

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA



“EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL LICOPENO SOBRE METIL METANOSULFONATO Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN SMART EN ALA DE *Drosophila melanogaster* (CRUZA BE)”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

L I C E N C I A D A E N B I O L O G Í A

P R E S E N T A:

LUCERO BEATRIZ ARCOS TORRES



Directora de tesis
M. en C. Ma. Eugenia Isabel Heres y Pulido.

Los Reyes Iztacala, 2013.

Dedicatoria

A ti que ya no estas a mi lado, pero que siempre fuiste un ejemplo a seguir, que hasta en los momentos más difíciles supiste salir airoso, gracias por enseñarme el valor de la vida. Gracias por compartir un pedacito de tu gran experiencia conmigo, te quiero mucho abuelito†.

Dedicatorías

PARA TI AMOR

Que has estado conmigo en la etapa más importante de mi vida y también has sido pieza clave en este nuevo éxito. Gracias por tus consejos, tus regaños, tu tiempo, pero sobre todo, gracias por caminar a mi lado y ser mi apoyo en los momentos más difíciles, TE AMO.

A MIS PADRES LUZ MARÍA TORRES Y GRACIANO ARCOS

Que siempre han estado conmigo en las buenas y malas, por apoyarme siempre que los necesité, ustedes han sido parte fundamental de este nuevo logro, gracias por enseñarme lo importante que es ser mejor cada día, los quiero mucho.

A MIS HERMANOS CARLOS DANIEL, MALENY LLAMIRET, OSCAR IVÁN Y LUIS ROBERTO

Por esas peleas tan divertidas y por ser mi espejo cada vez que yo desistía, los quiero mucho.

A MIS HERMOSOS SOBRINOS SANTIAGO, LITZA, GUSTAVO, KEVIN Y VALERIA

Por brindarme nuevas experiencias, por poner a prueba mi paciencia y mi cariño, los quiero mucho.

A TODA MI FAMILIA, TÍOS, PRIMOS Y A MI ABUELITA GUADALUPE MUÑOZ

Quienes estuvieron de alguna manera al pendiente del desarrollo de este trabajo, en especial a las familias Arcos Torres y Ascensión Arcos por su apoyo en los momentos más difíciles.

A MIS AMIGOS DE TODA LA VIDA, VERÓNICA, JULIO, VALDEMAR, JUAN ANTONIO, FERNANDO, CÉSAR Y FRANCISCO

Quienes compartieron sus alegrías, sus tristezas y sus triunfos conmigo. Gracias chicos por formar parte de mi vida y por estar cuando más los he necesitado.

A TI HERMANITA ADOPTIVA Y A TU FAMILIA

Quienes sin pensarlo me ofrecieron su apoyo y un rinconcito en su casa. Gracias amiga por desvelarte conmigo en la etapa más difícil de la carrera, por dejarme llorar en tu hombro y por recordarme siempre que debía seguir adelante a pesar de todo. Gracias Veritos por tu apoyo incondicional.

A MIS AMIGOS DE CARRERA, ALE, JOEL, NOÉ, CLAUDIA, JULIO, LUIS, CINDI, SAÚL, GRACIELA, ADRIANA Y ÁNGELES

Por hacer más llevadera esta larga travesía, por esas divertidas prácticas de campo y por esos ratos amenos en clases y fuera de ellas.

Agradecimientos

A DIOS

Por todas sus bendiciones y por la fortaleza que día a día me da.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Por permitirme ser parte de esta máxima casa de estudios.

A MIS PADRES

Por hacerme la mujer que ahora soy, por sus consejos y regaños, pero sobre todo por su gran cariño.

A LA M. EN C. MARÍA EUGENIA I. HÉRES Y PULIDO

Mi madre académica durante mi estancia en el laboratorio de Genética Toxicológica. Gracias profesora por todo su apoyo, paciencia y dedicación en este proyecto, por sus consejos, sus regaños y su amistad.

A LOS DOCTORES ANA MARÍA GARCÍA BORES, RICARDO MEJÍA ZEPEDA Y SAÚL FLORES MAYA

Por participar en la revisión de esta tesis, por sus consejos y apoyo para poder culminar este trabajo. Gracias por su tiempo y dedicación.

A LAS M. EN C. IRMA ELENA DUEÑAS Y LAURA CASTAÑEDA

Por sus consejos, su apoyo y su amistad en mi paso por este laboratorio.

AL M. EN C. ÁNGEL DURÁN

Por su importante participación en este trabajo, asesorándome en la parte estadística.

AL DR. CÉSAR FLORES

Por su asesoría en la parte química de esta tesis. Gracias Dr. Por su tiempo y apoyo.

A LA PINTORA LUZ MARÍA GARCÍA ORDOÑEZ

Por su apoyo y paciencia incondicional durante toda la carrera. Gracias por brindarme sus consejos y sobre todo su amistad.

A todas las personas que de una u otra forma estuvieron presentes en la realización de este éxito. Gracias.

A LA VIDA

Por brindarme todas las cosas hermosas que alguien pueda necesitar, por las derrotas, por los triunfos, por las alegrías, por las tristezas y porque no, por el simple hecho de ser.

¡¡Muchas gracias!!

Índice General

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Licopeno.....	3
Antecedentes.....	5
Metabolismo xenobiótico.....	5
Fase I.....	6
Fase II.....	7
Fase III.....	8
Peróxido de hidrógeno.....	8
Metil metanosulfonato.....	10
<i>Drosophila melanogaster</i>	11
Prueba de mutación y recombinación somáticas.....	13
Justificación.....	14
Hipótesis.....	14
Objetivo general.....	14
Objetivos particulares.....	14
Material y Métodos.....	15
Químicos.....	15
Prueba de genotoxicidad (SMART).....	15
Cultivo y propagación de las líneas Oregon-flare y multiple wing hairs.....	15

Colecta de huevos.....	15
Diseño experimental.....	16
Dissección, montaje y revisión de alas.....	17
SMART en ala.....	18
Resultados.....	20
Discusión.....	35
Testigos agua y acetona.....	35
Tratamientos con LYCO.....	35
Testigo MMS.....	36
Tratamiento Act-Hex/MMS.....	36
Tratamientos LYCO/MMS.....	37
Testigo H ₂ O ₂	38
Tratamientos LYCO/H ₂ O ₂	39
Conclusiones.....	40
Recomendaciones.....	41
Referencias.....	42
Anexo 1 (Eventos genéticos).....	52
Anexo 2 (Líneas y marcadores).....	54
Anexo 3. (Cruza Bioactivación Elevada).....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AAPH: 2, 2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride

AMVN: 2, 2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile)

AP: Sitio del DNA sin base nitrogenada (púrica o pirimídica)

BER: Sistema de reparación por escisión de bases

Bd^s: Marcador *Beaded Serratia*

CE: Cruza estándar

CBE: Cruza bioactivación elevada

CL₅₀: Concentración letal media

CP: Ciclofosfamida

CYP450s: Citocromos P450

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

Fe/NTA: Nitrilotriacetato férrico

flr³: Marcador flama "*flare*"

GAP: Uniones comunicantes entre célula y célula

GSH: Glutación reducida

GST: Glutación S-transferasa

HR: Humedad relativa

K-S: *Kolmogorov-Smirnov*

LYCO: Licopeno

MIC: Medio instantáneo carolina

MMS: Metil metanosulfonato

MX: Metabolismo xenobiótico

***mwh*:** Marcador *multiple wing hairs* (Tricomias múltiples en ala)

N7-MeG: N7-metilguanina

N3-MeA: N3-metiladenina

NADPH: Fosfato de dihidronicotinamida-adenindinucleótido

O⁶-MeG: O⁶-metilguanina

ORR: Línea Oregon, resistente al DDT

ROS: *Reactive Oxygen Species* (Especies reactivas de oxígeno)

SMART: Prueba de mutación y recombinación somáticas

TM3: Gen balanceador con triple inversión en el cromosoma tres

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del LYCO.....	4
Figura 2. Estructura química del MMS.....	10
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	12
Figura 4. Efecto del tratamiento agua/agua sobre la frecuencia de manchas/individuo con respecto al tratamiento Act-Hex/agua.....	21
Figura 5. Frecuencia acumulada de la distribución de clones <i>mwh</i> de los tratamientos agua vs Act-Hex/agua.....	21
Figura 6. Efecto del disolvente sobre la frecuencia y tipos de manchas/individuo con respecto a los tratamientos LYCO 0.45, 0.9 y 1.8 μ M/agua.....	23
Figura 7. Frecuencia acumulada de la distribución de clones <i>mwh</i> de los tratamientos Act-Hex/agua vs LYCO/agua.....	23
Figura 8. Relación polinómica en la respuesta concentración LYCO.....	24
Figura 9. Efecto del tratamiento Act-Hex/agua sobre la frecuencia y tipo de manchas/individuo con respecto a los tratamientos Act-Hex/MMS o agua/MMS.....	26
Figura 10. Frecuencia acumulada de la distribución de clones <i>mwh</i> de los tratamientos Act-Hex/agua vs MMS	26
Figura 11. Efecto del tratamiento Act-Hex/MMS sobre la frecuencia y tipos de manchas/individuo con respecto a los tratamientos LYCO 0.45, 0.9 y 1.8 μ M/MMS.....	27
Figura. 12. Frecuencia acumulada de la distribución de clones <i>mwh</i> de los tratamientos Act-Hex/MMS vs LYCO/MMS.....	28

Figura 13. Relación lineal en la respuesta concentración del LYCO.....	29
Figura 14. Frecuencia y tipos de manchas/individuo con respecto a los tratamientos agua/MMS vs. Act-Hex/MMS.....	29
Figura 15. Frecuencia acumulada de la distribución de clones <i>mwh</i> de los tratamientos agua/MMS vs Act-Hex/MMS.....	30
Figura 16. Efecto del tratamiento Act-Hex/agua sobre la frecuencia y tipos de manchas/individuo con respecto al tratamiento Act-Hex/H ₂ O ₂	31
Figura 17. Frecuencia acumulada de la distribución de clones <i>mwh</i> de los tratamientos Act-Hex/agua vs Act-Hex/H ₂ O ₂	32
Figura 18. Efecto del tratamiento sobre las frecuencias y tipos de manchas/individuo del testigo Act-Hex/H ₂ O ₂ vs. LYCO 0.45, 0.9 y 1.8 μ M/H ₂ O ₂	34
Figura 19. Frecuencia acumulada de la distribución de clones <i>mwh</i> de los tratamientos Act-Hex/H ₂ O ₂ vs LYCO H ₂ O ₂	34
Figura 20. Eventos genéticos que ocasionan la pérdida de heterocigosis, en los marcadores <i>flr</i> ³ y <i>mwh</i> en <i>Drosophila melanogaster</i>	52
Continuación figura 20.....	53

Lista de cuadros

Cuadro 1. Pretratamientos con LYCO, agua o Act-Hex y tratamientos con MMS, agua o H ₂ O ₂	17
Cuadro 2. Resumen de los resultados obtenidos con SMART y su diagnóstico estadístico después del pretratamiento agudo (6 h) con agua o Act-Hex y tratamiento crónico (42 h) con agua a larvas de tercer estadio de <i>Drosophila melanogaster</i>	20
Cuadro 3. Resumen de los resultados obtenidos con SMART y su diagnóstico estadístico después del pretratamiento agudo (6 h) con Act-Hex o LYCO y tratamiento crónico (42 h) con agua a larvas de tercer estadio de <i>Drosophila melanogaster</i>	22
Cuadro 4. Resumen de los resultados obtenidos con SMART y su diagnóstico estadístico después del pretratamiento agudo (6 h) con Act-Hex, agua o LYCO 0.45, 0.9 y 1.8 µM y tratamiento crónico (42 h) con agua o MMS a larvas de tercer estadio de <i>Drosophila melanogaster</i>	25
Cuadro 5. Resumen de los resultados obtenidos con SMART y su diagnóstico estadístico después del pretratamiento agudo (6 h) con Act-Hex y tratamiento crónico (42 h) con agua o H ₂ O ₂ a larvas de tercer estadio de <i>Drosophila melanogaster</i>	31
Cuadro 6. Resumen de los resultados obtenidos con SMART y su diagnóstico estadístico después del pretratamiento agudo (6 h) con Act-Hex o LYCO 0.45, 0.9 y 1.8 µM y tratamiento crónico (42 h) con H ₂ O ₂ a larvas de tercer estadio de <i>Drosophila melanogaster</i>	33
Cuadro 7. Marcadores que se expresan en el ala de <i>Drosophila melanogaster</i>	56

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL LICOPENO SOBRE METIL
METANOSULFONATO Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN SMART EN ALA DE
Drosophila melanogaster (CRUZA BE).

Resumen

Los seres vivos están expuestos a diversos agentes físicos y químicos, que pueden llegar a provocar daños tóxicos y/o genotóxicos. Los efectos genotóxicos: mutagénicos, recombinogénicos y clastogénicos de diversos agentes se estudian ampliamente, pero es importante encontrar compuestos que inhiban, retarden, reviertan o prevengan estos daños. Los alimentos componentes de la dieta, pueden ser pieza clave para revertir el daño producido por la exposición a cancerígenos y por activación/desintoxicación de agentes químicos. Es el caso del licopeno (LYCO), β -caroteno acíclico con actividad antioxidante y propiedades antiproliferativas. El objetivo de este trabajo fue evaluar con SMART en ala de *Drosophila melanogaster*, Cruza Bioactivación Elevada (CBE), con expresión alta de CYP450s, el pre-tratamiento LYCO con el pos-tratamiento MMS o H₂O₂, para lo cual se propagaron las líneas Oregon-flare y multiple wing hairs; se realizó la CBE con hembras vírgenes Oregon-flare y machos multiple wing hairs. A larvas de 72 \pm 4 h, se les aplicaron pre-tratamientos de 6 h con LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μ M), agua miliQ y acetona (2% v/v)/hexano (0.17 μ L/mL) en oscuridad y 25°C. Las larvas pre-tratadas se trasvasaron a tubos con 0.5 g de Medio Carolina y 2 mL de MMS (0.5mM) o agua miliQ. Se colectaron ~55 imagos/tratamiento en EtOH 70%. Se hicieron preparaciones permanentes con alas silvestres y se revisaron a 40x. Con el PC SMART se evaluaron estadísticamente las frecuencias de las manchas por individuo. Los resultados débiles o indecisos se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney-Wilcoxon y la frecuencia acumulada de la distribución de clones *mwh* con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los resultados indicaron que el LYCO no disminuyó el daño provocado por el MMS, ni el H₂O₂. Los tratamientos LYCO 0.9 y 1.8 μ M/MMS, Act-Hex/MMS y LYCO 0.45 y 0.9 μ M/H₂O₂ incrementaron el daño con respecto a los tratamientos con Act-Hex. Los tratamientos Act-Hex/MMS, LYCO 0.9 μ M/agua, LYCO 0.45, 0.9 y 1.8 μ M/MMS, LYCO 0.45, 0.9 y 1.8 μ M/H₂O₂ afectaron la división celular.

Palabras clave: *Drosophila melanogaster*, licopeno, metil metanosulfonato, peróxido de hidrógeno, SMART.

INTRODUCCIÓN

Los seres vivos en la actualidad están expuestos a diversos agentes físicos y químicos, que en algunos casos pueden provocar daño tóxico y/o genotóxico. Estos agentes son los llamados xenobióticos, es decir, agentes extraños al cuerpo. El crecimiento vigoroso de la industria y el desarrollo de la civilización humana, produce un incremento en mutaciones genéticas y un alto riesgo de padecer enfermedades degenerativas como el cáncer; es por esto que la exploración de compuestos que poseen propiedades antimutagénicas y anticancerígenas es de gran importancia (Odin, 1997). Para ello, es necesario realizar estudios de genotoxicidad, los cuales tengan como objetivo principal determinar qué tipo de daño se produjo en el DNA y cómo es que actúa el agente genotóxico en estudio (Sánchez *et al.*, 2000). Los efectos genotóxicos: mutagénesis, recombinogénesis y clastogénesis de diversos agentes se han estudiado ampliamente y por lo mismo es importante encontrar compuestos que inhiban, retarden, reviertan o prevengan estos daños (Lehman *et al.*, 2000).

Por esta razón, los alimentos ingeridos en la dieta, pueden ser pieza clave para revertir el daño producido ya sea por la exposición a cancerígenos y por activación/desintoxicación de agentes químicos, así como la inducción de la apoptosis (Ferguson *et al.*, 2004).

Para el presente trabajo se decidió evaluar el efecto del carotenoide licopeno en contra de los efectos del metil metanosulfonato (MMS) y del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), mediante la prueba en ala de *Drosophila melanogaster*. Las razones para ello fueron las propiedades anticancerígenas y antioxidantes reportadas para el LYCO tanto *in vitro* como *in vivo* (Stahl y Sies, 1996; Agarwal y Rao, 2000; Ye y Hu, 2000; Zhang *et al.*, 2003; Scolastici *et al.*, 2007) y que el MMS es un compuesto que de manera indirecta produce especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) (Rowe *et al.*, 2008). Por otra parte se decidió

utilizar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como testigo oxidante, ya que pertenece al grupo de las ROS (Venereo 2002; Miquel y Ramírez-Bosca, 2004; Ramos *et al.*, 2006) y de acuerdo a Horváthová *et al.* (1997), el H_2O_2 causa estrés oxidativo por la generación de radicales hidroxilo ($\cdot OH$).

Licopeno

Los efectos mutagénicos o carcinogénicos provocados por compuestos químicos, podrían ser impedidos por algunos componentes en la dieta como las frutas y los vegetales, los cuales tienen ciertas sustancias químicas como: carotenoides, flavonoides, terpenos, isotiocianatos y fitoesteroles. Los carotenoides son pigmentos naturales, sintetizados por plantas y algunos microorganismos, responsables en parte del color de los mismos (Lee y Chen, 2002; Rao *et al.*, 2003).

El licopeno (LYCO) es un β -caroteno presente en algunos vegetales como el jitomate, es soluble en grasa e insoluble en agua, no puede ser sintetizado por el organismo y debe adquirirse a través de la dieta. Posee 40 átomos de carbono con 11 dobles enlaces conjugados y dos no conjugados (Figura 1), esta característica le confiere una potente actividad antioxidante al tener la capacidad de atrapar radicales libres (Rao y Agarwal, 1999) y reaccionar con ROS (Rao y Agarwal, 1998). Los demás tipos de carotenoides se derivan a partir de la estructura acíclica del LYCO (Waliszewski y Blasco, 2010). El LYCO se encuentra en la naturaleza en su forma isomérica *trans*, pero es susceptible a la luz, al oxígeno y al calor, lo que provoca cambios químicos tales como la generación de isómeros *cis*, oxidación y degradación (Rao *et al.*, 2003; Lee y Chen, 2002), tiene la habilidad de mejorar las uniones intracelulares de abertura (GAP *junction*) entre células epiteliales preneoplásticas y normales, incrementando la expresión de la proteína conexina 43 (Cx43). Esta actividad, se piensa que es uno de los mecanismos de protección relacionados con la actividad preventiva de cáncer (Fornelli *et al.*, 2007), ya que la

Antecedentes

Estudios *in vitro*, han demostrado que el LYCO tiene un alto potencial antioxidante lo cual ayuda a reducir el riesgo de padecer algunas enfermedades crónicas, incluyendo enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer (Bramley, 2000). Por otra parte, Guttenplan *et al.* (2001) investigaron el efecto del LYCO sobre la mutagénesis provocada por el benzo-a-pireno en colon, próstata y pulmón de ratas LacZ, encontrando que ésta fue reducida en próstata, pero incrementada en colon y pulmón, lo cual indica que hay una interacción con el tejido. Atessahin *et al.* (2005) realizaron estudios en ratas, a las que inyectaron 7 mg/Kg de cisplatino y 4 mg/Kg de LYCO, demostrando que éste protegió contra la nefrotoxicidad inducida por el cisplatino, redujo el daño de la oxidación lipídica, de proteínas y del DNA e incrementó los niveles de otros antioxidantes, como las vitaminas A y C. Además, el LYCO redujo de manera significativa las aberraciones cromosómicas inducidas por el Cisplatino en ratas macho (Sendão *et al.*, 2006).

Metabolismo xenobiótico

Los seres vivos requieren del suministro continuo de energía libre para realizar diversas funciones, como el movimiento, el transporte activo de moléculas e iones y la síntesis de macromoléculas estructurales. Estas transformaciones químicas no ocurren en una sola etapa, más bien se producen compuestos intermediarios, los cuales pueden o no realizar alguna función celular y ser eslabones de una cadena que conduce a la síntesis de algún compuesto estructural. Las moléculas que participan en estas reacciones o transformaciones se denominan metabolitos y al conjunto de las diferentes reacciones químicas que transforman los alimentos en componentes esenciales de la estructura celular se le denomina metabolismo intermedio.

El metabolismo de los compuestos exógenos, también llamados xenobióticos, se conoce como biotransformación que esencialmente es un mecanismo de desintoxicación, pero que en ocasiones puede ser un proceso de activación de compuestos inicialmente inertes a metabolitos intermediarios muy reactivos. Este tipo de metabolismo es un fenómeno dual en el que interviene tanto la activación como la desintoxicación.

En la mayoría de los casos los metabolitos intermediarios son bioinactivados y desintoxicados, pero en otros pueden provocar cambios fisiológicos y bioquímicos como consecuencia de una deficiente desintoxicación y/o reacción de los metabolitos intermediarios con los constituyentes celulares, lo cual produce diversos efectos tóxicos, desde daño celular hasta la muerte. La biotransformación es entonces el proceso mediante el cual un sustrato exógeno (compuesto xenobiótico), esencialmente poco soluble en agua, se convierte en un metabolito hidrosoluble y fácilmente excretable, consta de dos fases: la fase I y la fase II (Rodríguez, 2004), algunos autores como Changjiang *et al.* (2005), mencionan que la biotransformación también consta de una tercera fase, misma que se describirá más adelante.

Fase I

Se refiere a las reacciones que introducen grupos funcionales polares (-OH, -NH₂, -SH o -COOH) (Curtis-Watkins, 2001) a las moléculas, incluyen varias reacciones, tales como: hidrolisis, oxidación y reducción. Esta fase es catalizada principalmente por el sistema enzimático de los citocromos P450 (CYP450s) (Rodríguez, 2004), los cuales están formados por complejos de hierro-porfirina conocidos como grupo hemo, poseen una parte proteínica (apoproteína) y un grupo prostético donde se localiza el átomo de hierro que puede llevar una molécula de oxígeno o monóxido de carbono (Nelson y Cox, 2001). La concentración más alta de estas enzimas CYP450s se encuentra en el retículo

endoplásmico del hígado, habiéndose determinado esto en microsomas. La reacción básica catalizada por estos citocromos es la monooxigenación, en la cual un átomo de oxígeno se incorpora en un sustrato designado RH, y el otro se reduce hacia agua con equivalentes reductores derivados del NADPH:



De acuerdo a Curtis-Watkin (2001), el citocromo P450 cataliza varios tipos de reacciones de oxidación, entre ellas:

1. Hidroxilación de un carbono alifático o aromático.
2. Epoxidación de un doble enlace.
3. Oxigenación y *N*-hidroxilación de heteroátomo (*S*-, *N*- e *I*-).
4. Desalquilación de heteroátomo (*O*-, *S*- y *N*-).
5. Transferencia de grupo oxidativo.
6. Desdoblamiento de ésteres.
7. Deshidrogenación.

Fase II

Incluye reacciones de glucuronidación, sulfación, acetilación, metilación, conjugación con glutatión y conjugación con aminoácidos (como glicina, taurina y ácido glutámico). Los cofactores para estas reacciones interactúan con grupos funcionales que están presentes en el xenobiótico o se inducen/exponen durante la biotransformación de la fase I. Con excepción de la metilación y la acetilación, las reacciones de biotransformación fase II originan un incremento grande de la hidrofiliidad del xenobiótico, de modo que favorecen la excreción de sustancias químicas extrañas, ya que la metilación por lo general disminuye la hidrosolubilidad

de los xenobióticos y enmascara grupos funcionales como fenoles, catecoles, aminas alifáticas y aromáticas, *N*-heterocíclicos y compuestos que contienen sulfhidrilo; la acetilación al igual que la metilación enmascara una amina con un grupo no ionizante, de modo que muchos metabolitos *N*-acetilados son menos hidrosolubles que el compuesto original. La glucuronidación, sulfación, acetilación y metilación comprenden reacciones con cofactores activados o de “alta energía”, en tanto la conjugación con aminoácidos o glutatión abarca reacciones con xenobióticos activados (Curtis-Watkins, 2001).

En la mayoría de los casos, el metabolismo de los compuestos xenobióticos resulta en la desintoxicación, pero en otros, la biotransformación produce la activación de los sustratos, generándose así metabolitos intermedios que pueden ser tóxicos y/o carcinogénicos (Rodríguez, 2004).

Fase III

En esta fase ocurre la eliminación de los conjugados en la fase II, incluye transportadores membranales, tales como: proteínas ABC [P-glicoproteínas (P-gp), proteínas asociadas con la resistencia de multidroga (MRP) y polipéptido 2 transportador de aniones orgánicos (OATP2)], las cuales remueven de las células: drogas parentales, metabolitos y xenobióticos. Cabe aclarar que esta fase se lleva a cabo solo en eucariontes (Changjiang *et al.*, 2005).

Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se ha utilizado en diversos estudios de citotoxicidad, genotoxicidad y mutagenicidad en líneas celulares como: fibroblastos de pulmón V79 y de linfoma de ratón (L5178Y *tk+/-*) (Moreira *et al.*, 2007; Brink *et al.*, 2009). Duarte *et al.* (2007), encontraron 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. El H_2O_2 pertenece al grupo de las ROS, las cuales son

formadas por el propio organismo, ya que se producen a partir de procesos celulares (Venereo 2002; Miquel y Ramírez-Bosca, 2004; Ramos *et al.*, 2006). Cuando el H_2O_2 interactúa con algún metal de transición (comúnmente hierro) se forma el radical $\cdot OH$ mediante la reacción Fenton (Duarte *et al.*, 2007). El H_2O_2 causa estrés oxidativo por la generación de radicales $\cdot OH$ (Horváthová *et al.*, 1997). Furukawa *et al.* (1993) y Kawai y Furukawa (1995) también demostraron que el H_2O_2 (20 mM) no es genotóxico en la craza estándar de *Drosophila melanogaster* donde observaron incremento de estrés oxidativo midiendo la actividad de catalasas. Los autores consideraron que la función de las catalasas y los sistemas de reparación protegieron contra el daño oxidativo al DNA en *D. melanogaster*. Además, Nakamura *et al.*, 2003 demostraron que el H_2O_2 produce lesiones aldehydicas en el DNA (ADL, del inglés *Aldehydic DNA Lesions*) a concentraciones micro y milimolares *in vivo*.

Por todo lo anterior, en este trabajo se decidió utilizar al H_2O_2 como testigo positivo de oxidación. De acuerdo a Martínez (2012), el H_2O_2 tiene efecto tóxico en *D. melanogaster*, obteniendo una CL_{50} de 38 mM para la línea flare y 46 mM para Oregon-flare. Además concluyó que la concentración subtóxica (20 mM) modificó la proporción sexual y el ciclo de vida de *D. melanogaster*. Por otra parte, Cisneros (2012) y Hernández (2012), encontraron que el H_2O_2 afecta la división celular en *D. melanogaster* a la concentración subtóxica (20 mM) en la línea Oregon-flare.

Metil metanosulfonato

El metil metanosulfonato (MMS) (Figura 2), es un agente alquilante directo con dos grupos metilo, el cual puede provocar alquilaciones en las bases nitrogenadas del DNA (Beranek, 1990; Sobol *et al.*, 2007; Rigel *et al.*, 2011); es monofuncional porque sólo un metilo es donado a los N1, N3, N⁶ y N7 de la adenina, a los N1, N3, N7, N² y O⁶ de la guanina, a los N3, O² y N⁴ de la citosina y a los N3, O² y O⁴ de la timina. Produciendo principalmente incremento de N7-metilguanina (N7-MeG), N3-metiladenina (N3-MeA) y O⁶-metilguanina (O⁶-MeG) (Friedberg *et al.*, 1995; Jenkins *et al.*, 2005).

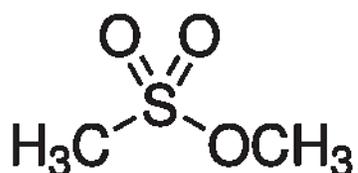


Fig. 2. Estructura química del MMS.

El MMS ha sido usado por muchos años como un agente representativo para causar daño al DNA en la investigación del cáncer y también se ha usado como tratamiento severo contra éste (Lee *et al.*, 2007). En cuanto al uso industrial, lo podemos encontrar en preparaciones de sustancias químicas y manufactura fina de químicos (Merck, 2012).

De acuerdo con Warren *et al.* (1999) y Jenkins *et al.* (2005), el sistema de reparación por escisión de bases (BER), interviene en la reparación de N7-MeG y N3-MeA, lo que determina la respuesta genotóxica del MMS. Este mecanismo implica la escisión de una o hasta siete bases del DNA por acción de glicosilasas que rompen el enlace glucosídico entre el C1 de la desoxirribosa y el N1 de las pirimidinas o el N9 de las purinas. Esto provoca la formación de sitios AP que activan a AP-endonucleasas, las cuales rompen un enlace azúcar-fosfato en los sitios 5' o 3' cercanos al daño; el siguiente paso en la reparación es la participación

de las exonucleasas (también llamadas dRpasas), las cuales eliminan los residuos del esqueleto azúcar-fosfato sin bases, DNA polimerasa que sintetizan el segmento faltante y ligasas que realizan el enlace covalente.

Jenkins *et al.* (2005) reportaron que el MMS induce alquilaciones de manera temprana en células MCL-5 debido a su acción directa. Franke *et al.* (2005) usando el ensayo cometa demostraron que las dosis de vitamina C (1 y 30 mg/Kg) en ratón, con MMS, ciclofosfamida (CP), sulfato de cobre y sulfato ferroso, mostraron que el daño causado al DNA por MMS fue reducido por la dosis menor de vitamina C.

Por otra parte Mangal *et al.* (2009), reportaron que el MMS (0.05 mM a 2.50 mM) no tuvo ningún efecto de tipo oxidante al analizar el marcador 7,8-Dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosina (8-oxo-dGuo) en células de la línea H358. Sin embargo, Rowe *et al.* (2008) observaron que el MMS (0.5 mM) puede causar bajos niveles de daño oxidativo de manera indirecta en *Saccharomyces cerevisiae*.

Drosophila melanogaster

La mosca de la fruta o del vinagre, *Drosophila melanogaster*, fue introducida como modelo biológico en Genética hace poco más de un siglo. Se ha utilizado en la investigación científica de disciplinas como: Genética, Biología del Desarrollo, Ecología, Etología, Evolución, Estadística, Toxicología y Neurobiología. Fue el zoólogo y embriólogo norteamericano Thomas Hunt Morgan quien la introdujo por primera vez, en 1909, como modelo biológico en genética, por su ciclo de vida corto (Figura 3), fácil cultivo, gran fecundidad y bajo costo de mantenimiento con fines de investigación en el Departamento de Zoología de la Universidad de Columbia, E.E.U.U. *D. melanogaster*, 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) y el cromosoma 4 es pequeño en forma de

punto (Castañeda, 2008). Algo que es importante tomar en cuenta, es que este insecto comparte dos familias de CYP450s similares a las de vertebrados (CYP4 y CYP6) (Adams *et al.*, 2000; FlyBase, 2012).

Reiter *et al.* (2001), compararon las secuencias de 929 genes humanos que codifican para enfermedades con la secuencia del genoma de *D. melanogaster*. Encontraron que 714 genes humanos son homólogos en su secuencia a 548 secuencias únicas en *D. melanogaster* (77%). Se anticipaba con ello promover la interacción entre los grupos de investigación que trabajan alguno de estos genomas para acelerar la comprensión de la patogénesis de enfermedades humanas.

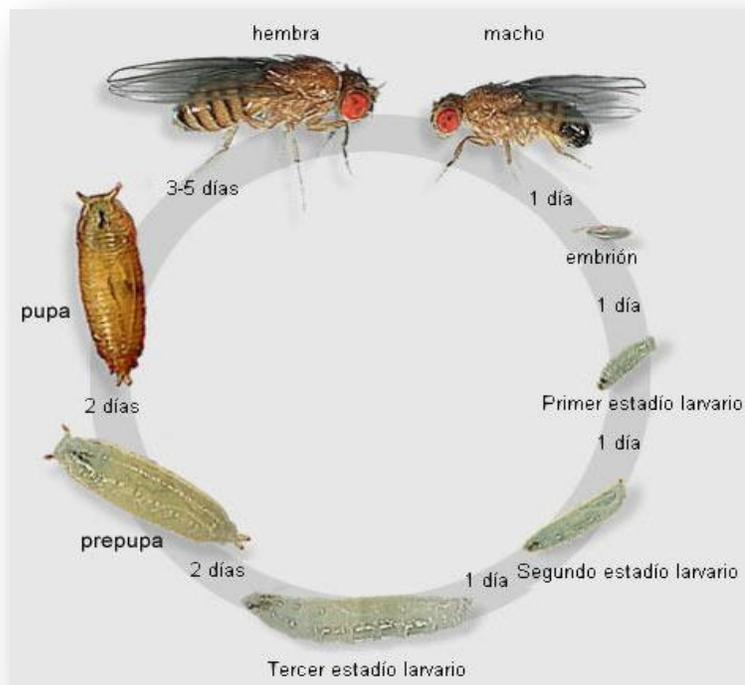


Fig. 3. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

Prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART)

La prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART, del inglés *Somatic Mutation And Recombination Test*), se basa en la pérdida de heterocigosis de genes marcadores que se expresan como clones o manchas de tricomas múltiples o mal formados, derivados de células mutantes en las alas de los organismos adultos de *D. melanogaster*. Lo anterior es ocasionado por la actividad genotóxica de compuestos que inducen eventos genéticos como: mutaciones puntuales, deleciones, recombinaciones somáticas y no-disyunción (Anexo 1). Para esta prueba se usan dos marcadores genéticos (Anexo 2): el marcador *multiple wing hairs (mwh)* y el marcador *flare (flr³)* (Graf *et al.*, 1984).

Los bioensayos realizados con *D. melanogaster* como lo es SMART son reconocidos por su gran ayuda en la investigación (Vogel *et al.*, 1999), ya que se realizan *in vivo* los tratamientos y el tejido graso de las larvas presenta la mayoría de las funciones enzimáticas que se efectúan en los hepatocitos humanos (Guzmán y Graf, 1995).

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad los seres vivos están expuestos a diversos agentes físicos y químicos, que en algunos casos pueden provocar daños tóxicos y/o genotóxicos, pero también existen compuestos naturales que pueden contrarrestar este tipo de daño al tener efectos anticancerígenos, antioxidantes y antimutagénicos como se ha reportado que ocurre con el LYCO, por lo que se decidió evaluar, en la cruce de bioactivación elevada (BE) el posible efecto antigenotóxico de este compuesto contra los tratamientos MMS y H₂O₂.

HIPÓTESIS

Como el LYCO tiene propiedades antimutagénicas, anticancerígenas y antioxidantes, se espera que este reduzca el daño provocado por el MMS y el H₂O₂, en larvas de tercer estadio de *Drosophila melanogaster*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar con SMART en ala de *Drosophila melanogaster* (cruza bioactivación elevada, BE) el pre-tratamiento LYCO y los pos-tratamientos MMS y H₂O₂.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Comparar el efecto del disolvente en la genotoxicidad del MMS.
- ❖ Determinar el efecto del LYCO en pre-tratamientos.
- ❖ Analizar el efecto del LYCO ante un mutágeno directo y un compuesto oxidante.

MATERIAL Y MÉTODOS

QUÍMICOS

Metil metanosulfonato (MMS) ($\text{CH}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$, CAS. 66-27-3, pureza 98%); licopeno (LYCO) a partir de tomate ($\text{C}_{40}\text{H}_{56}$, LYCO, CAS. 502-65-8, pureza $\geq 90\%$); peróxido de hidrógeno (H_2O_2), CAS. 7722-84-1, pureza 30%) y acetona (CH_3COCH_3 , CAS. 67-64-1, pureza 99.9%) adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); Medio instantáneo Carolina (MIC), adquirido en Carolina Biological Supply Company Burlington (NC. USA); Entellan® (CAS. 1.07961) y hexano ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$, CAS. 110-54-3, pureza 60-66% n-hexano) adquiridos en Merck (Darmstadt, Germany); solución conservadora (5 mL de Tegosept 12% (EtOH), 5 mL de ácido propiónico: ácido ortofosfórico (1:10) aforados a 1 L de agua) (Dueñas *et al.*, 2002).

Prueba de genotoxicidad (SMART)

Cultivo y propagación de las líneas Oregon-flare y multiple wing hairs

El cultivo y la propagación de las líneas Oregon-flare y multiple wing hairs (Anexo 2) se realizó en frascos de 250 mL con 5 g de puré de papa en hojuela y 20 mL de solución conservadora, en una incubadora a 25 °C, humedad relativa (HR) de 65% y total oscuridad.

Colecta de huevos

La cruce BE (Anexo 3) se realizó aislando hembras vírgenes Oregon-flare y machos multiple wing hairs; se mantuvo en frascos con 5 g de puré de papá en hojuela durante tres días, posteriormente se trasvasó a frascos con levadura fresca activada con sacarosa para coleccionar huevos durante 8 h en una incubadora a 25°C y HR de 65%; pasado este tiempo se retiraron a los adultos y los frascos con la colecta de huevos se regresaron a la incubadora. A las 72 ± 4 h de iniciar la colecta de huevos, se recuperaron las larvas de tercer estadio diluyendo

rápidamente la levadura con agua corriente y haciéndola pasar por una coladera de malla fina.

Diseño experimental

Los tres experimentos independientes que se realizaron con tres réplicas por tratamiento, constaron, cada uno, de un pre-tratamiento por 6 h con LYCO, los disolventes agua miliQ o acetona 2%-hexano y un pos-tratamiento con MMS [0.5mM] o H₂O₂ [20 mM], este último como testigo positivo de oxidación.

Pre-tratamientos: las larvas de 72 ± 4 h de edad se repartieron en diferentes tubos de plexiglás con una base de tela de organza que contenía 1 g de MIC pulverizado e hidratado con 18 mL de agua miliQ (agua), acetona 2%-hexano [0.17 μ L/mL] (Act-Hex) o LYCO a las concentraciones 0.45, 0.9 y 1.8 μ M, disuelto en Act-Hex. Debido a que el LYCO es fotosensible, los experimentos se realizaron en un cuarto oscuro con una lámpara de luz roja (15 W). Los pre-tratamientos se mantuvieron en una incubadora a 25°C, HR de 65% y total oscuridad por un lapso de 6 h. Las concentraciones de LYCO se determinaron con base en la concentración promedio que se ha determinado a nivel sanguíneo en personas que ingieren alimentos ricos en este compuesto (Burgess *et al.*, 2008).

Pos-tratamientos: transcurrido el pre-tratamiento con LYCO, agua o Act-Hex se recuperaron las larvas y se colocaron aproximadamente la misma cantidad de éstas en tubos de ensayo que contenían 0.5 g de MIC hidratado con 2 mL de agua, Act-Hex, MMS [0.5 mM] o H₂O₂ [20 mM], como se muestra en el cuadro 1. El tratamiento crónico se desarrolló por aproximadamente 42 h hasta que las larvas puparon. Los tubos se incubaron a 25°C y 65% de HR, hasta la emergencia de los imagos. Posteriormente se almacenaron los imagos en frascos con EtOH al 70%.

Cuadro 1. Pre-tratamientos con LYCO, agua o Act-Hex y pos- tratamientos con MMS, agua o H₂O₂.

Pre-tratamiento	LYCO	LYCO	LYCO	agua	Act 2%-Hex
6 h	0.45 µM	0.9 µM	1.8 µM	miliQ	[0.17µL/mL]
Pos-tratamiento					
42 h					
MMS [0.5 mM]					
H ₂ O ₂ [20 mM]					
agua					

Disección, montaje y revisión de alas

Las moscas hembras y machos con alas de tipo silvestre (*mwh +/+ flr³*) fueron seleccionadas en proporciones 1:1 y fueron colocadas en portaobjetos y, con ayuda de pinzas de relojero del número 5 se disectaron las alas para realizar preparaciones permanentes con Entellan®, dejándolas secar por un día. Para la lectura de las laminillas, a cada tratamiento se le puso una clave para evitar el prejuicio en la revisión y posibles resultados sesgados en el conteo de las manchas. La revisión de las alas se realizó en un microscopio fotónico a 40x, registrando el número y tipo de mancha de acuerdo con Graf *et al.* (1984).

SMART en ala

Por cada tratamiento se analizaron 60 individuos de acuerdo con Frei y Würgler (1995), porque es el tamaño de muestra óptimo para la prueba SMART PC-versión 2.1 que analiza estadísticamente los resultados, basándose en la prueba paramétrica de ji cuadrada para proporciones (de una cola), con un grado de libertad y una probabilidad de $p \leq 0.05$ (Frei y Würgler, 1988), detectando las diferencias que puedan existir entre los valores espontáneos entre un testigo y las series de tratamientos experimentales. En ésta, el efecto genotóxico es diagnosticado porque la frecuencia de manchas significativa de los tratamientos es al menos, el doble de la frecuencia obtenida en los testigos negativos. Esta frecuencia es $m = 2$ para las manchas pequeñas y totales y $m = 5$ para las manchas grandes y gemelas.

Los resultados con esta prueba tienen cuatro categorías: positivos, negativos, débiles positivos y no concluyentes con base en las siguientes hipótesis:

- ❖ Hipótesis nula (H_0): La frecuencia de mutación (inducida + espontánea), de los individuos tratados no es significativamente mayor a la frecuencia del testigo negativo.
- ❖ Hipótesis alternativa (H_a): La frecuencia de mutación (inducida + espontánea) de los individuos tratados es “m” veces mayor que la frecuencia del testigo negativo (Graf *et al.*, 1984). Donde “m”, es el factor de multiplicación utilizado para realizar este análisis estadístico, indicando cuantas veces debe incrementarse el número de eventos de los tratamientos con respecto al testigo para considerar una respuesta positiva.

Con esta prueba se tiene la posibilidad de definir un riesgo genotóxico mínimo inaceptable. Si se puede excluir este riesgo con una significancia estadística, entonces los resultados son negativos. Si la muestra no es lo suficientemente grande, los datos pueden ser insuficientes y el resultado es no concluyente; es decir, que en los casos no concluyentes no se puede excluir la hipótesis nula pero tampoco la alterna. Para evitar los resultados no concluyentes en al menos 95 % de los casos se recomienda revisar como mínimo 110 alas, es decir ~ 55 individuos, por tratamiento (Frei y Würigler, 1995). Cuando los resultados son débiles (w) o no concluyentes (i) se aplica la prueba no-paramétrica U de Mann-Whitney -Wilcoxon ($\alpha = \beta = 0.05$), la cual considera la variabilidad entre los individuos y no requiere una distribución normal de los datos con modificaciones para dos colas para datos individuales usando el programa STAT-Graphics versión 6.0.

Para el análisis de las distribuciones del tamaño de los clones *mwh*, que permite evaluar si hubo alteraciones en la división celular durante el desarrollo de los discos imagales de las alas, se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (K-S), que es una prueba no paramétrica que permite medir el grado de concordancia entre dos distribuciones, comparando las frecuencias acumuladas de una distribución con las de otra. Cuando el valor de $p \leq 0.05$ los resultados indican que hay diferencias significativas entre ambas distribuciones y por lo tanto una distribución es diferente de la otra, y esto demostraría un efecto en la mitosis de las células que formaron las alas.

Resultados

Al comparar el testigo negativo agua/agua contra el testigo Act-Hex/agua, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de manchas/ individuo (Cuadro 2 y Figura 4). Sin embargo, al comparar la frecuencia acumulada de la distribución de las manchas *mwh*, que indican el número de divisiones celulares que ocurrieron en los discos imagales de la larva y pupa, sí se encontraron diferencias significativas, lo que indica que en el pre-tratamiento agudo (6 h) con Act-Hex junto con el tratamiento crónico (42 h) con agua modificó la división celular (Figura 5).

Cuadro 2. Resumen de los resultados obtenidos con SMART y su diagnóstico estadístico* después del pretratamiento agudo (6 h) con agua o Act-Hex y tratamiento crónico (42 h) con agua a larvas de tercer estadio de *Drosophila melanogaster*.

Manchas por individuo (número de manchas) diagnóstico estadístico*						
Pre-tratamiento / Pos-tratamiento	Número de individuos	Manchas pequeñas (1-2 células) m=2	Manchas grandes (> 2 células) m=5	Manchas gemelas m=5	Manchas totales m=2	Clones <i>mwh</i>
Cruza bioactivación elevada (CBE)						
agua/agua	60	0.48 (029)	0.10 (006)	0.00 (00)	0.58 (035)	0.58 (035)
Act-Hex/agua	60	0.32 (019)	0.07 (004)	0.00 (00)	0.38 (023)	0.36 (022)
		-	-	-	-	

* Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988). Prueba de una cola. m= factor de multiplicación del riesgo mínimo para evaluar resultados negativos. Resultados: -, negativo; ($p < 0.05$).

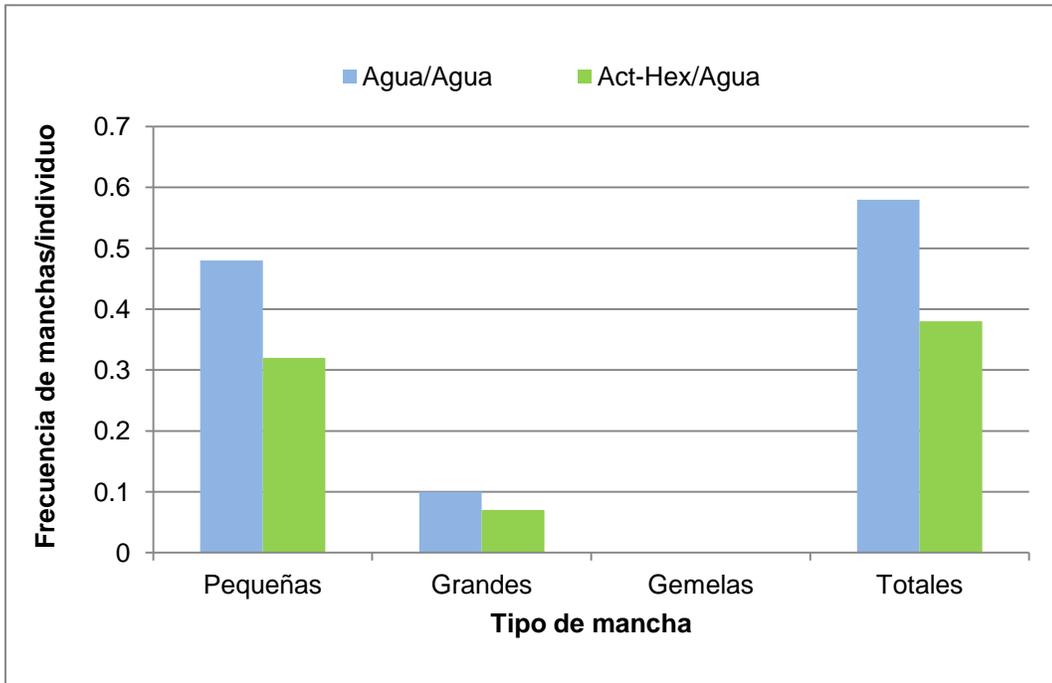


Fig. 4. Efecto del tratamiento agua/agua sobre la frecuencia de manchas/individuo con respecto al tratamiento Act-Hex/agua en larvas de *D. melanogaster* tratadas por 6/42 h respectivamente.

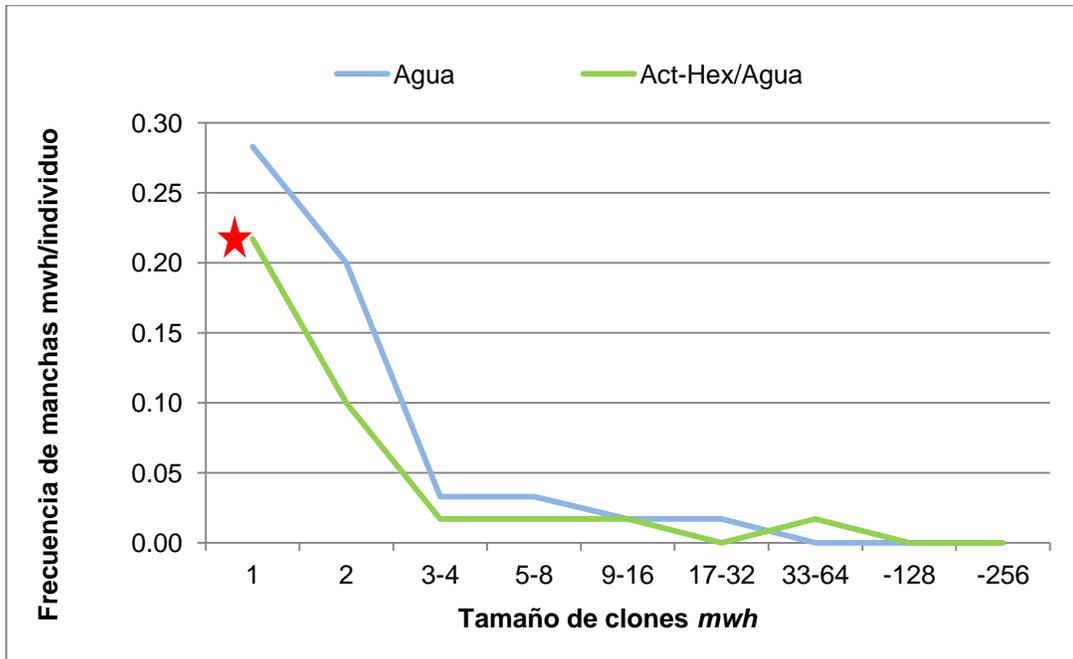


Fig. 5. Frecuencia acumulada de la distribución de clones *mwh* de los tratamientos agua vs Act-Hex/agua. ★ Valores significativos con la prueba Kolmogorov-Smirnov ($p \leq 0.05$).

Al comparar los tratamientos LYCO 0.45, 0.9 y 1.8 μM /agua vs Act-Hex/agua no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 3 y Figura 6). Sin embargo, de acuerdo a la prueba de Kolmogorov-Smirnov sí se encontraron diferencias significativas con el tratamiento LYCO 0.9 μM /agua por lo tanto, este compuesto afectó la división celular (Figura 7). Al graficar las frecuencias totales del tratamiento LYCO/agua (Figura 8) se obtuvo una relación concentración-respuesta polinómica expresada en la ecuación $y=0.2424x^2 - 0.5402x + 0.5702$ y un valor de $R^2= 0.97$ lo cual indica una tendencia a disminuir la tasa espontánea de mutación y recombinación, por efecto del LYCO.

Cuadro 3. Resumen de los resultados obtenidos con SMART y su diagnóstico estadístico* después del pretratamiento agudo (6 h) con Act-Hex o LYCO y tratamiento crónico (42 h) con agua a larvas de tercer estadio de *Drosophila melanogaster*.

Manchas por individuo (número de manchas) diagnóstico estadístico*						
Pre-tratamiento / Pos-tratamiento	Número de individuos	Manchas pequeñas (1-2 células) m=2	Manchas grandes(> 2 células) m=5	Manchas gemelas m=5	Manchas totales m=2	Clones <i>mwh</i>
Cruza bioactivación elevada (CBE)						
Act-Hex/agua	60	0.32 (019) -	0.07 (004) -	0.00 (00) -	0.38 (023) -	0.36 (022)
LYCO 0.45/agua	60	0.28 (017) -	0.07 (004) -	0.00 (00) -	0.35 (021) -	0.35 (021)
LYCO 0.9/agua	60	0.25 (015) -	0.05 (003) -	0.00 (00) -	0.30 (018) -	0.30 (018)
LYCO 1.8/agua	60	0.30 (018) -	0.08 (005) -	0.00 (00) -	0.38 (023) -	0.38 (023)

* Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988). Prueba de una cola. m= factor de multiplicación del riesgo mínimo para evaluar resultados negativos. Resultados: -, negativo; ($p<0.05$).

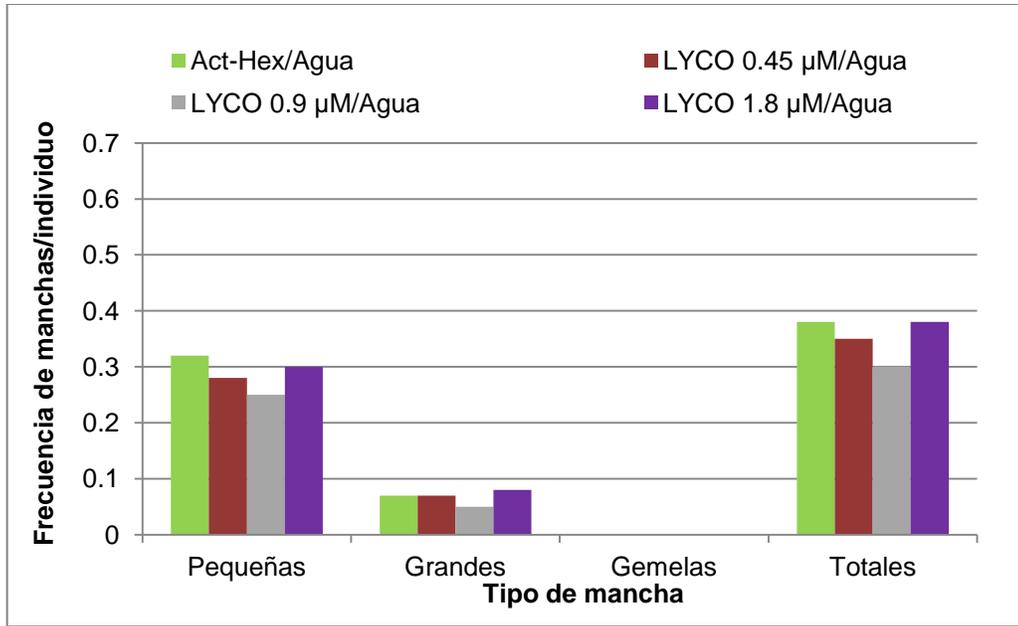


Fig. 6. Efecto del disolvente sobre la frecuencia y tipos de manchas/individuo, con respecto a los tratamientos LYCO 0.45, 0.9 y 1.8 µM/agua en larvas de *D. melanogaster*, tratadas por 6/42 h respectivamente.

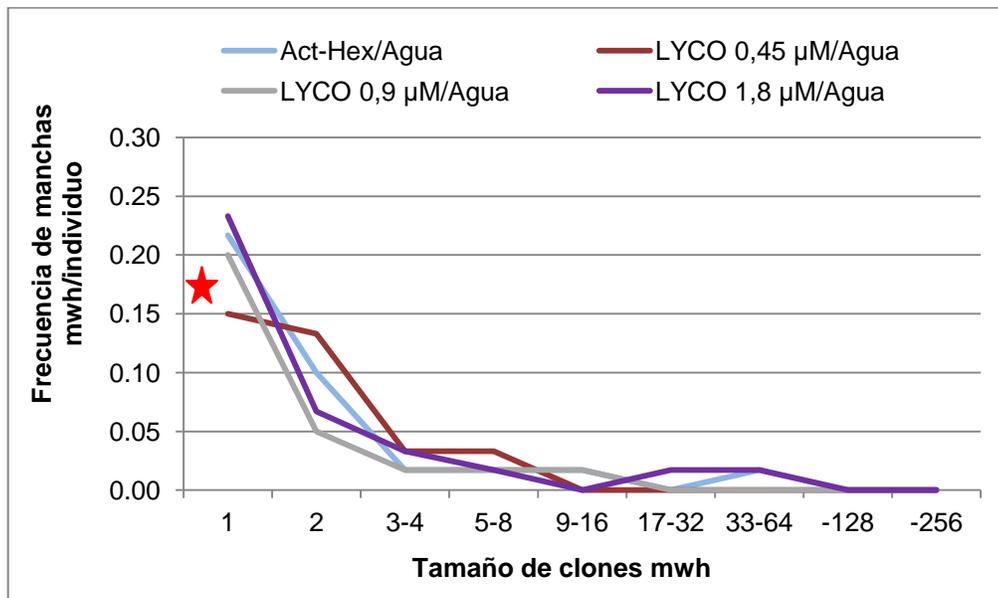


Fig. 7. Frecuencia acumulada de la distribución de clones *mwh* de los tratamientos Act-Hex/agua vs LYCO/agua. ★ Valores significativos con la prueba Kolmogorov-Smirnov ($p \leq 0.05$).

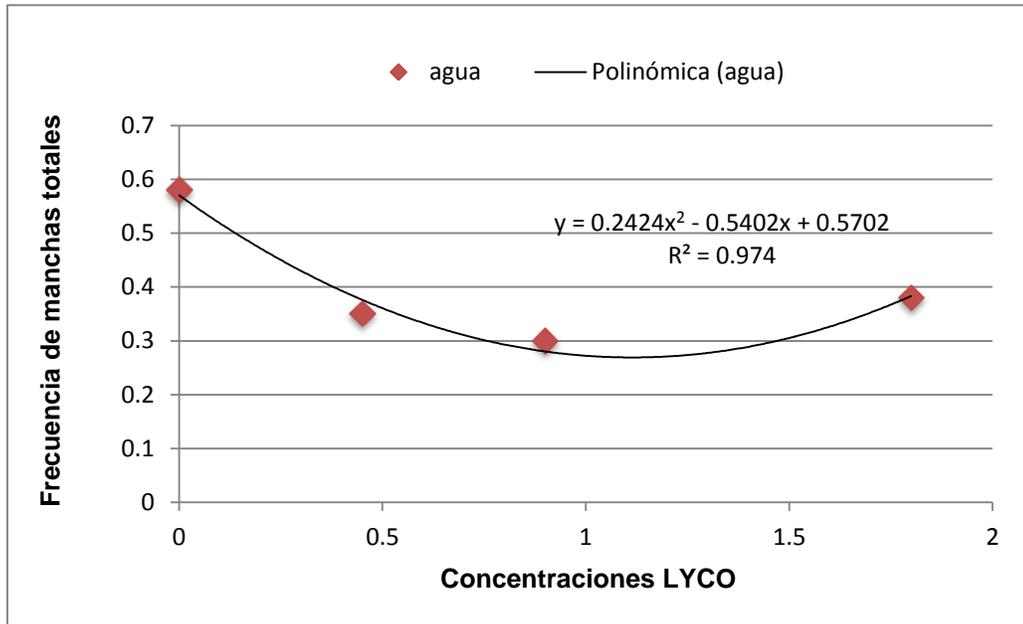


Fig. 8. Relación polinómica en la respuesta concentración LYCO, representada por la ecuación $y = 3.8267x + 12.434$ y una $R^2 = 0.7125$.

De acuerdo con lo esperado, al comparar el testigo Act-Hex/agua contra los tratamientos Act-Hex/MMS y agua/MMS, se encontraron incrementos estadísticamente significativos en los tratamientos MMS para manchas pequeñas, grandes y totales, y de acuerdo con la prueba de Kolmogorov-Smirnov, el MMS con ambos disolventes afectó la división celular (Cuadro 4 (A), Figuras 9 y 10).

Cuadro 4. Resumen de los resultados obtenidos con SMART y su diagnóstico estadístico* después del pretratamiento agudo (6 h) con Act-Hex, agua o LYCO 0.45, 0.9 y 1.8 μ M y tratamiento crónico (42 h) con agua o MMS (0.5 mM) a larvas de tercer estadio de *Drosophila melanogaster*.

Manchas por individuo (número de manchas) diagnóstico estadístico*/**						
Pre-tratamiento / Pos-tratamiento	Número de individuos	Manchas pequeñas (1-2 células) m=2	Manchas grandes (> 2 células) m=5	Manchas gemelas m=5	Manchas totales m=2	Clones <i>mwh</i>
Cruza bioactivación elevada (CBE)						
A)						
Act-Hex/agua	60	0.32 (019)	0.07 (004)	0.00 (00)	0.38 (023)	0.36 (022)
Act-Hex/MMS	60	8.52 (511) +	7.12 (427) +	0.02 (01) i, s	15.65(939) +	15.56 (934)
agua/MMS	60	7.02 (421) +	4.53 (272) +	0.00 (00) i, s	11.55 (693) +	11.28 (677)
B)						
Act-Hex/MMS	60	8.52 (511)	7.12 (427)	0.02 (1)	15.65 (939)	15.56 (934)
LYCO 0.45/MMS	60	7.72 (463) -	5.73 (344) -	0.03 (02) i, s	13.48 (809) -	13.33 (800)
LYCO 0.9/MMS	60	11.02 (639) w, s	7.55 (438) -	0.09 (05) i, s	18.66 (1082) -	18.5 (1073)
LYCO 1.8/MMS	60	9.72 (583) -	8.27 (496) -	0.12 (07) +	18.10 (1086) -	17.7 (1062)
C)						
agua/MMS	60	7.02 (421)	4.53 (272)	0.00 (00)	11.55 (693)	11.28 (677)
Act-Hex/MMS	60	8.52 (511) -	7.12 (427) w, s	0.02 (01) i,ns	15.65 (939) w, s	15.56 (934)

*Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei and Würzler (1988). Prueba estadística de una cola. m = factor de multiplicación del riesgo mínimo para evaluar resultados negativos. Resultados: -, negativo; +, positivo; i, indeciso; w, débil positivo ($p < 0.05$).

** Diagnostico estadístico de acuerdo a la Prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon STAT Graphics versión 6.0. Resultados: s, significativo, ns, no significativo.

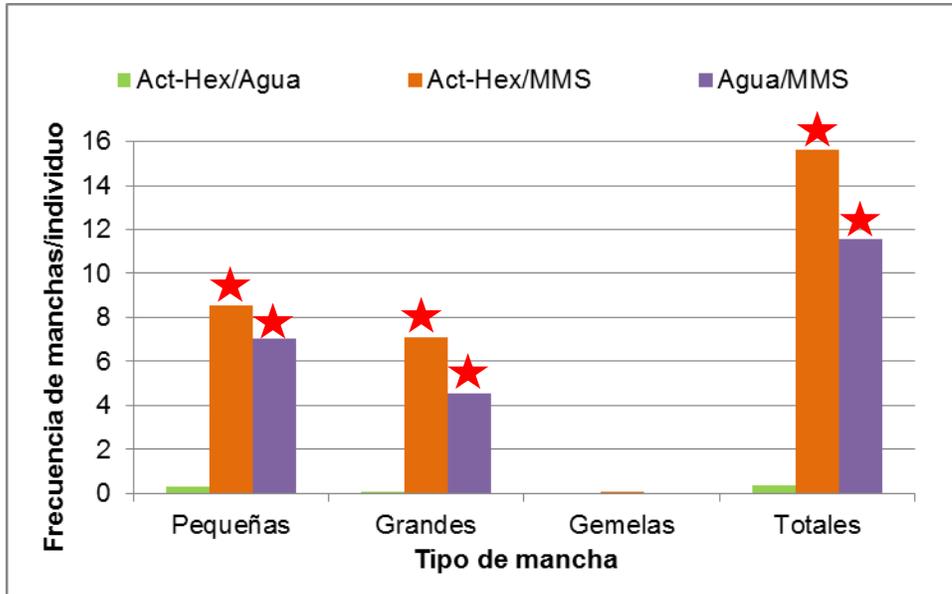


Fig. 9. Efecto del tratamiento Act-Hex/agua sobre la frecuencia y tipos de manchas/individuo con respecto a los tratamientos Act-Hex/MMS o agua/MMS en larvas de *D. melanogaster*, tratadas por 6/42 h respectivamente. ★ Valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$, SMART).

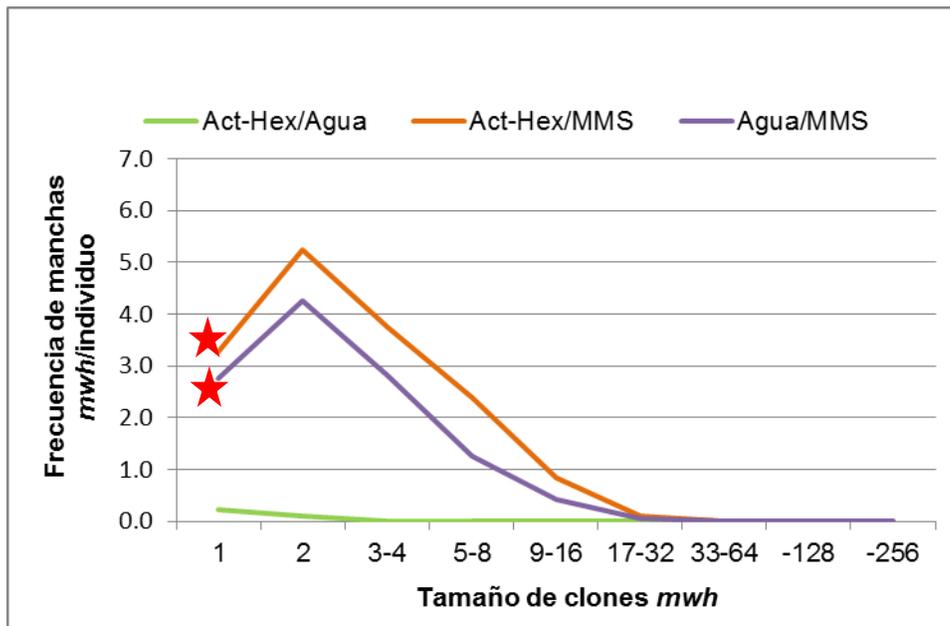


Fig. 10. Frecuencia acumulada de la distribución de clones *mwh* de los tratamientos Act-Hex/agua vs agua/MMS. ★ Valores significativos con la prueba Kolmogorov-Smirnov ($p \leq 0.05$).

Al comparar el tratamiento Act-Hex/MMS contra los tratamientos LYCO 0.45, 0.9 y 1.8 $\mu\text{M}/\text{MMS}$, se encontraron incrementos estadísticamente significativos con el tratamiento LYCO 0.9 $\mu\text{M}/\text{MMS}$ para manchas pequeñas y gemelas y el tratamiento LYCO 1.8 $\mu\text{M}/\text{MMS}$ para manchas gemelas (Cuadro 4 (B) y Figura 11). Con la prueba de Kolmogorov-Smirnov, se encontró que los tratamientos con LYCO 0.45, 0.9 y 1.8 $\mu\text{M}/\text{MMS}$, modificaron la división celular de manera diferente a como lo hizo el tratamiento Act-Hex/MMS (Figura 12). Al graficar las frecuencias de manchas totales (Figura 13) obtenidas con los tratamientos LYCO/MMS se obtuvo una relación lineal en la respuesta concentración LYCO, representada por la ecuación $y = 3.8267x + 12.434$ y una $R^2 = 0.7125$, lo cual significa que a mayor concentración de LYCO, mayor daño por el MMS.

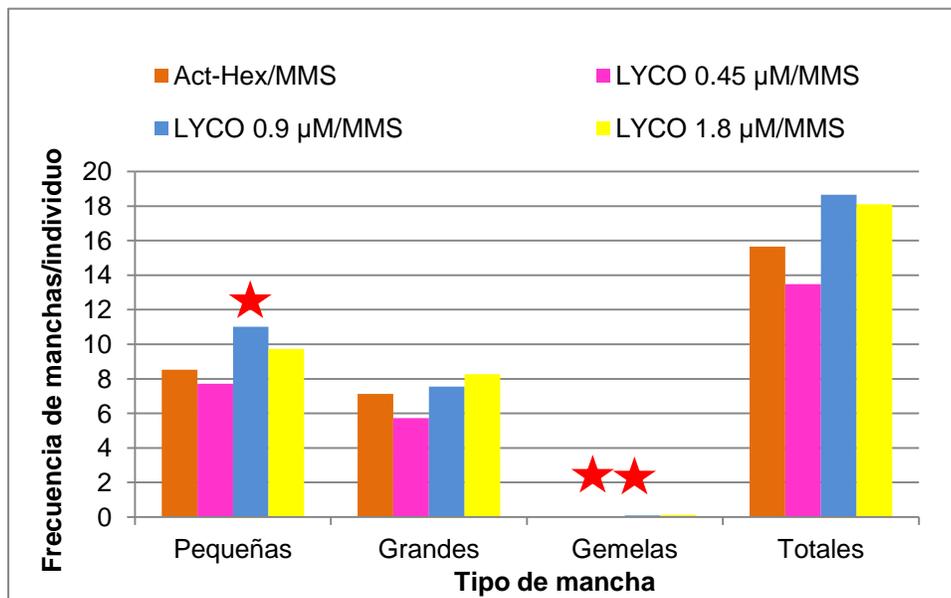


Fig. 11. Efecto del tratamiento Act-Hex/MMS sobre la frecuencia y tipos de manchas/individuo con respecto a los tratamientos LYCO 0.45, 0.9 y 1.8 $\mu\text{M}/\text{MMS}$ en larvas de *D. melanogaster* tratadas por 6/42 h respectivamente.★ Valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$, SMART).

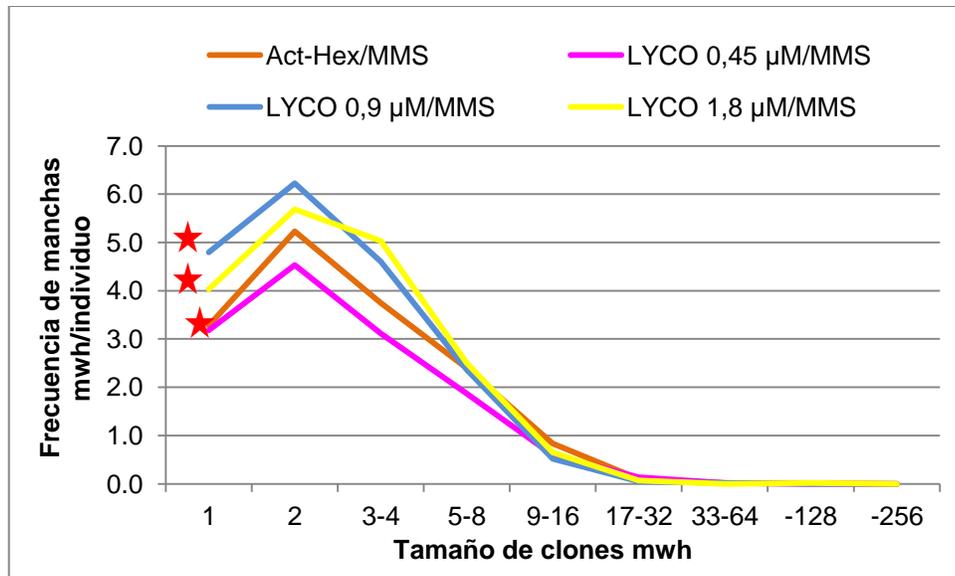


Fig. 12. Frecuencia acumulada de la distribución de clones *mwh* de los tratamientos Act-Hex/MMS vs LYCO/MMS. ★ Valores significativos con la prueba Kolmogorov-Smirnov ($p \leq 0.05$).

Al comparar el tratamiento agua/MMS contra el tratamiento Act-Hex/MMS, se encontraron incrementos estadísticamente significativos con el tratamiento Act-Hex/MMS para manchas grandes y totales (Cuadro 4 C y Figura 14). Asimismo, de acuerdo con la prueba de Kolmogorov-Smirnov, el tratamiento Acet-Hex/MMS afectó la división celular con respecto a la frecuencia acumulada de la distribución de clones en el tratamiento agua/MMS (Figura 15).

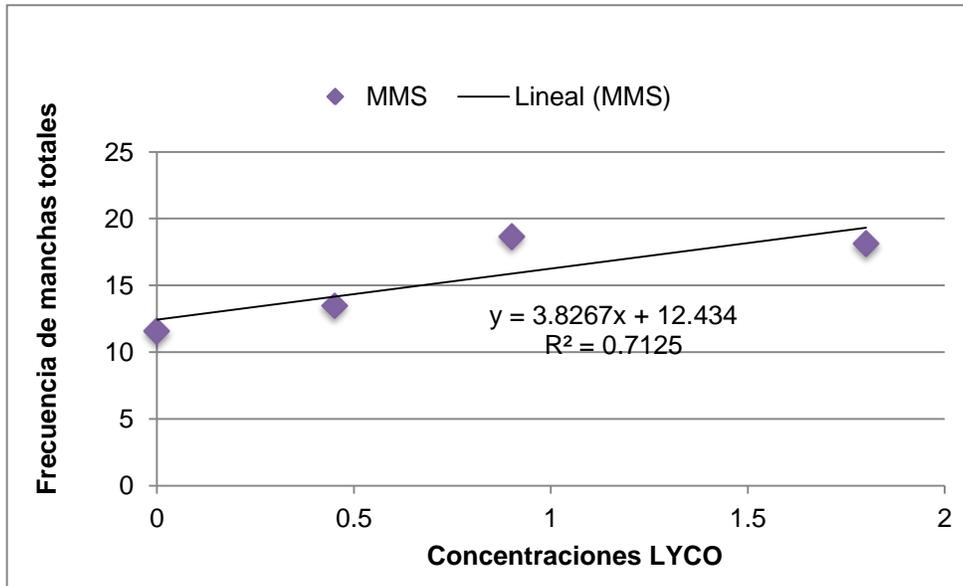


Fig. 13. Relación lineal en la respuesta concentración del LYCO.

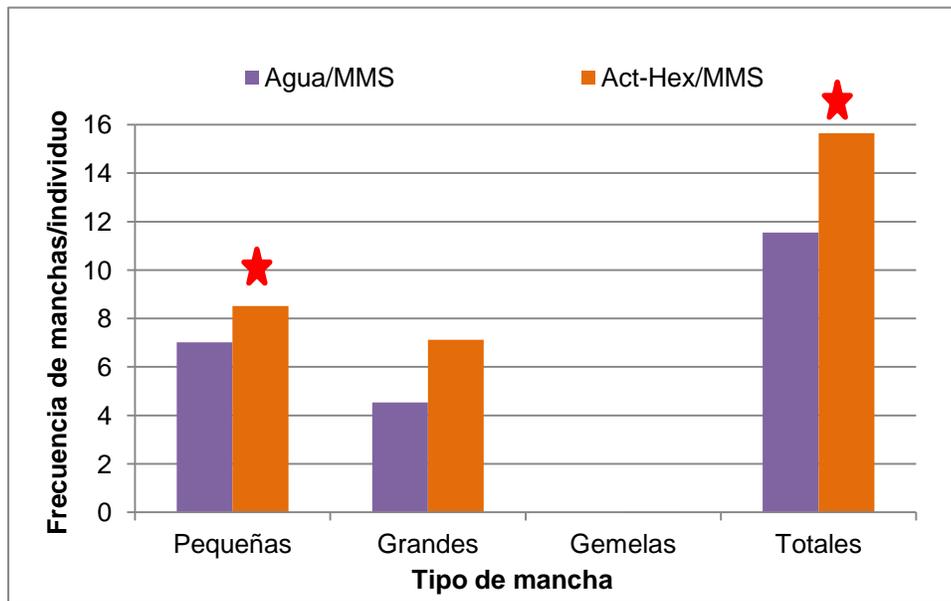


Fig. 14. Frecuencia y tipos de manchas/individuo con respecto a los tratamientos agua/MMS vs. Act-Hex/MMS, en larvas de *D. melanogaster*, tratadas por 6/42 h respectivamente.★Valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$, SMART).

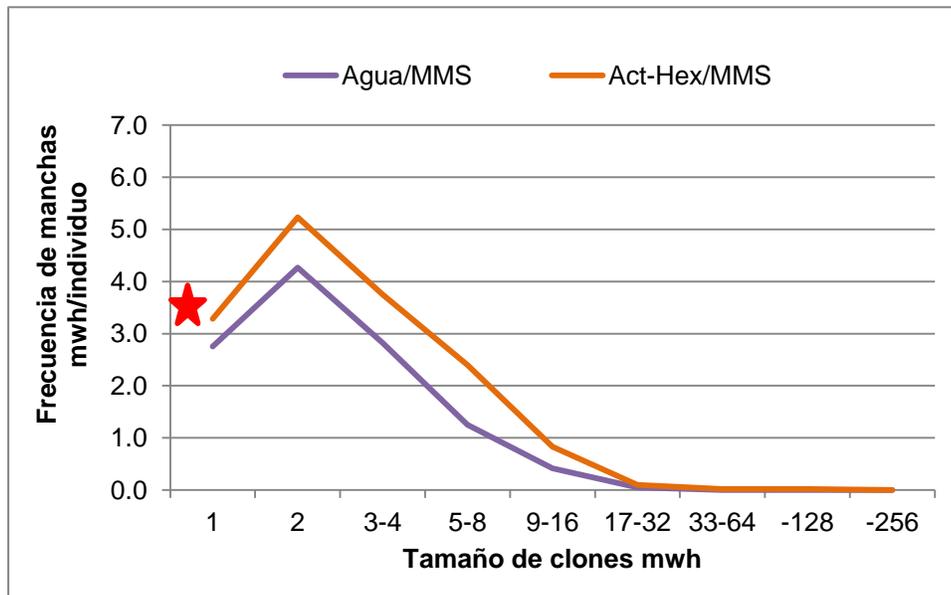


Fig. 15. Frecuencia acumulada de la distribución de clones *mwh* de los tratamientos agua/MMS vs Act-Hex/MMS.★ Valores significativos con la prueba Kolmogorov-Smirnov ($p \leq 0.05$).

Al comparar el testigo disolvente Act-Hex/agua contra el tratamiento Act-Hex/H₂O₂, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 5 y Figura 16). La prueba de Kolmogorov-Smirnov demostró que el peróxido de hidrógeno afectó la división celular (Figura 17).

Cuadro 5. Resumen de los resultados obtenidos con SMART y su diagnóstico estadístico* después del pretratamiento agudo (6 h) con Act-Hex y tratamiento crónico (42 h) con agua o H₂O₂ a larvas de tercer estadio de *Drosophila melanogaster*.

Manchas por individuo (número de manchas) diagnóstico estadístico*						
Pre-tratamiento / Pos-tratamiento	Número de individuos	Manchas pequeñas (1-2 células) m=2	Manchas grandes (> 2 células) m=5	Manchas gemelas m=5	Manchas totales m=2	Clones mwh
Cruza bioactivación elevada (CBE)						
Act-Hex/agua	60	0.32 (019)	0.07 (004)	0.00 (00)	0.38 (023)	0.36 (022)
Act-Hex/H ₂ O ₂	60	0.22 (013)	0.03 (002)	0.00 (00)	0.25 (015)	0.25 (015)
		-	-	-	-	

* Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei and Würzler (1988). Prueba estadística de una cola. m = factor de multiplicación del riesgo mínimo para evaluar resultados negativos. Resultados: -, negativo ($p < 0.05$).

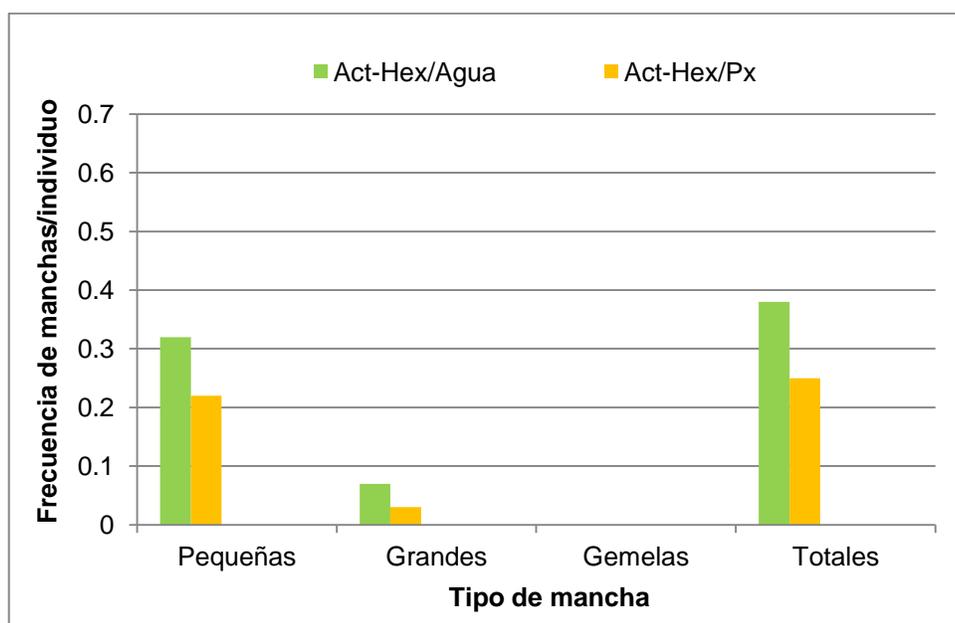


Fig. 16. Efecto del tratamiento Act-Hex/agua sobre la frecuencia y tipos de manchas/individuo con respecto al tratamiento Act-Hex/H₂O₂ donde no se obtuvieron diferencias.

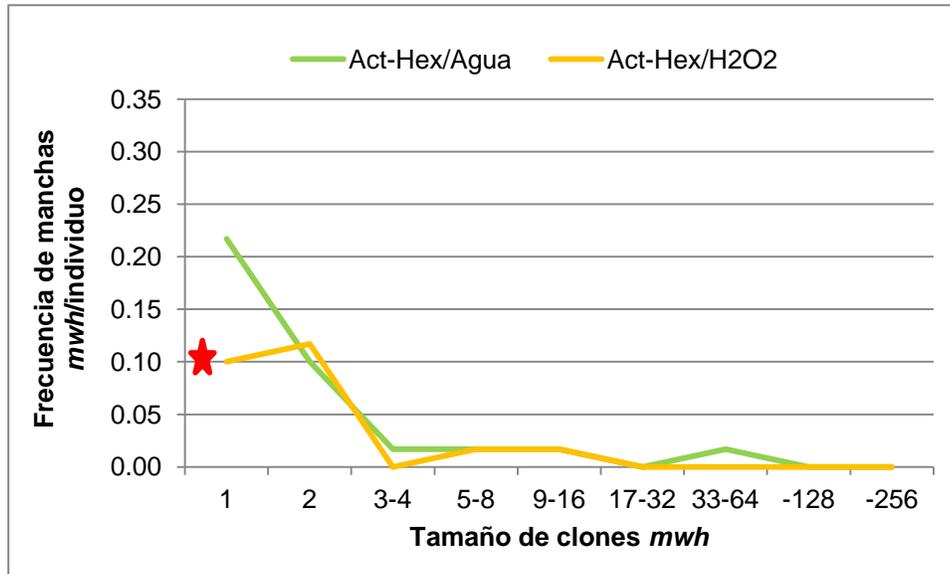


Fig. 17. Frecuencia acumulada de la distribución de clones *mwh* de los tratamientos Act-Hex/agua vs Act-Hex/H₂O₂. ★ Valores significativos con la prueba Kolmogorov-Smirnov ($p \leq 0.05$).

Cuando se comparó el tratamiento Act-Hex/H₂O₂ contra los tratamientos LYCO 0.45, 0.9 y 1.8 $\mu\text{M}/\text{H}_2\text{O}_2$, se encontraron incrementos estadísticamente significativos en los tratamientos LYCO 0.45 y 0.9 $\mu\text{M}/\text{H}_2\text{O}_2$ para manchas pequeñas y totales (Cuadro 6 y Figura 18); de acuerdo con la prueba de Kolmogorov-Smirnov, los tratamientos con LYCO 0.45, 0.9 y 1.8 $\mu\text{M}/\text{H}_2\text{O}_2$, afectaron la división celular (Figura 19).

Cuadro 6. Resumen de los resultados obtenidos con SMART y su diagnóstico estadístico* después del pretratamiento agudo (6 h) con Act-Hex o LYCO 0.45, 0.9 y 1.8 μM y tratamiento crónico (42 h) con H_2O_2 a larvas de tercer estadio de *Drosophila melanogaster*.

Manchas por individuo (número de manchas) diagnóstico estadístico*						
Pre-tratamiento / Pos-tratamiento	Número de individuos	Manchas pequeñas (1-2 células) m=2	Manchas grandes (> 2 células) m=5	Manchas gemelas m=5	Manchas totales m=2	Clones mwh
Cruza bioactivación elevada (CBE)						
Act-Hex/ H_2O_2	60	0.22 (013)	0.03 (002)	0.00 (00)	0.25 (015)	0.25 (015)
LYCO 0.45/ H_2O_2	62	0.52 (032) +	0.10 (006) -	0.02 (01) -	0.63 (039) +	0.62 (039)
LYCO 0.9/ H_2O_2	60	0.40 (024) +	0.07 (004) -	0.00 (00) -	0.47 (028) +	0.47 (028)
LYCO 1.8/ H_2O_2	60	0.30 (018) -	0.12 (007) -	0.02 (01) -	0.43 (026) -	0.43 (026)

* Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei and Würigler (1988). Prueba estadística de una cola. m = factor de multiplicación del riesgo mínimo para evaluar resultados negativos. Resultados: -, negativo; +, positivo; ($p < 0.05$).

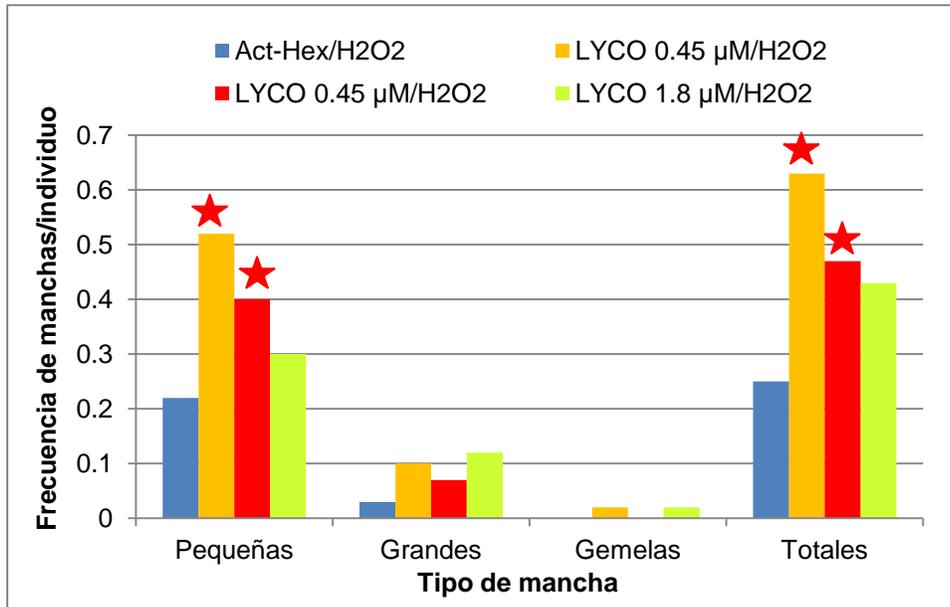


Fig. 18. Efecto del tratamiento sobre las frecuencias y tipos de manchas/individuo del testigo Act-Hex/H₂O₂ vs. LYCO 0.45, 0.9 y 1.8 μM/H₂O₂ indicando que se encontraron diferencias estadísticamente significativas ★ en los tratamientos LYCO 0.45, 0.9 en larvas de *D. melanogaster* ($p < 0.05$, SMART).

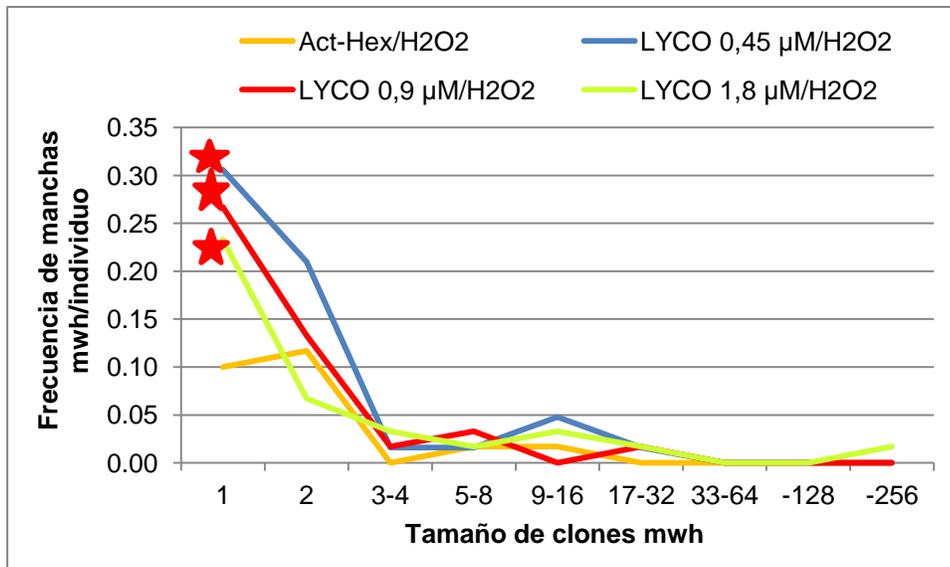


Fig. 19. Frecuencia acumulada de la distribución de clones *mwh* de los tratamientos Act-Hex/H₂O₂ vs LYCO H₂O₂. ★ Valores significativos con la prueba Kolmogorov-Smirnov ($p \leq 0.05$).

Discusión

Testigos agua y acetona

Las frecuencias de manchas del testigo agua/agua coinciden estadísticamente con las frecuencias registradas con el testigo histórico agua, obtenido en el Laboratorio de Genética Toxicológica para 34 experimentos independientes.

El testigo disolvente comparado con el testigo negativo agua/agua, no mostró diferencias significativas en la frecuencia de manchas, sin embargo, la frecuencia acumulada de la distribución de clones *mwh* en el testigo Act-Hex/agua mostró diferencias estadísticamente significativas, por lo que se puede decir que alteró la división celular (Graf *et al.*, 1984).

Tratamientos con LYCO

Los tratamientos con LYCO 0.45, 0.9 y 1.8 μM , no mostraron diferencias significativas en las frecuencias de manchas con respecto al testigo disolvente por lo que indica que el LYCO no presentó efecto genotóxico a estas concentraciones y bajo este diseño experimental. Estos resultados están de acuerdo con Rauscher *et al.* (1998), quienes no encontraron efectos genotóxicos del LYCO con la prueba de micronúcleos en médula de ratón; tampoco Pool-Zobel *et al.* (1997); Collins *et al.* (1998) y Riso *et al.* (1999) demostraron tal efecto con el ensayo cometa en linfocitos humanos tratados con diferentes concentraciones y periodos de exposición al LYCO.

Por otra parte, al analizar la frecuencia acumulada de la distribución del tamaño de clones *mwh* se encontró que la concentración de 0.9 μM mostró diferencias significativas, por lo que el LYCO a esta concentración modificó la división celular. Esto concuerda con el efecto apoptótico o inhibidor del ciclo celular reportado por Wertz *et al.* (2004) en células cancerígenas epiteliales de próstata. Palozza *et al.*

(2002) también encontraron que el LYCO incrementa los niveles de p21, p27 y p53, acompañado del arresto del ciclo celular y apoptosis. La relación polinómica obtenida al graficar las frecuencias de manchas totales contra la concentración de LYCO, indica que el pretratamiento con LYCO tuvo una tendencia a disminuir la tasa de mutación espontánea.

Testigo MMS

El MMS es un agente alquilante directo, el cual puede provocar alquilaciones en las bases nitrogenadas del DNA (Beranek, 1990; Sobol *et al.*, 2007; Rigel *et al.*, 2011) y causar de manera indirecta bajos niveles de daño oxidativo por ROS (Rowe *et al.*, 2008).

De acuerdo con lo esperado, el MMS produjo un incremento estadísticamente significativo en la frecuencia de manchas con respecto al testigo disolvente agua tal y como se obtuvo previamente en estudios *in vivo* (Graf, 1995; Heres-Pulido, 2001 y Dueñas *et al.*, 2005).

Además el análisis de la frecuencia acumulada de la distribución del tamaño de clones *mwh* indicó que el MMS sí alteró la división celular. Se ha reportado que en *D. melanogaster* hay cerca de 35 genes sensibles a mutágenos, de los cuales 28 lo son al MMS, en diferentes momentos del desarrollo celular, y muchos de ellos están involucrados en la reparación del daño al DNA (Dusenbery y Smith, 1996; De Buendía, 1998; Internet FlyBase, 2012) lo cual explica la alteración en la división celular.

Tratamiento Act-Hex/MMS

Al comparar el tratamiento Act-Hex/MMS contra agua/MMS se encontraron diferencias estadísticamente significativas. El tratamiento Act-Hex/MMS produjo más daño genotóxico. Martin (2012) encontró los mismos resultados con la cruza

estándar (CE) y propone que esto puede explicarse tomando en cuenta el valor de polaridad del hexano (0.0), de la acetona (5.4) y la del MMS (polar). Menciona, a Bevan *et al.* (1982) y Bowman & Rand (1985) quienes describen que los compuestos que son no polares y que tienen grupos polares débiles se difunden con mayor facilidad, a través de la membrana celular, que los compuestos con carga polar. Se sabe que los compuestos no polares son capaces de desestabilizar la membrana y facilitar la entrada de compuestos semipolares o polares. Derivado de lo anterior, Martin (2012) propone que la difusión o la corriente que originen las diferencias hidrostáticas y osmóticas a través de la membrana y la magnitud del flujo de agua, pudieron provocar que el MMS fuera arrastrado por alguno de éstos hacia el interior de las células (Goodman & Gilman, 2007). En este trabajo se demostró con la frecuencia acumulada de la distribución de clones *mwh* la diferencia estadística entre ambos tratamientos (agua/MMS vs Acet-Hex/MMS), por lo que esto último apoya el efecto del pre-tratamiento Acet-Hex sobre el daño obtenido con el MMS.

Tratamientos LYCO/MMS

Al comparar el testigo positivo Act-Hex/MMS con los diferentes tratamientos LYCO/MMS se encontró que las concentraciones de LYCO 0.9 y 1.8 μM /MMS mostraron un incremento estadísticamente significativo en la frecuencia de manchas presentada por el MMS lo cual se podría explicar si se asume que además del efecto mutagénico del MMS, también tiene un débil efecto oxidante (Rowe *et al.*, 2008) lo que pudo haber oxidado al LYCO y convertirlo en un compuesto pro-oxidante, ya que como se ha reportado en ensayos *in vitro* como el de Yeh y Hu (2000), quienes aunque no encontraron incremento con otros oxidantes (AMVN, AAPH y Fe/NTA), reportaron que los compuestos con LYCO pueden ser antioxidantes o pro-oxidantes, dependiendo del otro tipo de agente utilizado. La relación lineal obtenida al graficar las frecuencias de manchas totales

del post-tratamiento MMS vs pretratamiento LYCO 0.45, 0.9 y 1.8 μM , apoyan la hipótesis de que a mayor concentración de LYCO se obtiene más daño por el tratamiento con MMS. Esto demuestra que para este mutágeno, a la concentración de 0.5 mM y bajo las condiciones descritas, el LYCO no tiene efecto protector.

Testigo H_2O_2 .

Los resultados obtenidos demostraron que el H_2O_2 [20 mM] no tuvo efecto genotóxico en la craza BE. Por otra parte, Furukawa *et al.* (1993) y Kawai y Furukawa (1995) también demostraron que el H_2O_2 a esta misma concentración no es genotóxico en la craza estándar. Sin embargo, observaron incremento de estrés oxidativo midiendo la actividad de las catalasas. Los autores consideraron que la función de las catalasas y los sistemas de reparación protegieron contra el daño oxidativo al DNA en *D. melanogaster*.

Al analizar la frecuencia acumulada de la distribución de clones *mwh* se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, lo que indica que el testigo H_2O_2 alteró la división celular. Esto coincide con Martínez (2012) quien encontró efecto tóxico del H_2O_2 en larvas de tercer estadio de las líneas flare y Oregon-flare de *D. melanogaster*; así mismo coincide con los efectos citotóxicos reportados por Jurkat y Gardner *et al.* (1997) en fibroblastos de la línea L929 y los efectos citotóxicos o apoptóticos reportados por Barbouti *et al.* (2002) en cultivo de células.

Por lo anterior, para explicar los efectos del H_2O_2 , se proponen las siguientes hipótesis: (1) causa estrés oxidativo pero éste es inhibido por las catalasas; (2) causa un leve daño genotóxico, pero éste es anulado eficientemente por los sistemas de reparación del DNA; (3) es citotóxico y las larvas o las células dañadas mueren por el daño induciendo el “suicidio programado” y la genotoxicidad no se evidencia. Los resultados en la frecuencia acumulada de la distribución de clones *mwh* apoyan a la tercera hipótesis.

Tratamientos LYCO/H₂O₂.

Al comparar el testigo H₂O₂ con los tratamientos LYCO/H₂O₂ se encontró que LYCO 0.45 y 0.9 μM/H₂O₂ mostraron incrementos significativos en la frecuencia de manchas grandes, gemelas y totales, por lo que se cree pudo haber interacción entre el LYCO y el H₂O₂. Debido a que se ha reportado que el LYCO puede unirse a proteínas o lipoproteínas en la membrana celular (Young y Lowe, 2001); sin embargo éste, como otros antioxidantes (Yeh y Hu, 2000) puede ser tanto antioxidante como pro-oxidante dependiendo de la concentración o del compuesto al que sea expuesto. Por lo anterior, estos resultados pueden deberse a uno o dos de los efectos descritos para el LYCO: (1) Pro-oxidante, causando lipoperoxidación; (2) formación de metabolitos epóxido, tales como 1,2-epóxido licopeno y 5,6-epóxido licopeno (Ben-Aziz *et al.*, 1973 y Kim *et al.*, 2001) que dañan al DNA como lo reportan Yeh y Hu (2001).

Finalmente, el análisis de frecuencia acumulada de la distribución de clones *mwh* mostró que hubo diferencias entre el testigo H₂O₂ y los tratamientos LYCO/H₂O₂ indicando que el LYCO/H₂O₂ afectó la división celular, lo cual pudo deberse a los efectos tóxicos, citotóxicos y apoptóticos reportados para el H₂O₂ (Gardner *et al.*, 1997; Barbouti *et al.*, 2002; Wertz *et al.*, 2004; Martínez, 2012).

CONCLUSIONES

El MMS es un agente alquilante directo, pero recientemente se ha reportado que de manera indirecta también puede producir daño oxidativo. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del carotenoide LYCO, con propiedades antioxidantes y anticancerígenas, contra los efectos del MMS, así como del H₂O₂ que produce estrés oxidativo, mediante la prueba en ala de *D. melanogaster* (SMART), en la craza de bioactivación elevada, que tiene niveles altos de CYP450s. El análisis de los resultados y la discusión de los mismos, permiten concluir, para cada uno de los factores siguientes:

El LYCO no mostró una tendencia a disminuir el daño provocado por el MMS, ni el H₂O₂, debido a que:

- * Los tratamientos LYCO 0.9 y 1.8 µM/MMS, LYCO 0.45 y 0.9 µM/H₂O₂ incrementaron el daño genotóxico provocado por el MMS y el H₂O₂, respectivamente
- * Los tratamientos LYCO 0.9 µM/agua, LYCO 0.45, 0.9 y 1.8 µM/MMS, LYCO 0.45, 0.9 y 1.8 µM/H₂O₂ afectaron la división celular.

El efecto del MMS no fue disminuido por el LYCO, en todos los casos se alteró la división celular, ya que:

- * Todos los tratamientos con MMS produjeron un incremento en el daño genotóxico a excepción del tratamiento LYCO 0.45 µM/MMS.
- * El MMS alteró la división celular en todos los tratamientos
- * Incrementó el daño del tratamiento Act-Hex/MMS, lo cual pudo deberse a la polaridad de los compuestos y a que éstos pudieron haber facilitado el ingreso del MMS a la célula.

El disolvente Act-Hex tuvo efecto sobre los parámetros estudiados porque:

- Se determinó que el testigo Act-Hex modificó la división celular e incrementó el daño en el tratamiento Act-Hex/MMS. Esto pudo deberse a las diferencias de polaridad de los compuestos y su efecto sobre las membranas, pudiendo haber facilitado el ingreso del MMS a las células

Recomendaciones

Cuantificar en larvas de *D. melanogaster* sometidas a estos tratamientos:

- Actividad de catalasas
- Expresión de genes relacionados con estrés oxidativo (hsp) y/o apoptosis (caspasa 9).

REFERENCIAS

- Agarwal S.** and Rao A. V. (2000). Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *CMAJ*. **163** (6): 739-744.
- Atessahin A.**, Yilmaz S., Karahan I., Osman A. and Karaoglu A. (2005). Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicology*. **212**: 116-123.
- Aust O.**, Ale-Agha N., Zhang L., Wollersen H., Sies H. and Stahl.W. (2003). Lycopene oxidation product enhances gap junctional communication. *Food Chem. Tox.* **41** (10): 1399-1407.
- Barbouti A.**, Doulias P. T., Nouis L., Tenopoulou M. and Galaris D. (2002). DNA damage and apoptosis in hydrogen peroxide-exposed jurkat cells: bolus addition versus continuous generation of H₂O₂. *Free Radic. Biol. Med.* **33** (5): 691-702.
- Ben-Aziz A.**, Britton G. and Goodwin T. W. (1973). Carotene epoxides of *Lycopersicon esculentum*. *Phytochemistry*. **12**: 2759-2764.
- Beranek D. T.** (1990). Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat. Res.* **231**: 11-30.
- Bevan J. A.**, et al. (1982). *Fundamentos de farmacología. Introducción a los principios de acción de los fármacos*. 2da Edición. Harla. México. pp. 10-13.
- Bowman W. C.**, y Rand M. J. (1985). *Farmacología. Bases bioquímicas y patológicas. Aplicaciones Clínicas*. 2da Edición. Interamericana. México. pp. 43-44.
- Bramley P.M.**, (2000). Is lycopene beneficial to human health? *Phytochemistry*. **54**: 233–236.
- Breinholt V.**, Lauridsen T. S., Daneshvar B. and Jakobsen J. (2000). Dose response effects of lycopene on selected drug-metabolizing and antioxidant enzymes in the rat. *Cancer Lett.* **154**: 201-210.

- Brink** A., Richter I., Lutz U., Wanek P., Stopper H. and Lutz W. K. (2009). 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. *Mutat. Res.* **678**: 123-128.
- Burgess** L. C., Rice E., Fischer T., Seekins J. R., Burgess T. P., Sticka S. J. and Klatt K. (2008). 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. *Tox. in vitro.* **22**: 1297-1300.
- Castañeda** P. L., Heres P. M. E. y Dueñas I. E. (2008). *Drosophila melanogaster*: un modelo experimental. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México. 86 p.
- Cisneros** V. (2012). *Evaluación del licopeno sobre 4-NQO mediante SMART en ala de Drosophila melanogaster, cruza de bioactivación elevada*. Tesis de licenciatura en Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. 62 p.
- Collins** A. R., Olmedilla B., Southon S., Granado F. and Duthie S. J. (1998). Serum carotenoids and oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogenesis.* **19**: 2159-2162.
- Curtis** D. K. y Watkins. J. B. (2001). Casarett y Doull. *Manual de Toxicología*. 5ª Edición. Edit. Mc Graw Hill Interamericana. México, D. F. pp. 981.
- De Buendía** G. P. (1998). Search for DNA repair pathways in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res. / DNA Repair.* **407**: 67-84.
- Duarte** T. L, Almeida G. M. and Jones G. D.D. (2007). Investigation of the role of extracellular H₂O₂ and transition metal ions in the genotoxic action of ascorbic acid in cell culture models. *Toxico.Lett.* **170**: 57-65.
- Dueñas** G. I. E., Heres P. M. E., Castañeda L. and U. Graf. (2002). Easy raising of *Drosophila melanogaster* on a medium consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. *Dros. Inf. Serv.* **84**: 166 p.

- Dueñas** G. I. E., Vega C. V., Gómez L. J. C., Santos C. L. F., Castañeda P. L., Durán D. A. and Heres P. M. E. (2005). Toxicity parameters of 4-nitroquinoline-1-oxide, urethane and methyl methanesulfonate in the *flare* and *Oregon-flare* strains of *Drosophila melanogaster*. *Dros. Inf. Serv.* **88**: 83-89.
- Dusenbery** R. L. and Smith P. D. (1996). Cellular responses to DNA damage in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res. / DNA Repair.* **364**: 133-145.
- Ferguson** L. R., Philpott M. and Karunasinghe. (2004). Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology.* **198**: 147-159.
- FlyBase**. En línea fecha de acceso 24 de junio del 2012, disponible en: <http://www.flybase.bio.idiana.edu>
- Fornelli** F., Leone A., Verdesca I., Minervini F. and Zacheo G. (2007). The influence of lycopene on the proliferation of human breast cell line (MCF-7). *Tox.in vitro.* **21**: 217-223.
- Franke** S., Prâ D., Da Silva J., Erdtman B. and Pêgas J. A. (2005). Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO₄ and CuSO₄ in mouse blood cells *in vivo*. *Mutat Res.* **583**: 75-84.
- Frei** H. and Würgler F. E. (1995). Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila*. *Mutat. Res.* **334**: 247-258.
- Frei** H. And Würgler F. E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inclusive result. *Mutat. Res.* **203**: 297-308.
- Friedberg** E. C., Walker G. C. and Siede W. (1995). *DNA repair and mutagenesis*. ASM Press. Washington D. C. 698.
- Furukawa** H., Kawai K. and Miyazawa T. (1993). Low-level chemiluminescence from *Drosophila melanogaster* fed with hydrogen peroxide. *Mutat. Res.* **292** (3): 263-264.

- Gardner** A. M., Xu F., Fady C., Jacoby F. J., Duffey D. C., Tu Y. and Lichtenstein A. (1997). Apoptotic vs nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* **22**: 73-83.
- Goodman** and Gilman. 2007. *Las Bases farmacológicas de la Terapéutica*. 11^a ed. McGraw Hill, Interamericana. México. 2017 p.
- Graf** U., Würgler F. E., Katz A. J., Frei H., Juon H., Hall C. B. and Kale P. G. (1984). Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* **6**: 153-188.
- Graf** U. and Singer D. (1992). Genotoxicity testing of promutagens in the wing Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **8**: 15-27.
- Graf** U. and Van S. N. (1992). Improved high bioactivation cross for the wing Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **8**: 15-27.
- Graf** U. (1995). Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Experientia.* **51**: 168-173.
- Graf** U., Spanó M. A., Rincón J. G., Abraham S. K. and de Andrade H. H. (1996). The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. *Environ. Mutagen.* **16**: 1-7.
- Graf** U., Abraham S. K., Guzmán-Rincón J. and Würgler F. E. (1998). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* **402**: 203-209.
- Guttenplan** J., Chen M., Kosinska W., Thompson S., Zhao Z. and Cohen L. A. (2001). Effects of a lycopene-rich diet on spontaneous and benzo[a]pyrene-induced mutagenesis in prostate, colon and lungs of the lacZ mouse. *Can. Let.* **164**: 1-6.

- Guzmán**, R. J. and Graf U. (1995). *Drosophila melanogaster* Somatic Mutation and Recombination Test as a biomonitor. In: Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change. *Envir. Sci. R.* **50**: 169-181.
- Heres** P. M. E. (2001). *Efecto de los nitratos de plomo y de calcio sobre la acción mutagénica y recombinogénica del metil metanosulfonato en Drosophila melanogaster*. Tesis de maestría en ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 174 p.
- Hernández** G. A. (2012). *Efecto del licopeno ante el uretano y el peróxido de hidrógeno en SMART en ala de Drosophila melanogaster (CBE)*. Tesis de licenciatura en Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. 50 p.
- Horváthová** E., Slameenová D., Hlinčíková L., Kupar M. T., Gábelová A. and Collins A. R. (1997). The nature and origin of DNA single strand breaks determined with the comet assay. *Mutat. Res. /DNA Rep.* **383**: 243-252.
- Jenkins** G. J. S., Doak S. H., Johnson G. E., Quick E., Waters E. M. and Parry J. M. (2005). Do dose response thresholds exist for genotóxico alkylating agents? *Mutagenesis.* **20**: 389-398.
- Kawai** K. and Furukawa H. (1995). Oxidative damage of *Drosophila melanogaster* fed with hydrogen peroxide. *Mutat. Res.* **334** (3): 385-427.
- Khachik** F., Spangler C. J. and Smith J. C. (1997). Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Anal. Chem.* **69**: 1873-1881.
- Khachik** F., Pfander H. and Traber B. (1998). Proposed mechanisms for the formation of synthetic and naturally occurring metabolites of lycopene in tomato products and human serum. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 4885-4890.
- Kim** S. J., Nara E., Kobayashi H., Terao J. and Nagao A. (2001). Formation of cleavage products by autoxidation of lycopene. *Lipids.* **36** (2): 191-199.
- Kotake-Nara** E., Kobayashi H., Terao J. and Nagao A. (2001). Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells. *J. Nutr.* **131**: 3303-3306.

Lee M. T. and **Chen B. H.** (2002). Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. *Food Chem. Tox.* **78**: 425-432.

Lee M. Y., Kim M-A., Kim H-J., Bae Y-S., Park J-I., Kwak J-Y., Chung J. H. and Yun J. (2007). Alkylating agent methyl methanesulfonate (MMS) induces a wave of global protein hyperacetylation: Implications in cancer cell death. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **360**: 483-489.

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

Levy J., Bosin E., Feldman B., Giat Y., Miinster A., Danilenko M. and Sharoni Y. (1995). Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either alpha-carotene or beta-carotene. *Nutri.Cancer.* **24** (3): 257-266.

Louisa M., Suyatna F. D., Setiawati A. and Jusman S. W. A. (2009). The effect of lycopene on the total cytochrome P450, CYP1A2 and CYP2E1. *Med. J. Indonesia.* **18** (4): 233-238.

Mangal D., Vudathala D., Park J. H., Lee S. H., Penning T. M. and Blair I. A. (2009). Analysis of 7, 8-Dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine in cellular DNA during Oxidative Stress. *Chem. Res. Toxicol.* **22** (5): 788-797.

Martín H. C. E. (2012). *Evaluación del daño producido por el metilmetanosulfonato, en larvas de Drosophila melanogaster (cruza E) pretratadas con licopeno, mediante SMART en ALA.* Tesis de licenciatura en Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. 39 p.

Martínez C. M. A. (2012). *Efecto del H₂O₂ en la sobrevivencia y los parámetros reproductivos: fecundidad total, desempeño reproductivo y porcentaje de fertilidad en las líneas flare³ y Oregon-flare³ de Drosophila melanogaster.* Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Págs. 56-57.

Merck. En línea fecha de acceso 24 de septiembre del 2012, disponible en: <http://www.merck-chemicals.com>

Miquel J. y Ramírez-Bosca A. (2004). Estrés oxidativo y suplementación antioxidante de la dieta en el envejecimiento, la aterosclerosis y la disfunción inmunitaria. *Ars. Pharm.* **45** (2): 91-109.

Moreira R. R., Moura D. J., Melecchi M. I. S., Santos R., François M., Bastos E., Pegas J. A., De Paula L. L. and Saffi J. (2007). Protective affects of *Hibiscus tiliaceus L.* methanolic extract to V79 cells against cytotoxicity and Genotoxicity induced by hydrogen peroxide and tert-butyl-hydroperoxide. *Toxicol. In vitro.* **21**: 1442-1452.

Nelson D. and Cox M. (2001). *Lenhinger: Principios de Bioquímica.* 3^a Edición. Edit. Omega. Barcelona. España. Pág. 1152.

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

Osaba L., Aguirre A., Alonso A. and Graf U. (1999). Genotoxicity testing of six insecticides in two crosses of the *Drosophila* wing spots test. *Mutat. Res.* **439**: 49-61.

Palozza P., Serini S., Torsello A., Boninsegna A., Covacci V., Maggiano N., Ranelletti F. O., Wolf F. I. and Calviello G. (2002). Regulation of cell cycle progression and apoptosis by β -carotene in undifferentiated and differentiated HL-60 leukemia cells: Possible involvement of a redox mechanism. *Int. J. Cancer.* **97**: 593-600.

Pool-Zobel B. L., Bub A., Muller H., Wollowski I. and Rechkemmer G. (1997). Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: First result of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis.* **18**: 1847-1850.

Ramos I. M. L., Batista C. M., Gómez B. C. y Zamora A. L. (2006). Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Redalyc.* **8** (1): 1-10.

- Rao A. V.** and Agarwal S. (1998). Bioavailability and in vivo antioxidant properties of lycopene from tomato products and their possible role in the prevention of cancer. *Nutr.Cancer.* **31** (3): 199-203.
- Rao V. A.** and Agarwal S. (1999). Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review. *Nut. Res.* **19** (2): 305-323.
- Rao G. L.,** Guns E. and Rao V. A. (2003). Lycopene: its role in human health and disease. *Agro. Food Ind. Hi-tech.* **14**: 25-30.
- Rauscher R.,** Edenharder R. and Platt K. L. (1998). *In vitro* antimutagenic and *in vivo* anticlastogenic effects of carotenoids and solvent extracts from fruits and vegetables rich in carotenoids. *Mutat. Res.* **413** (2): 129-142.
- Reiter L. T.,** Potocki L., Chien S., Gribskov M. and Bier E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* **11**: 1114-1125.
- Rigel J. K.,** Sean E. M., Heather P., Tera L., Mayur P., Vinayak K. G., Giridhar R. A. and Sridhar V. (2011). DNA site-specific N3-adenine methylation targeted to estrogen receptor-positive cells. *Biorg. Med. Chem.* **19**: 5093-5102.
- Riso P.,** Pinder A., Santangelo A. and Porrini M. (1999). Does tomato consumption effectively increase the resistance of lymphocyte DNA to oxidative damage? *Am. J. Clin. Nutr.* **69**: 712-718.
- Rodríguez A. R.** (2004). *Metabolismo de las toxinas ambientales*. Edit. Fondo de Cultura Económica. México, D. F. Pág. 118.
- Rowe L.A.,** Degtyareva N. And Doetsch P.W. (2008). DNA damage-induced reactive oxygen species (ROS) stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic. Biol. Med.* **45**: 1167-1177.
- Sánchez L. A.,** Fonseca L. A. y Capiro T. G. (2000). Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba. *Rev. Cubana Farm.* **34**: 34-43.

- Saner** C. B. W., Würgler F. and Senggstag C. (1996). Metabolic of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ. Mol. Mutagen.* **27**: 46-58.
- Scolastici** C., Alves de Lima R. O., Barbisan L. F., Ferreira A. L., Ribeiro D. A. And Salvadori D. M. F. (2007). Lycopene activity against chemically induced DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Toxicol. in vitro.* **21**: 840-845.
- Sendão** M., Behling E. B., Dos Santos R. A., Greggi L. M. and Pires M. L. (2006). Comparative effects of acute and subacute lycopene administration on chromosomal aberrations induced by cisplatin in male rats. *Food Chem. Tox.* **44**: 1334-1339.
- Sobol** Z., Engel M. E., Rubitski E., Ku W. W., Aubrecht J. and Schiestl R. H. (2007). Genotoxicity profiles of common alkyl halides and esters with alkylating activity. *Mutat. Res.* **633**: 80-94.
- Stahl** W. and Sies H. (1996). Perspectives in Biochemistry and Biophysics. Lycopene: A Biologically Important Carotenoid for Humans? *Arch. Biochem. Biophys.* **336** (1): 1-9.
- Tang** L., Jin T., Zeng X. and Wang J. S. (2005). Lycopene inhibits the growth of human androgen-independent prostate cancer cells *in vitro* and in BALB/c nude mice. *J. Nutr.* **135** (2): 287-290.
- Venereo** G. J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Milit.* **31** (2): 126-133.
- Vogel** E. W., Graf U., Frei H. and Nivard M. M. J. (1999). The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens IARC. *Sci. Publ.* **146**: 427-470.
- Waliszewski** K. N. y Blasco G. (2010). Propiedades nutraceuticas del licopeno. *Salud Publ. Méx.* **52** (3): 254-265.
- Wang** H. and Leung L. K. (2010). The carotenoid lycopene differentially regulates phase I and II enzymes in dimethylbenz[a]anthracene-induced MCF-7 cells. *Nutrition.* **26**: 1181-1187.

- Warren** E. G., Tindall K. R. and Skopek T. R. (1999). Specificity of mutations induced by methyl methanesulfonate in mismatch repair-deficient human cancer cell lines. *Mutat. Res.* **427**: 67-78.
- Wertz** K., Siler U. and Goralczyk R. (2004). Lycopene: modes of action to promote prostate health. *Arch. Biochem. Biophys.* **430**: 127-134.
- Yeh** S. L. and Hu M. L. (2000). Antioxidant and pro-oxidant effects of lycopene in comparison with β -carotene on oxidant-induced damage in Hs68 cells. *J. Nutr. Biochem.* **11**: 548-554.
- Yeh** S. L. and Hu M. L. (2001). Induction of oxidative DNA damage in human foreskin fibroblast Hs68 cells by oxidized β -carotene and lycopene. *Free Radic. Res.* **35**: 203-213.
- Young** A. J. and Lowe G. M. (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch. Biochem Biophys.* **385** (1): 20-27.
- Zhang** L. X., Cooney R. V. and Bertram J. S. (1991). Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action. *Carcinogenesis.* **12** (11): 2109-2114.
- Zhang** H., Nara-Kotake E. Ono H. and Nagao A. (2003). A novel cleavage product formed by autoxidation of lycopene induces apoptosis in HL-60 cells. *Free Radic. Biol. Med.* **35**: 1653-1663.

Anexo 1

Eventos genéticos

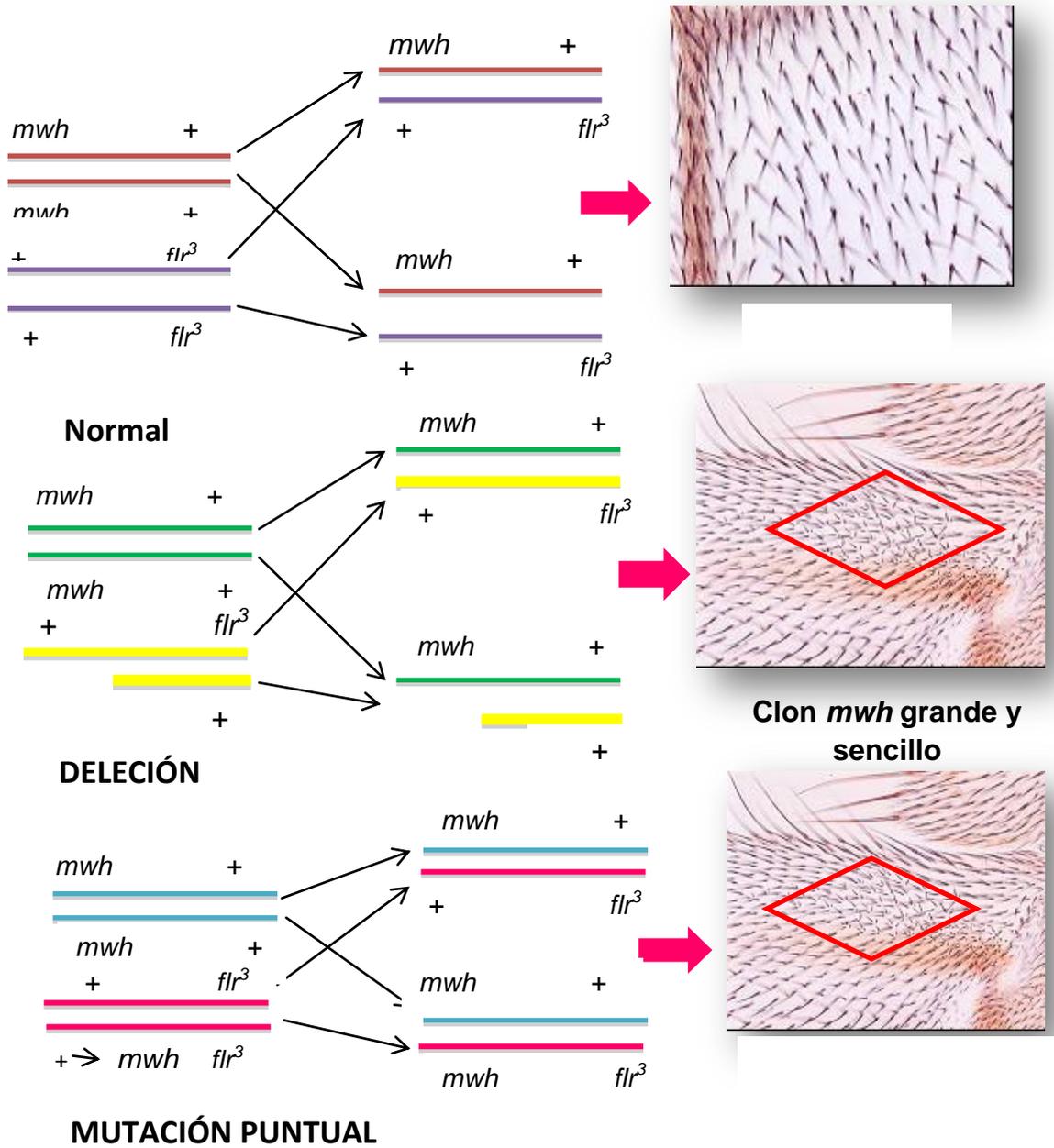
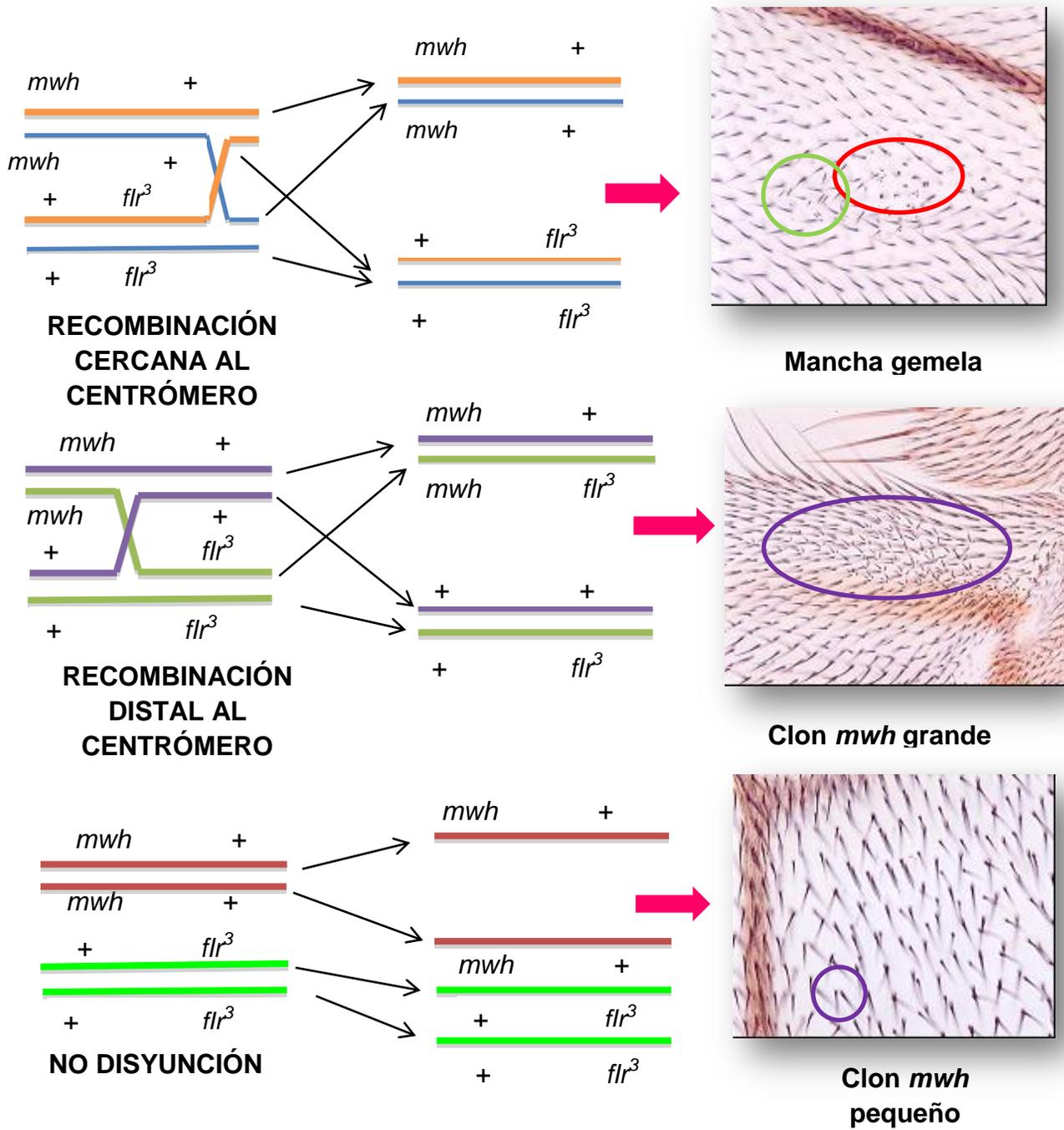


Fig. 20. Eventos genéticos que ocasionan la pérdida de heterocigosis en los marcadores *flr³* y *mwh* en *D. melanogaster*.



Continuación figura 20, eventos genéticos que ocasionan la pérdida de heterocigosis en los marcadores *flare* y *multiple wing hair* en *D. melanogaster*.

Anexo 2

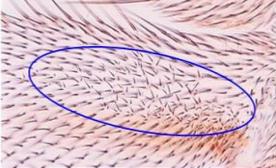
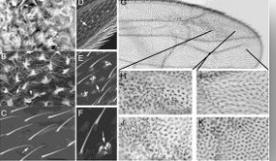
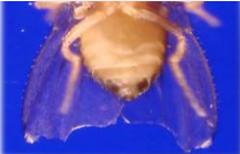
Líneas y marcadores

En el laboratorio de Genética Toxicológica se cuenta con tres líneas de *D. melanogaster*: “multiple wing hairs” (*mwh/mwh*), “flare” (*flr³/TM3, Bd^S*) y “Oregon-flare” (ORR(1); ORR (2); *flr³/TM3, Bd^S*) los cuales presentan los marcadores siguientes (Graf, 1995) (Cuadro 7):

1. “multiple wing hairs” (*mwh*), el cual es una mutación recesiva homocigota viable, que se localiza en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-0.3); en homocigosis produce tricomas múltiples por célula en lugar de un solo tricoma con condición silvestre
2. “flare” (*flr*) es una mutación recesiva que afecta la forma de los tricomas, éste se localiza en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-38.8). Para este carácter se conocen tres alelos y en condición homocigota son letales. Sin embargo, este caso puede ser viable en las células de los discos imaginales del ala. Por su condición letal, los alelos *flr* pueden conservarse en las líneas *D. melanogaster* introduciendo un balanceador con múltiples inversiones, dos paracéntricas (L y R) y una pericéntrica (L+R), que impide la formación de nuevos arreglos cromosómicos originados por recombinación. Este marcador es letal en homocigosis, por lo cual el balanceador está presente en la línea *flr³/TM3, Bd^S*, donde TM3 significa la triple inversión: Third Multiple 3 (Graf *et al.*, 1996). *Bd^S* es un marcador dominante que se localiza en el brazo derecho del cromosoma 3 (3-92.5), es letal en homocigosis y se expresa en forma de muescas en el borde del ala, su presencia permite detectar que no se ha perdido la heterocigosis de *flr³* porque no ha habido recombinación meiótica.

3. Oregon-*flare* posee el marcador *fl^β* en carácter heterocigoto y presenta los cromosomas 1 y 2 de la línea Oregon. El cromosoma 2 lleva la mutación dominante Rst (2) DDT, localizada en la región 43E, (2-64.5), que provoca la expresión constitutiva de una proteína inductora de los genes *CYP* (*CYP6a8* y *CYP6a9* del cromosoma 1 y *CYP6a2* del cromosoma 2). Estos genes expresan las enzimas del complejo enzimático CYP450s. Esta mutación confiere en consecuencia, no sólo la resistencia al DDT e insecticidas organofosforados en larvas y adultos, sino también el incremento general en el metabolismo xenobiótico (Saner *et al.*, 1996).

Cuadro 7. Marcadores que se expresan en el ala de *D. melanogaster*.

Marcador	Descripción	Imagen
<p><i>multiple wing hairs</i> (<i>mwh</i>)</p>	<p>Mutación recesiva homocigota viable en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-0.3). En homocigosis este marcador produce tricomas múltiples por célula en lugar de un solo tricoma silvestre.</p>	
<p><i>flare (flr³)</i></p>	<p>Mutación que afecta la forma de los tricomas, se localiza en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-38.8) y es homocigota letal (Graf, 1995). Se mantiene la heterocigosis por la introducción del cromosoma balanceador TM3.</p>	
<p><i>Beaded-Serrate</i> (<i>Bd^S</i>)</p>	<p>Marcador dominante que se localiza en el brazo derecho del cromosoma 3 (3-92.5), es letal en homocigosis y se expresa en forma de muescas en el borde del ala (Osaba <i>et al.</i>, 1999).</p>	

Anexo 3

Cruza Bioactivación Elevada (CBE).

La CBE produce genotipos transheterocigotos $ORR(1)/+$; $ORR(2)/+$; $mwh,flr^3+/mwh+,flr^3$ con alas de fenotipo silvestre y heterocigotos $ORR(1)/+$; $ORR(2)/+$; $mwh\ flr^3+/mwh+\ flr^3+,TM3,Bd^S$ con alas de fenotipo *Serratia*. Cuando hay pérdida de heterocigosis se pueden detectar los daños ocasionados por mutágenos como el MMS (Graf *et al.*, 1996). En las moscas con fenotipo silvestre transheterocigotas podemos ver daños como mutaciones y recombinación, ya que no está presente la inversión múltiple, expresándose como manchas simples y gemelas y en las heterocigotas con alas *Serratia*, sólo se observan manchas simples causadas por mutaciones debido a que la inversión múltiple impide la recombinación somática por recombinación entre homólogos (Graf *et al.*, 1984).