smith. Luteín, Lycopene, and their oxidative metabolites in chemoprevention of cancer. *J Cel Bioch Supl.* 1995; 22: 236-246.
- Kiefer C., E. Sumser, M. F. Wernet, y J. von Lintig. A class B scavenger receptor mediates the cellular uptake of carotenoids in *Drosophila*. *PNAS.* 2002; 99(16); 10581-10586.
- Kitano M. Host genes controlling the susceptibility and resistance to squamous cell carcinoma of the tongue in a rat model. *Pathol Internat.* 2000; 50: 353-362.
- Kohda K., Y. Kawazoe, Y. Minoura y M. Tada. Separation and identification of N4 (guanosin-7-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide, a novel nucleic acid adduct of carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Cancer Res.* 1991.
- Kondo S. A test for mutation theory of cancer: carcinogenesis by misrepaired of DNA damaged by 4-Nitroquinoline 1 oxide. *Br. J Cancer.* 1977; 35: 595-601.
- Konigsberg F. M. Radicales libres y estrés oxidativo: Aplicaciones médicas. Edit. El Manual Moderno. México. 2008. pp 3-277.
- Lo H. M., C. F. Hung, Y. L. Tseng, B.H. Chen, S. Jian y W.B. Wu. Lycopene binds PDGF-BB and inhibits PDGF-BB-induced intracellular signaling transduction pathway in rat smooth muscle cells. *Biochem Pharm.* 2007; 74:54 –63.

- Lowe G.M., K. Vlismas y A. J. Young. Carotenoids as prooxidants? *Molec Asp Med.* 2003; 24: 363-369.
- Martínez M. A. Carotenoides. Universidad de Antioquia, Medellín 2003; 2-10.
- McNulty H. P., J. Byun, S. F. Lockwood, R. F. Jacob y R. Preston. Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis. *Biochim et Biophys Act.* 2007; 1768: 167–174.
- Melo-Cavalcante A. A., J. N. Picada, G. Rubensam y J. A. P. Henriques. Antimutagenic activity cashew apple (*Anarcadium occidentale* Sapindales, Anarcadiaceae) fresh juice and processed juice (cajuína) against methyl methanesulfonate, 4-Nitroquinoline N-oxide and benzo[a]pyrene. *Genet and Molec Biol.* 2008; 31(3): 759-766.
- Miller J. N., J. Sampson, L.P. Candeias, P. M. Bramley y C. A. Rice-Evans. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett.* 1996; 384: 240-242.
- Miquel J. y A. Ramírez-Bosca. Estrés oxidativo y suplementación antioxidante de la dieta en el envejecimiento, la aterosclerosis y la disfunción inmunitaria. *Ars Pharm.* 2004; 45(2): 91-109.
- Mirzayans R., S. Bashir, D. Murray y M.C. Paterson. Inverse correlation between p53 protein levels and DNA repair efficiency in human fibroblast strains treated with 4-nitroquinoline 1-oxide: evidence that lesions other than DNA strand breaks trigger the p53 response. *Carcinog.* 1999; 20(6): 941-946.

- Moreira R. R., D. J. Moura, M. I. S. Melecchi, R. Santos, M. Françoise, E. Bastos, J. A. Pêgas, A. L. L. de Paula y J. Saffi. Protective effects of *Hibiscus tiliaceus* L. methanolic extract to V79 cells against cytotoxicity and genotoxicity induced by hydrogen peroxide and tert-butyl-hydroperoxide. *Toxicol in vitro*. 2007; 21: 1442-1452.
- Moriya M. Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-Oxoguanine in DNA induces targeted G•C→T•A transversions in simian kidney cells. *Proc Natl Acad Sci*. 1993; 90: 1122-1126.
- Müller K., K. L.H. Carpenter, I. R. Challis, J. N. Skepper y M. J. Arends. Carotenoids induce apoptosis in the T-lymphoblast cell line Jurkat E6.1. *Free Rad Res*. 2002; 36(7): 791-802.
- Nagao T., N. Ikeda, S. Warnakulasuriya, H. Fukano, H. Yuasa, M. Yano, H. Miyazaki y Y. Ito. Serum antioxidant micronutrients and the risk of oral leukoplakia among Japanese. *Oral Onc*. 2000; 36: 466-470.
- Negishi T., H. Nakano, A. Kitamura, C. Itome, T. Shiotani y H. Hayatsu. Inhibitory activity of chlorophyllin on the genotoxicity of carcinogens in *Drosophila*. *Cancer Lett*. 1994; 83: 157-164.
- Nikolić B., D. Mitić-Ćulafić, B. Vuković-Gačić y J. Knežević-Vukčević. Modulation of genotoxicity and DNA repair by plant monoterpenes camphor, eucalyptol and thujone in *Escherichia coli* and mammalian cells. *Food and Chem Toxicol*. 2011; 49: 2035-2045.

- Periago M. J., I. Martínez-Valverde, G. Ros, C. Martínez, G. López. Propiedades químicas, biológicas y valor nutritivo del licopeno. *An Vet (MURCIA)*. 2001; 17: 51-66.
- Pineda A. D., M. Salucci, R. Lázaro, G. Maiani y A. Ferro-Luzzi. Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. *Rev. Cubana Aliment Nutr* 1999; 13(2): 104-111.
- Plant N. *Molecular Toxicology*. Edt. Advanced Text. 2003.149 p.
- Ramel C., J. Magusson. Modulation of genotoxicity in *Drosophila*. *Mut Res*. 1992; 267: 221-227.
- Ramos I.M.L., C. M. Batista, B. C. Gómez y A. L. Zamora. Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Redalyc*. 2006; 8(1): 1-10.
- Rao V. A. y S. Agarwal. Effect of diet and smoking on serum lycopene and lipid peroxidation. *Nutr Res*. 1998; 18(4): 713-721.
- Rao V. A. y S. Agarwal. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. 2000; 19(5): 563-569.
- Rao V. A. y S. Agarwal. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review. *Nut Res*. 1999; 19(2): 305-323.
- Rios A. O., L. M. G. Antunes y M. L. P. Bianchi. Bixin and lycopene modulation of free radical generation induced by cisplatin-DNA interaction. *Food Chem*. 2009; 113: 1113-1118.
- Rodríguez A. R. Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos. 4ed. Edt. La ciencia para todos/124. México. 2003. 95 p.

- Röhrdanz E. y R. Kahl. Alterations of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide. *Free Radic Biol & Med.* 1998; 24(1): 27–38.
- Romero G. E. Determinación del efecto antigenotóxico del arégano cimarrón (*Poliomintha longiflora*) en la Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en *Drosophila melanogaster*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. México. 2011. pp 21-22.
- Sahin K., M. Onderci, N. Sahin, M. F. Gursu, F. Khachik y O. Kucuk. Effects of lycopene supplementation on antioxidant status, oxidative stress, performance and carcass characteristics in heat-stressed Japanese quail. *J of Therm Biol.* 2006; 31: 307–312.
- Sánchez A., L.B. Flores-Contera, E. Langley, R. Martín, G. Maldonado y S. Sánchez. Carotenoides: estructura, función, biosíntesis, Regulación y aplicaciones. *Rev Lat Microb.* 1999; 41: 175-191.
- Scolastici C., R.O. Alves de Lima, L.F. Barbisan, A.L. Ferreira, D.A. Ribeiro, D.M.F. Salvadori. Lycopene activity against chemically induced DNA damage in chinese hamster ovary cells. *Toxicol in vitro.* 2007; 21: 840-845.
- Scolastici C., Alves de Lima R.O., Barbisan L.F., Ferreira A.L., Ribeiro D.A. y Salvadori D.M. Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test. *Toxicol in vitro.* 2008; 22(2): 510-514.
- Shi J., Q. Qu, Y. Kakuda, S. Xue., Y. Jiang, S. Koide y Y. Y. Shim. Investigation of the antioxidant and synergistic activity of lycopene and other natural antioxidants using LAME and AMVN model systems. *J of Food Comp and Analysis.* 2007; 20: 603–608.

- Singh M., R. Krishanappa, A. Bagewadi y V. Keluskar. Efficacy of oral lycopene in the treatment of oral leukoplakia. *Oral Oncol.* 2004; 40: 591-596.
- Spasojević I., A. Bajić, K. Jovanović, M. Spasić y P. Andjus. Protective role of fructose in the metabolism of astroglial C6 cells exposed to hydrogen peroxide. *Carbohydr Res.* 2009; 344: 1676-1681.
- Srinivasan M., N. Devipriya, K.B. Kalpana y V. P. Lycopene: An antioxidant and radioprotector against gamma-radiation-induced cellular damages in cultured human lymphocytes. *Toxicol.* 2009; 262(1): 43-49.
- Stahl, W., H. Sies. Lycopene: a biologically important carotenoid for humans. *Arch of Biochem and Biophys.* 1996; 336: 1–9.
- Tang L., H. Guan, X. Ding, J.-S. Wang. Modulation of aflatoxin toxicity and biomarkers by lycopene in F344 rats. *Toxicol and Applied Pharmacol.* 2007; 219: 10-17.
- Tanuma J.-i, M. Hirano, Y. Hirayama, I. Semba, K. Ogawa, H. Shisa, H. Hiai y M. Kitano. Genetic predisposition to 4NQO- induced tongue carcinogenesis in the rat. *Med Princ Pract.* 2005; 14: 297-305.
- Thayer W. S. Role of catalase in metabolism of hydrogen peroxide by the perfused rat heart. *FEBS* 3767. 1986; 202(1): 137-140.

- Thummel C. S. Molecular mechanisms of developmental timing in *C. elegans* and *Drosophila*: Review. *Develop Cell*. 2001; 1: 453-465.
- Venereo G. J.R. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Milit*. 2002; 31(2): 126-33.
- Vertzoni M., T. Kartezini, C. Reppas, H. Archontaki y G. Valsami. Solubilization and quantification of lycopene in aqueous media in the form of cyclodextrin binary systems. *Internat J of Pharm*. 2006; 309: 115–122.
- Vitale A. A., E. A. Bernatene y A. B. Pomilio. Carotenoides en quimiopreención: licopeno. *Bioquím Clín Latinoam*. 2010; 44(2): 195-238.
- Waliszewski K. N. y Blasco G. Propiedades nutraceuticas del licopeno. *Salud publ Méx*. 2010; 52(3): 254-265.
- Wang H. y L. K. Leung. The carotenoid lycopene differentially regulates phase I y II enzymes in dimethylbenz[α]anthracene induced MCF-7 cells. *Nutr*. 2010; 26: 1181-1187.
- Wang X., K. Jiao y G. Li. Electrochemical sensing the genotoxicity of Cu₂O nanocubes activated by hydrogen peroxide electro-generated on the surface of Au nano particles. *Electrochim Acta* (2011), doi:10.1016/j.electacta.2010.12.064.
- Wilkey J. F., G. Buchberger, K. Saucier, S.M. Patel, E. Eisenberg, H. Nakagawa, C. Z. Michaylira, A. K. Rustgi y S. M. Mallya. Cyclin D1 overexpression increases susceptibility to 4-Nitroquinoline-1-oxide-

induced dysplasia and neoplasia in murine squamous oral epithelium. *Molec Carcinog.* 2009; 48: 853-861.

- Yeh S. L. y Hu M. L. Antioxidant and pro-oxidant effects of lycopene in comparison with β -carotene on oxidant-induced damage in Hs68 cells. *J Nutr Biochem.* 2000; 11: 548–554.
- Yeh S.L., C.S. Huang y M.L. Hu. Lycopene enhances UVA induced DNA damage and expresión of heme oxygenase-1 in cultured mouse embryo fibroblasts. *Eur J Nutr.* 2005; 44(6): 365-370.
- Young A. J. y G.M. Lowe. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys.* 2001; 385(1): 20-27.
- Zhang L.-X., R.V. Cooney y J. S. Bertram. Carotenoids up-regulate connexin 43 gene expression independent of their provitamin A or antioxidant properties. *Cancer Res.* 1992; 52: 5707-5712.
- Zhang H., E. Kotake-Nara, H. Ono y A. Nagao. A novel cleavage product formed by autoxidation of lycopene induces apoptosis in HL-60 cells. *Free Radic Biol.* 2003; 35(12): 1653-1663.
- Zuo W., L. Zhu, Z. Bai, H. Zhang, J. Mao, L. Chen y L. Wang. Chloride channels involve in hydrogen peroxide-induced apoptosis of PC12 cells. *Biochem and Biophys Res Communic.* 2009; 387:666-670.

ANEXO 1

Drosophila melanogaster

El nombre de *Drosophila* proviene del griego "amor al rocío" y *melanogaster*, por la "barriga oscura" en el macho. Comúnmente se le ha denominado como la mosca de la fruta o del vinagre. Es un díptero que tiene cuatro pares de cromosomas: los sexuales que son el Y (submetacéntrico) y el X (acrocéntrico); los cromosomas 2 y 3 (metacéntricos), cada uno con un brazo derecho (R) e izquierdo (L), y el cromosoma 4, pequeño y con apariencia de punto. Este organismo es utilizado como modelo biológico en genética, biología del desarrollo, ecología, evolución, estadística, toxicología, neurobiología (Castañeda *et al.*, 2008) debido a que su genoma ha sido completamente secuenciado y el 60% de los 289 genes de las enfermedades humanas son similares en *Drosophila melanogaster*. También este insecto comparte dos familias de CYPs450 similares a las de vertebrados (CYP4 y CYP6) (Adams *et al.*, 2000; FlyBase, 2011).

Otra de las ventajas para trabajar con *D. melanogaster*, es que tiene un ciclo de vida corto (Figura 15), ya que puede durar desde 10 días a 25 °C y 65% de humedad relativa (Petitpierre, 1997; Castañeda *et al.*, 2008). Su ciclo comienza con la ovoposición, cada hembra deposita alrededor de 600 a 800 huevos en sus 40-60 días de vida, después de la fertilización, del huevo eclosiona la larva que pasa por el primer estadio (24h), segundo estadio (48 h), tercer estadio (72 h), durante estas fases la ingesta de alimento es continua, llegando a consumir de 3 a 5 veces su peso; esta etapa (larva) ha sido de gran interés para estudios en genética toxicológica ya que presenta una gran sensibilidad a las toxinas (Clark, 1982). A las 96 h inicia la transformación de la larva de tercer estadio a pupa, hasta completar las 120 h del ciclo. Durante su metamorfosis, se sintetiza la hormona ecdisona (Thummel, 2001) (hormona de la metamorfosis), la cual es convertida a C₂₀

hidroxiecdisona en su forma activa por los CYP450s, esta forma estimula a los genes de las células indiferenciadas de los discos imaginales² (Figura 16), los cuales son los encargados de formar los tejidos y estructuras presentes en el adulto. Cinco días después (240 h) emerge el imago, que posteriormente extenderá sus alas y se volverá sexualmente activo, siendo esta su etapa adulta (Castañeda *et al.*, 2008).

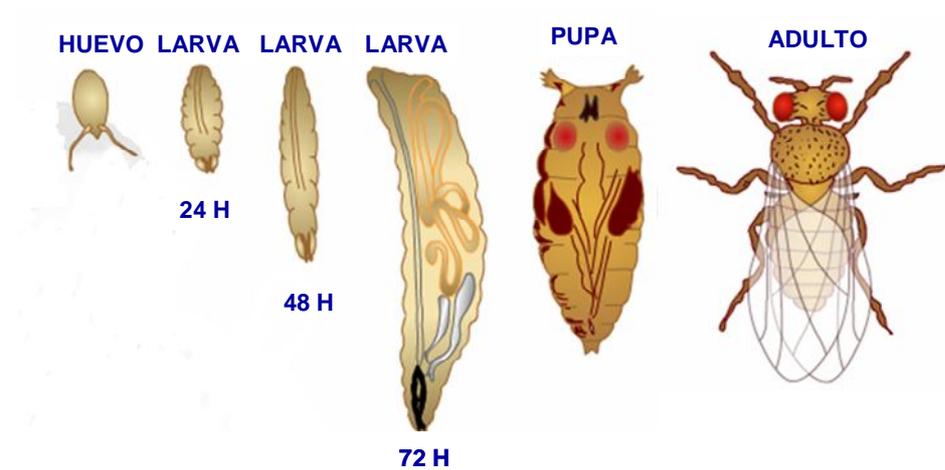


Fig. 15. Ciclo de vida de *D. melanogaster*

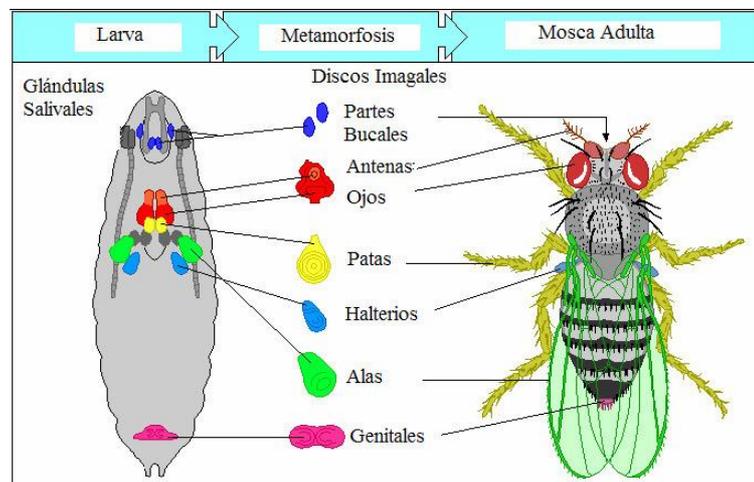


Fig.16 Formación de estructuras a partir de los discos imaginales

² Son bolsas epiteliales que presentan linajes celulares indiferenciados. Estas bolsas al inicio constan de 25 a 50 células, las cuales irán aumentando durante la mitosis.

Prueba SMART en ala

La Prueba de Recombinación Somática es un bioensayo de lapsos cortos que es capaz de detectar una gran variedad de genotoxinas (Würgler y Vogel, 1986, citado en Frei *et al.*, 1996; Ramel *et al.*, 1996) y agentes antigenotóxicos (Graf *et al.*, 1998) consiste en la pérdida de heterocigocis de genes marcadores en las células de los discos imaginales de las larvas de *D. melanogaster*, por la acción de agentes químicos o físicos. Estos efectos son observados por la aparición de clones o manchas mutantes que consisten en tricomas mal formados (expresión de los marcadores). Las machas originadas pueden ser simples (pequeñas o grades) y gemelas, las cuales pudieron ser originadas por mutaciones puntuales, aneuploidías, deleciones y recombinación mitótica (Figura 17a y b); se necesita de una sola generación y permite analizar 25, 000 células por ala (Graf *et al.*, 1984).

Para esta prueba se usan dos marcadores que afectan la apariencia de los tricomas de las alas:

Múltiple wing hair (mwh): es una mutación recesiva homocigótica viable, localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-0.3), que en homocigosis produce tricomas múltiples por célula (2-5) en lugar de un solo tricoma de la forma silvestre (Lindsley, 1992 citado Graf *et al.*, 1998)

flare (flr³): Es una mutación recesiva que se expresa como tricomas malformados y cortos con apariencia de roseta de maíz. Esta localizada en el abrazo izquierdo del cromosoma 3 en la posición 38.8. Se conocen tres alelos para este locus:

1) *Bd^s* (Beaded-Serratia): las moscas que lo poseen presentan muescas en el borde de las alas. Este marcador dominante se utiliza para reconocer a las líneas *flare* y Oregon *flare*, que en condición homocigota es letal. Se localiza en el cromosoma 3 (3-92.5).

2) *In(3LR)TM3* (Inversión (3 left, right) Third Multiple 3). Cromosoma balanceador de los marcadores *flr³* y *Bd^f* (de las líneas *flare* y Oregon *flare*), que presenta tres inversiones, dos paracéntricas (L y R) y una pericéntrica (L+R), que impiden recuperar eventos no deseables, producto de la recombinación meiótica y permiten mantener las líneas con los marcadores letales en heterocigosis (Lindsley, 1992 citado en Graf *et al.*, 1998)

3) OR(R) ("Oregon resistant"): la línea Oregon *flare* fue construida por Frölich y Würigler en 1989. Presenta los cromosomas 1 y 2 de la línea Oregon *R(R)* resistente al DDT localizada en la región 43 E, (2-65), que provoca la expresión constitutiva de una proteína inductora de los genes *Cyp* (*Cyp6a8* y *Cyp6a9* del cromosoma 1 y *Cyp6a2* del cromosoma 2). Esta mutación confiere en consecuencia la resistencia a insecticidas (DDT e insecticidas organofosforados en larvas y adultos), incremento general en el MX, permitiendo valorar la activación *in vivo* de promutágenos (Saner *et al.*, 1996).

Cruzas

Esta prueba propone dos tipos de cruzas la estándar (CE) (Graf *et al.*, 1989) con niveles regulados de CYP450 y bioactivación eleva (CBE) (Graf y van Schaick, 1992) con sobreexpresión de esta enzima. La CE consiste en hembras vírgenes "flare": *flr³/TM3, Bd^f* y machos *mwh/mwh*, mientras que la CBE hembras vírgenes de la línea "Oregon flare" (*ORR (1); ORR (2); flr³/TM3, Bd^s*) y machos *mwh/mwh*. La descendencia de estas cruzas se presenta en la siguiente tabla (Dueñas, 2002):

Tabla 9. Descendencia de las CE y CBE

Gametos:	♂	Genotipo	Fenotipo
♀	<i>mwh, flr³⁺</i>		
<i>mwh⁺, flr³</i>	<i>mwh, flr³⁺ / mwh⁺, flr³</i>	Transheterocigoto	Ala silvestre
<i>TM3, Bd^f</i>	<i>mwh, flr³⁺ / TM3, Bd^f</i>	Heterocigoto para <i>mwh</i> , homocigoto para <i>flr³⁺</i>	Ala serratia
<i>ORR(1); ORR(2); mwh⁺, flr₃</i>	<i>ORR(1)/+; ORR(2)/+; mwh, flr³⁺ / mwh⁺, flr³</i>	Transheterocigoto	Ala silvestre con sobreexpresión de CYP450
<i>ORR(1); ORR(2); TM3, Bd^f</i>	<i>ORR(1)/+; ORR(2)/+; mwh, flr³⁺ / TM3, Bd^f</i>	Heterocigoto para <i>mwh</i> , homocigoto para <i>flr³⁺</i>	Ala serratia con sobreexpresión de CYP450

Distribución del tamaño de los clones mutantes

El tamaño de las manchas analizadas refleja el número de divisiones celulares que ocurrieron después de la inducción del daño en la célula afectada original, por lo que puede ser indicador indirecto de la actividad del compuesto y de la velocidad con que alcanza la célula blanco; así también indica si existe algún problema con la mitosis o si ocurrió muerte celular, la cual se vería reflejada por la disminución en el tamaño de las frecuencias. Los tamaños de la mancha corresponden a un número de divisiones (n) que va de 2⁰ a 2ⁿ células, por lo que las clases del tamaño de clones se agrupan de la siguiente manera: 1, 2,3-4.5-8,9-16,17-32, 33-65 células (Graf *et al.*, 1984).

1 CÉLULA MITOSIS 2 CÉLULAS

MANCHAS RESULTANTES

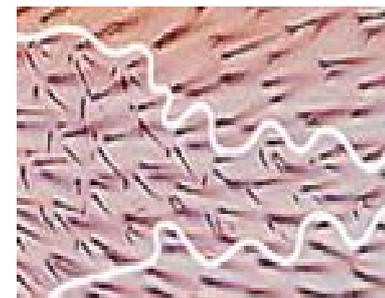
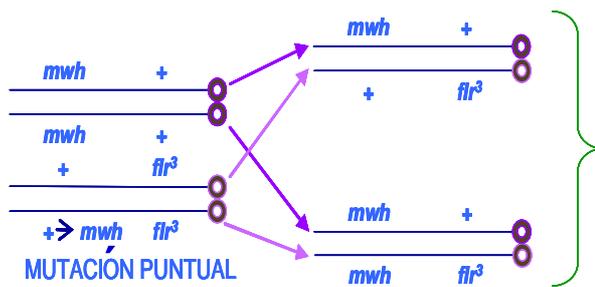
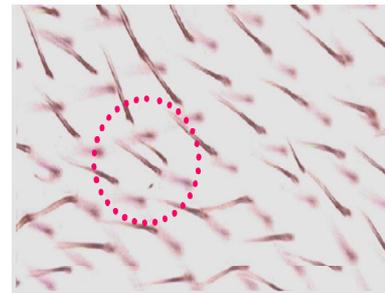
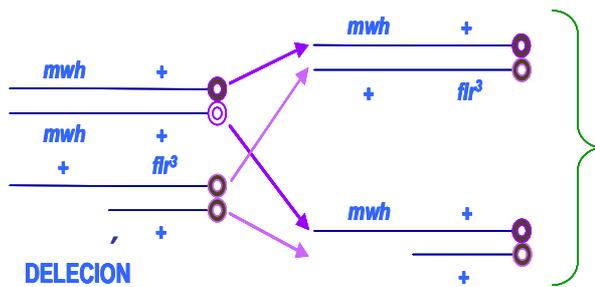
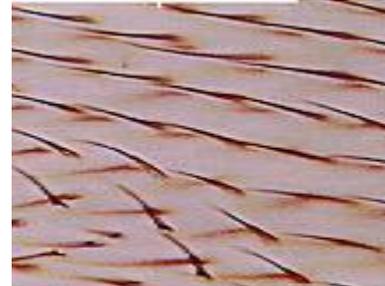
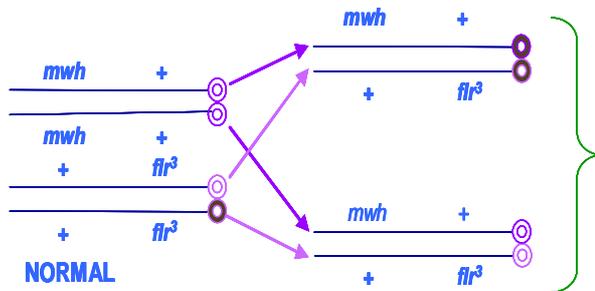


Fig 17 a. Eventos que causan la pérdida de heterocigosis para los marcadores *fir³* y *mwh* en SMART en ala.

1 CÉLULA MITOSIS 2 CÉLULAS

MANCHAS RESULTANTES

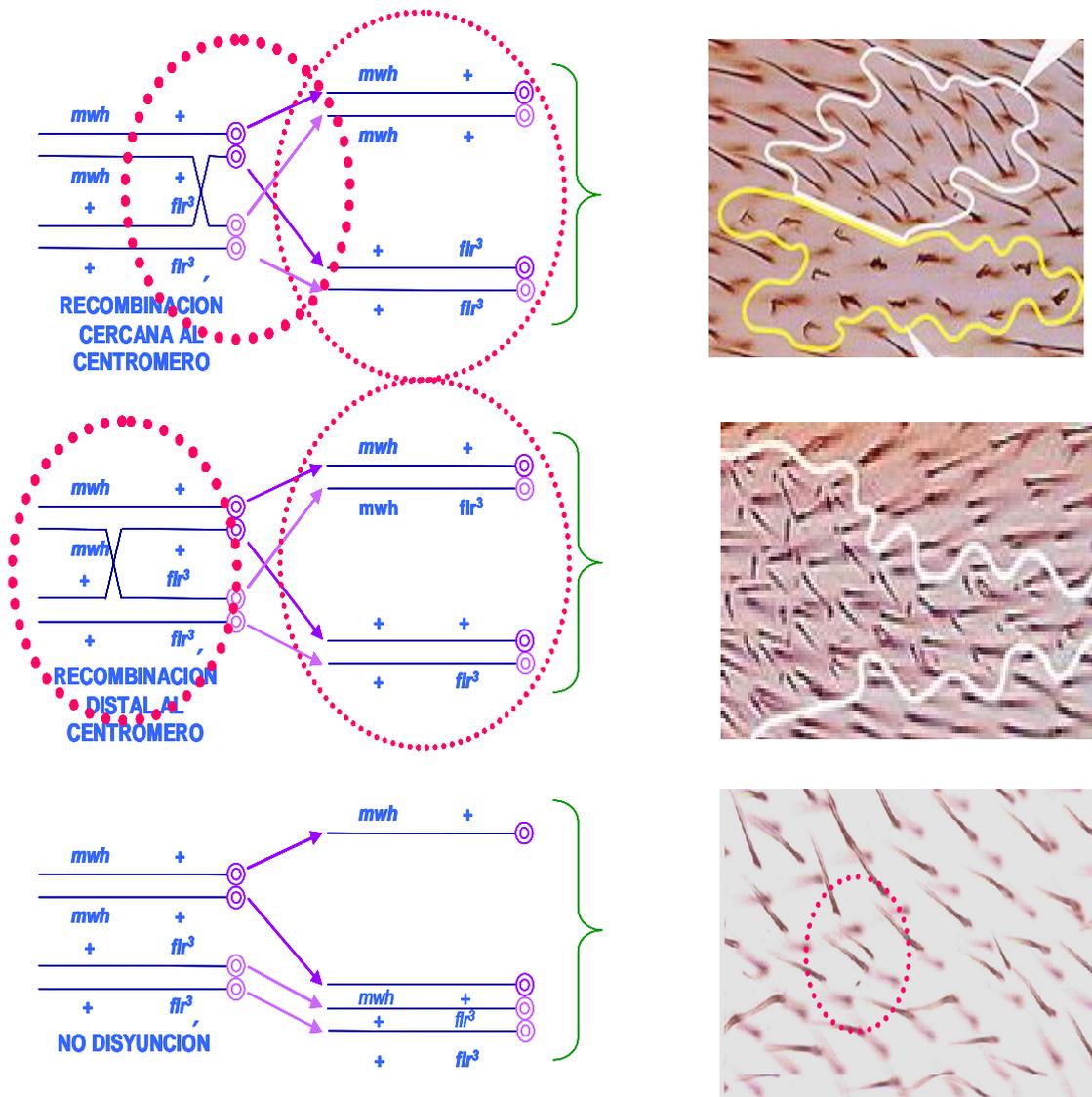


Fig 17 b. Eventos que causan la pérdida de heterocigosis para los marcadores *flr³* y *mwh* en SMART en ala.

ANEXO 2

Prueba Kolmogorov-Smirnov

Tabla 10. Resultados de la prueba Kolmogorov-Smirnov

		Kolmogorov- Smirnov
Agua vs:	P-nivel	
acetona-hexano/agua	P < 0.025	S
acetona-hexano/acetona	P < 0.005	S
agua/H ₂ O ₂	P < 0.005	S
Acetona-hexano/acetona vs:		
acetona-hexano/4-NQO	P < 0.005	S
LYCO 0.45µM/acetona	P < 0.005	S
LYCO 0.9µM/acetona	P > 0.10	NS
LYCO 1.8µM/acetona	P < 0.005	S
Acetona-hexano/4-NQO vs:		
LYCO 0.45µM/4-NQO	P < 0.005	S
LYCO 0.9µM/4-NQO	P < 0.025	NS
LYCO 1.8µM/4-NQO	P < 0.10	NS
Acetona-hexano/H₂O₂ vs:		
LYCO 0.45µM/ H ₂ O ₂	P > 0.10	NS
LYCO 0.9µM/ H ₂ O ₂	P < 0.005	S
LYCO 1.8µM/ H ₂ O ₂	P < 0.10	NS
Acetona-hexano/agua vs:		
Acetona-hexano/H ₂ O ₂	P < 0.005	S
LYCO 0.45µM/agua	P < 0.005	S
LYCO 0.9µM/agua	P < 0.005	S
LYCO 1.8µM/agua	P < 0.005	S

Diagnóstico estadístico donde S: significativo (P < 0.05) y NS: no significativo