

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“EFECTO DEL LICOPENO ANTE EL URETANO Y EL
PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN SMART EN ALA
DE *Drosophila melanogaster*
(CBE)”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

ANDREA HERNÁNDEZ GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:
Biól. Luis Felipe Santos Cruz



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉX.

2012



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.

AGRADECIMIENTOS

A Dios: Por darme la oportunidad de hacer posible todo lo que he logrado y permitirme vivir esta grandiosa experiencia.

Al profesor Luis Felipe Santos: Por ayudarme, enseñarme y brindarme su apoyo durante mi estancia en el Laboratorio de Genética Toxicológica y darme la oportunidad de concluir una etapa de mi vida profesional. Gracias por todo.

A las maestras Irma Dueñas, María Eugenia Heres y Laura Castañeda: Por sus consejos, sus pláticas amenas, por enriquecer mi formación profesional, por su apoyo y por hacer más agradable mi estancia en el laboratorio. Gracias.

A la Dra. Anita Bores: Por su importante aportación en este trabajo de tesis y por corregir mis faltas. Gracias

Al maestro Ángel Durán: Por su importante participación asesorándome en la parte estadística. Gracias.

Al profesor Luis Barbo: Por enriquecer el contenido de esta tesis y su aportación en este trabajo. Gracias.

A la Universidad Nacional Autónoma de México: Por permitirme ser parte de la casa de estudios más importante.

DEDICATORIAS

A mis padres Lourdes y Ramiro: Por su amor y apoyo incondicional, por su comprensión y paciencia, por ayudarme a hacer posible mi formación profesional, por toda la confianza que depositaron en mí, por impulsarme a seguir adelante y creer que lograría todo lo que me propusiera, por todo su esfuerzo para que nada me faltara y darme un hogar feliz, ¡muchas gracias por todo! Los amo.

A mis hermanas Laura y Lulú: Por estar siempre conmigo escuchándome y apoyándome en todo momento, por hacer agradable cada momento juntas, por sus consejos y sus risas muchas gracias por todo hermanitas.

A Daniel: Por cambiarme la vida y dejarme ser parte de la suya, por darme su apoyo y amor incondicional, por creer en mí, por todo el tiempo que hemos compartido y estar conmigo cuando más lo he necesitado, por ser parte fundamental de la realización de muchos sueños y por ser una persona muy importante en mi vida. Gracias amor.

A Lupita: Por ser una amiga incondicional, por sus consejos y regaños, por su amistad, cariño y apoyo, por todos los momentos de alegría, tristeza y locuras compartidas. Gracias Lupis.

A mis grandes amigos Anahí, Samantha, Oscar, Paola y Jazmín: Por brindarme su amistad, por escucharme y estar conmigo en momentos difíciles, por hacer más agradable mi estancia en la FESI, por todas sus bromas, risas y alegrías compartidas. Muchas gracias.

A Gaby: Por ofrecerme una amistad sincera, por todos los momentos compartidos, por su apoyo y por escucharme. Gracias Gaby.

A Viry, Jos, Carmen y Noemí: por hacer tan agradables los momentos en el laboratorio, por escucharme y aconsejarme, por ser mis amigas y hermanas académicas. Muchas gracias niñas.

Y a todas las personas que me han ayudado de alguna manera para lograr esta meta.

¡MUCHAS GRACIAS A TODOS!

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
LICOPENO.....	2
PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.....	4
URETANO O CARBAMATO DE ETILO.....	4
METABOLISMO XENOBIÓTICO.....	5
FASE I.....	6
Citocromos P450.....	6
FASE II.....	7
Reacciones de Fase II.....	7
METABOLISMO DEL URETANO O CARBAMATO DE ETILO.....	8
PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICAS.....	10
<i>Drosophila melanogaster</i>	11
ANTECEDENTES	12
JUSTIFICACIÓN	14
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO GENERAL	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
RESULTADOS	20
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	37
RECOMENDACIONES	37
REFERENCIAS	38
ANEXO 1	46
Anexo 1.1.....	47
Anexo 1.2.....	49
ANEXO 2	50
ANEXO 3	50

LISTA DE ABREVIATURAS

Bd^s: *Beaded Serratia*

CE: Cruza estándar

CBE: Cruza de bioactivación elevada

CHO: *Chinese hamster ovary* (ovario de hámster chino)

CYP450s: Citocromos P450

DEN: N-nitrosodietilamina

EROs: Especies reactivas del oxígeno

flr³: Marcador flama “*flare*” (flama)

GSH: Glutación

GST: Glutación S-transferasa

IARC: International Agency for Research on Cancer (Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer)

K-S: Prueba de Kolmogorov-Smirnov

LYCO: Licopeno

MIC: Medio Instantáneo Carolina

MLTK: *Mouse Lymphoma/Thymidine Kinase Test* (Prueba Linfoma/Timidina quinasa en ratón)

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

MX: Metabolismo xenobiótico

NADPH: Fosfato de dihidronicotinamida-adenindinucleótido

ORR: Marcador Oregon resistente al DDT

PAPS: 3'-fosfoadenosil-5'-fosfosulfato

SAM: S-adenosil-metionina

SMART: *Somatic Mutation and Recombination Test* (Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas)

TM3: *Three multiple three* (triple inversión en el cromosoma tres)

UDP: Uridindifosfato

UGT: UDP-glucuronosiltransferasa

URE: Uretano o carbamato de etilo

VC: Vinil carbamato

VCO: Vinil carbamato epóxido

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del LYCO.....	3
Figura 2. Estructura química del URE.....	4
Figura 3. Metabolismo del URE (modificado de Sakano <i>et al.</i> 2002).....	9
Figura 4. Transformación del URE a VCO.....	9
Figura 5. Frecuencia/individuo de los diferentes tipos de mancha después del pre-tratamiento con agua ó acetona/hexano (act/hex) y el tratamiento con agua.....	21
Figura 6. Distribución del tamaño de clones <i>mwh</i> por individuo después del pre-tratamiento con agua ó acetona/hexano (act/hex) y el tratamiento con agua.....	22
Figura 7. Frecuencia/individuo de los diferentes tipos de mancha después del pre-tratamiento con acetona/hexano (act/hex) ó LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μ M), y el tratamiento con agua.....	23
Figura 8. Distribución del tamaño de clones <i>mwh</i> por individuo después del pre-tratamiento con acetona/hexano (act/hex) ó LYCO (1.8, 0.9 y 0.45 μ M), y el tratamiento con agua.....	24
Figura 9. Frecuencia/individuo de los diferentes tipos de mancha después del pre-tratamiento con acetona/hexano (act/hex) ó LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μ M) y el tratamiento con agua o URE 20 mM.....	26
Figura 10. Frecuencia/individuo de los diferentes tipos de mancha después del pre-tratamiento con acetona/hexano (act/hex) ó LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μ M) y el tratamiento con URE 20 mM.....	27

Figura 11. Distribución del tamaño de clones <i>mwh</i> por individuo después del pre-tratamiento con acetona/hexano (act/hex) ó LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μ M), y el tratamiento con agua ó URE 20 mM.....	28
Figura 12. Distribución del tamaño de clones <i>mwh</i> por individuo después del pre-tratamiento con acetona/hexano (act/hex) ó LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μ M), y el tratamiento con URE 20 mM.....	28
Figura 13. Frecuencia/individuo de los diferentes tipos de mancha después del pre-tratamiento con acetona/hexano (act/hex) ó LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μ M), y el tratamiento con agua ó H ₂ O ₂ 20 mM.....	30
Figura 14. Frecuencia/individuo de los diferentes tipos de mancha después del pre-tratamiento con acetona/hexano (act/hex) ó LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μ M), y el tratamiento con H ₂ O ₂ 20 mM.....	31
Figura 15. Distribución del tamaño de clones <i>mwh</i> por individuo después del pre-tratamiento con acetona/hexano (act/hex) ó LYCO (0.45,0.9 y 1.8 μ M), y el tratamiento con agua ó H ₂ O ₂ 20 mM.....	32
Figura 16. Distribución del tamaño de clones <i>mwh</i> por individuo después del pre-tratamiento con acetona/hexano (act/hex) ó LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μ M), y el tratamiento con H ₂ O ₂ 20 mM.....	32
Figura 17a. Eventos genéticos que ocasionan la pérdida de heterocigosis, para los marcadores <i>flr</i> ³ y <i>mwh</i> , y la formación de manchas en SMART.....	47
Figura 17b. Eventos genéticos que ocasionan la pérdida de heterocigosis, para los marcadores <i>flr</i> ³ y <i>mwh</i> , y la formación de manchas en SMART.....	48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resumen del diseño experimental (el signo positivo (+) indica que pre-tratamiento corresponde a cada tratamiento).....	17
Tabla 2. Frecuencia de manchas/individuo de los resultados SMART para la CBE y su diagnóstico estadístico*. Testigo agua-agua y act/hex-agua.....	20
Tabla 3. Frecuencia de manchas/individuo de los resultados SMART para la CBE y su diagnóstico estadístico*. Testigo acetona/hexano-agua vs LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μ M)-agua.....	22
Tabla 4. Frecuencia de manchas/individuo de los resultados SMART para la CBE y su diagnóstico estadístico*. A) Testigo acetona/hexano-agua vs URE 20 mM ó LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μ M)-URE; y B) Testigo URE 20 mMvs LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μ M)-URE 20 mM.....	25
Tabla 5. Frecuencia de manchas/individuo de los resultados SMART para la CBE y su diagnóstico estadístico*. A) Testigo acetona/hexano-agua vs H ₂ O ₂ 20 mM ó LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μ M)-H ₂ O ₂ ; y B) Testigo acetona/hexano-H ₂ O ₂ 20 mM vs LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μ M)-H ₂ O ₂ 20 mM.....	29

EFFECTO DEL LICOPENO ANTE EL URETANO Y EL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN SMART EN ALA DE *Drosophila melanogaster* (CBE)

RESUMEN

El licopeno (LYCO) es un carotenoide presente en algunos alimentos, actúa principalmente como antioxidante debido a sus dobles enlaces conjugados y modula el Metabolismo xenobiótico (MX). El uretano (URE) es un promutágeno que se encuentra generalmente en alimentos fermentados es capaz de producir epóxidos que dañan el ADN. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una especie reactiva de oxígeno (EROs) que también daña al ADN. Debido a las propiedades quimiopreventivas reportadas para el LYCO, se evaluó su efecto sobre el URE y el H_2O_2 , en la prueba SMART en ala de *D. melanogaster* cruza de bioactivación elevada (CBE). Se propagaron las líneas *flare*³, *Oregon-flare*³ y *multiple wing hairs* para realizar la CBE que presenta altos niveles de citocromos P450 (CYP450s). Larvas de 72 ± 4 h, se pre-trataron (agua miliQ, [acetona 2%-hexano (0.017 μ L/mL)], LYCO 0.45, 0.9 y 1.8 μ M) bajo condiciones de oscuridad, durante 6 h a 25°C. Después se colocaron en tubos de ensayo con 0.5 g de medio instantáneo hidratado con 2 mL de los tratamientos (agua miliQ, H_2O_2 y URE 20 mM) y se incubaron a 25°C hasta que emergieron los imagos. Éstos se colectaron y almacenaron en alcohol al 70%, para realizar preparaciones permanentes de las alas de fenotipo silvestre y analizarlas con un objetivo a 40x, registrando el número y tipo de manchas por individuo. Los datos se analizaron con el programa estadístico SMART para PC, la prueba *U* de Mann-Whitney-Wilcoxon y la prueba de Kolmogorov-Smirnov (K-S). Los resultados indican que el LYCO pudo actuar como: a) modulador del MX, ya sea inhibiendo algunos CYP450s que podrían participar en el metabolismo del URE o induciendo GST y GSH que ayudan en conjunto a la desintoxicación de los metabolitos generados por el URE; b) prooxidante con el H_2O_2 generando metabolitos epóxidos dañinos para el ADN, o lipoperoxidación. Concluyendo que el LYCO: 1) no mostró efecto genotóxico a ninguna concentración; 2) redujo la genotoxicidad inducida por el URE en todas las concentraciones; 3) tuvo efecto genotóxico con los tratamientos con H_2O_2 .

Palabras clave: licopeno, uretano, peróxido de hidrógeno, SMART, *D. melanogaster*

INTRODUCCIÓN

LICOPENO

El consumo de frutas y verduras es de gran importancia debido a que son benéficas para la salud, esto se relaciona con la presencia de sustancias químicas tales como carotenoides, flavonoides, terpenos, isotiocianatos y fitoesteroles. Los carotenoides son pigmentos naturales sintetizados por plantas y microorganismos, responsables en parte del color de los mismos. El licopeno (LYCO) es un carotenoide que está presente en el jitomate, la sandía, la papaya y la toronja, es un isómero acíclico del β -caroteno, en la naturaleza predomina en la forma isomérica trans, pero es susceptible a la luz, al oxígeno y al calor, lo que provoca cambios químicos tales como isómeros cis, oxidación y degradación (Rao *et al.*, 2003; Lee y Chen, 2002). El LYCO posee una cadena de átomos de carbono e hidrógeno ($C_{40}H_{56}$) con 13 enlaces dobles de los cuales 11 están conjugados (Figura 1), lo que le confiere un alto potencial antioxidante (Rao y Agarwal, 1999; Stahl y Sies, 1996; Di Mascio *et al.*, 1989), por lo que puede proteger del daño oxidativo a biomoléculas tales como lipoproteínas de baja densidad, proteínas, lípidos y ADN, mediante la captura y neutralización de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Rao y Agarwal, 1998).

El LYCO es liposoluble por lo que al ingerirlo como parte de la dieta tiende a acumularse normalmente en los ambientes lipofílicos de la célula, tales como membranas celulares y lipoproteínas, y por lo tanto es de esperarse que su efecto antioxidante sea en este tipo de ambientes (Rao y Agarwal, 1999).

Además de su propiedad antioxidante el LYCO posee otros efectos, tales como antimutagénicos y anticancerígenos (Bhuvanewari y Nagini, 2005).

Los mecanismos reportados que explican su actividad antimutagénica y anticancerígena son:

- 1) Modulación del metabolismo xenobiótico (MX) mediante, la inhibición de algunos Citocromos P450 (CYP450s) como el CYP2E1 que en mamíferos, participa en la biotransformación de ciertos compuestos xenobióticos o cancerígenos (Louisa *et al.*, 2009), o la inducción de enzimas de la Fase II, tales como la glutatión S-transferasa (GST) que pueden eliminar algunos de los

metabolitos que se producen en la Fase I del MX (Wang *et al.*, 2010), así como también incrementar los niveles de glutatión (GSH) (Wertz *et al.*, 2004; Breinholt *et al.*, 2000); 2) Estimulación de la unión intercelular de abertura (*gap junction*) (Aust *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 1991) que está relacionada con la inhibición de la proliferación de células cancerosas (Kotake-Nara *et al.*, 2001; Levy *et al.*, 1995) ó la inducción de la apoptosis (Tang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2003).

El LYCO puede generar metabolitos por agentes oxidantes u oxidación *in vivo*. Entre los principales metabolitos tenemos al licopeno 1,2-epóxido, licopeno 5,6-epóxido, licopeno 1,2,5,6-diepóxido, 2,6-ciclicopeno 1,5-epóxido, 2,7,11-trimetil-tetradecahexaeno-1,14-dial y 2,6-ciclicopeno-1,5-diols A y B (Khachik *et al.*, 1998; Khachik *et al.*, 1997). Algunos de los efectos benéficos o adversos del LYCO han sido adjudicados a sus metabolitos, así por ejemplo, Aust *et al.* en el 2003 reportaron que el 2,7,11-trimetil-tetradecahexaeno-1,14-dial, estimula la comunicación celular. Por otro lado, Yeh y Hu (2000, 2001) trabajaron con LYCO oxidado y observaron la inducción de daño oxidativo al ADN en fibroblastos Hs68, efecto pro-oxidante y promoción de la lipoperoxidación, infiriendo que el efecto negativo pudo haber sido provocado por los epóxidos del LYCO.

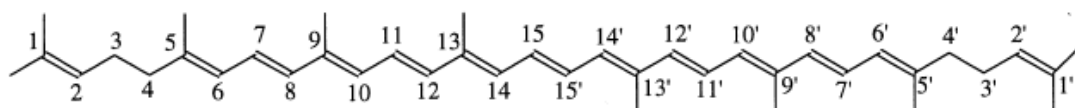


Fig. 1. Estructura química del LYCO.

PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Existen compuestos que dañan el material genético como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que es una EROs con la capacidad de atravesar fácilmente las membranas celulares debido a que no tiene carga. Este compuesto puede formar radicales hidroxilo ($HO\bullet$) por la reacción Fenton, provocando estrés oxidativo, lipoperoxidación, daño a proteínas y ADN, en este último causa transiciones y transversiones, formación de sitios abásicos (apurínicos o apirimídicos), rompimientos de cadena dobles y simples (Barbouti *et al.*, 2002; Meneghini, 1997; Halliwell y Aruoma, 1991).

El H_2O_2 ha sido utilizado para causar diversos tipos de daño (genotóxico, apoptótico, necrótico u oxidante) en varios modelos *in vitro*, empleando cultivos celulares (Barbouti *et al.*, 2002; Gardner *et al.*, 1997; Janero *et al.*, 1991) observándose también que a concentraciones bajas puede estimular la proliferación celular (Burdon, 1995); y en modelos *in vivo* como en *D. melanogaster* donde se ha demostrado que provoca estrés oxidativo e incremento de la actividad de catalasa (Furukawa *et al.*, 1993).

URETANO O CARBAMATO DE ETILO

El uretano (URE) ($NH_2COOCH_2CH_3$) (Figura 2) es otro compuesto que daña el material genético), el cual se encuentra en las hojas y el humo del tabaco (Schmeltz *et al.*, 1978) así como en la mayoría de alimentos fermentados. Este compuesto se forma por la reacción del etanol (a pH ácido) con diversos compuestos que poseen un grupo carbamílico, como la urea producida por las levaduras, o la citrulina producida por bacterias lácticas a partir de arginina (Bordons *et al.*, 2004). Se ha utilizado como hipnótico en el hombre y anestésico en animales de laboratorio (Frölich y Würgler, 1990).

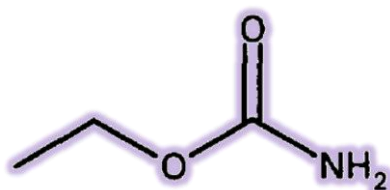


Fig. 2. Estructura química del URE.

La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC por sus siglas en inglés) ha clasificado al URE dentro del grupo 2B, categoría que corresponde a los compuestos con suficiente información sobre su potencial cancerígeno en animales de experimentación, pero insuficiente en el humano (Sakano *et al.*, 2002; IARC 1987). En ratones ha demostrado ser cancerígeno (Field y Lang, 1988); en ratas y conejillos de indias ha producido tumores pulmonares, linfomas, hepatomas y melanomas (Del Valle, 2003; IARC, 1987); y en *D. melanogaster* es genotóxico (Heres *et al.*, 2010; Graf *et al.*, 1998; Frölich y Würigler, 1990).

METABOLISMO XENOBIÓTICO

La eliminación de compuestos extraños para el organismo, conocidos como agentes xenobióticos (presentes en los alimentos, fármacos y el medio ambiente), es facilitada por el metabolismo xenobiótico (MX), mediante un conjunto de reacciones denominadas de biotransformación. Este proceso se subdivide en tres fases. En la Fase I los xenobióticos son convertidos en productos más hidrosolubles mediante reacciones de óxido-reducción, obteniendo como resultado un metabolito más polar; sin embargo, en ocasiones compuestos conocidos como promutágenos pueden formar metabolitos más reactivos que el compuesto original, los cuales podrían causar daños al ADN. En la Fase II los metabolitos, provenientes de la Fase I, se unen covalentemente a moléculas endógenas de la célula tales como el ácido glucurónico, glutatión, grupos sulfato y aminoácidos generando conjugados, esto aumenta la hidrosolubilidad del compuesto lo que disminuye su bioacumulación y su efecto toxicológico. Ambos procesos facilitan la eliminación renal o biliar de los metabolitos (Fase III). No todos los xenobióticos necesariamente pasan por un proceso de Fase I seguido de otro de Fase II, el objetivo principal de las reacciones de biotransformación es la modificación de la hidrofobicidad de un compuesto de manera que se facilita su eliminación y, en ocasiones, tal objetivo se alcanza con sólo reacciones de Fase I, sólo de Fase II, o entre ambas (Castell, 2005).

FASE I

En esta fase se engloban procesos químicos de distinta naturaleza (principalmente oxidación, oxigenación, reducción e hidrólisis, así como desalquilaciones, deshalogenaciones), cuyo resultado es la modificación química del xenobiótico con la formación de nuevos grupos funcionales, obteniendo como resultado un metabolito más hidrosoluble (Castell, 2005).

Citocromos P450

Una de las principales familias de enzimas implicadas en las reacciones de Fase I son los citocromos P450 (CYP450s) los cuales están formados por complejos de hierro-porfirina conocidos como grupo hemo. El nombre P450 deriva del mayor espectro de absorción a 450 nm causado en una atmósfera de monóxido de carbono (CO). Como otras hemoproteínas, los CYPs 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; desde el punto de vista bioquímico, los CYP450s se caracterizan por ser capaces de transportar electrones (Nelson y Cox, 2001).

Los CYP450s están involucrados en el metabolismo oxidativo de moléculas endógenas como esteroides, ácidos grasos o vitaminas liposolubles (A y D), y en el MX de diversos fármacos, cancerígenos, pesticidas y alcaloides, entre otros (Ortiz de Montellano, 1995).

En los eucariontes la concentración más alta de enzimas CYP450s activas en la biotransformación de xenobióticos se encuentra en la membrana del retículo endoplásmico liso de las células del hígado, pero también se hallan en casi todos los tejidos (Xu *et al.*, 2005).

Los CYP450s funcionan como monoxigenasas, es decir, catalizan reacciones en las que se incorpora uno de los dos átomos de la molécula de oxígeno y el otro se reduce para formar agua y para ello se requieren dos electrones que son donados por el NADPH, en pasos subsecuentes, por la enzima NADPH-450 reductasa. Los CYP450s, son capaces de metabolizar un gran número de substratos, principalmente a través de reacciones de oxidación, pero también de reducción e hidrólisis (Nelson y Cox, 2001).

FASE II

En esta fase se llevan a cabo reacciones de conjugación, catalizadas por un conjunto de enzimas, la mayoría de ellas localizadas en el citosol. Las reacciones consisten en agregar un grupo polar de tamaño relativamente grande a los productos de la Fase I o a los xenobióticos originales que contienen los grupos funcionales apropiados para ser sustratos de las reacciones de conjugación. Los donadores de los grupos polares tienen que ser compuestos de alta energía, ya que las reacciones de conjugación no son termodinámicamente favorables. El resultado que se logra con estas reacciones es un incremento de la hidrosolubilidad del xenobiótico (Murray *et al.*, 1992).

Reacciones de Fase II

Estas reacciones pueden ser:

Glucuronidación: Consiste en agregar un grupo glucuronil a un grupo hidroxilo, amino o sulfhidrilo de la sustancia tóxica. La enzima que cataliza la reacción es la UDP-glucuronosiltransferasa (UGT) y el donador del grupo polar es el ácido glucurónico-UDP. La enzima se encuentra en el retículo endoplásmico liso y en el citosol. Los compuestos glucuronidados son muy hidrosolubles por lo que se excretan por la orina y la bilis (Murray *et al.*, 1992).

Sulfatación: Consiste en la transferencia de un grupo sulfato del 3'-fosfoadenosil-5'-fosfosulfato (PAPS), a un grupo hidroxilo o amino en el xenobiótico. La reacción es catalizada por sulfotransferasas que se localizan en el citosol. El producto es un sulfato orgánico ionizado muy hidrosoluble y es excretado por la orina (Murray *et al.*, 1992).

Conjugación con aminoácidos: Consiste en la formación de una unión peptídica entre el grupo amino de un aminoácido, normalmente glicina, y un carboxilo en el xenobiótico. Para que se pueda llevar a cabo esta reacción es indispensable que el xenobiótico tenga un grupo carboxilo. Estos

conjugados son eliminado en la orina debido a que el sistema de transporte del riñón reconoce al aminoácido (Murray *et al.*, 1992).

Conjugación con glutatión: El glutatión (GSH) es un tripéptido de ácido glutámico, cisteína y glicina, el grupo tiol (SH) indica el grupo sulfhidrilo de la cisteína y es la parte activa de la molécula. Además es un importante agente reductor y antioxidante. La conjugación consiste en la adición de GSH a través de su grupo sulfhidrilo con un carbono electrofílico del xenobiótico. La reacción es catalizada por la glutatión S-transferasa (GST) que se encuentra en el citosol, el retículo endoplásmico y la membrana interna mitocondrial, el mismo GSH es el cofactor de alta energía. Esta reacción es importante en la desintoxicación de epóxidos y peróxidos (Murray *et al.*, 1992).

Otras reacciones: Como la acetilación que es la transferencia de grupos acetato de la acetil-CoA al xenobiótico, catalizada por acetiltransferasas presentes en el citosol. También pueden ocurrir metilaciones que consisten en la transferencia de un grupo metilo a un hidroxilo, amino o sulfhidrilo, ésta es catalizada por las metiltransferasas, empleando como donador de grupos metilo a la S-adenosil-metionina (SAM) (Murray *et al.*, 1992).

METABOLISMO DEL URETANO O CARBAMATO DE ETILO

El URE *per se* no tiene efecto cancerígeno o mutagénico; sin embargo, después de pasar por el MX se activa, por lo que es un promutágeno. El metabolismo del URE puede ser llevado a cabo por tres vías diferentes (Figura 3). En la primera, el URE es hidrolizado por esterasas a etanol, amonio y dióxido de carbono, estos compuestos son muy hidrosolubles, por lo que son excretados sin causar daño. En la segunda es convertido por los CYP450s a *N*-Hidroxiuretano el cual es oxidado a un radical nitroso o puede ser convertido por esterasas a hidroxilamina lo cual puede causar daño al ADN. En la tercera, es transformado por los CYP450s, para mamíferos se reporta que es el CYP2E1, a vinil carbamato (VC) y éste a su vez a vinil carbamato epóxido (VCO) (Figura 4) (Sakano *et al.*, 2002;

Woo Cha *et al.*, 2000), el cual puede unirse covalentemente a proteínas, ARN y ADN formando aductos (Frölich y Würigler 1990; Fossa *et al.*, 1985; Miller y Miller, 1983). También se ha demostrado que el URE afecta la división celular, ya que puede incrementar (Hoffler *et al.*, 2005; Takahashi, 1954) o inhibir (Field y Lang, 1988) la actividad mitótica.

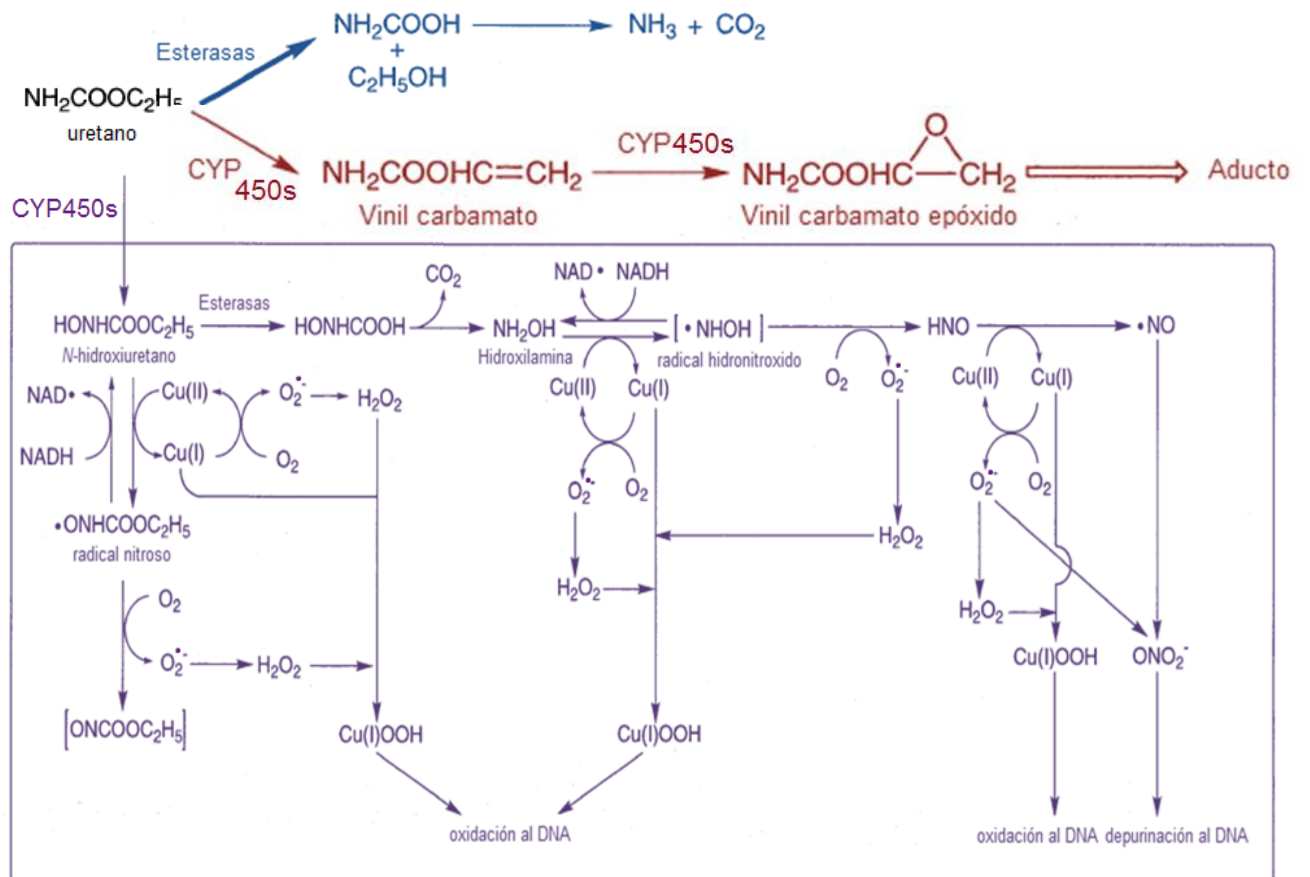


Fig. 3. Metabolismo del URE (modificado de Sakano *et al.* 2002).

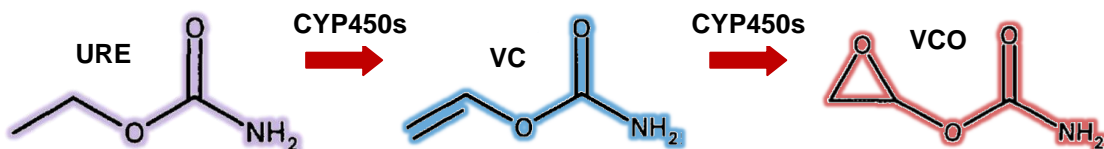


Fig. 4 Transformación del URE a VCO.

PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICAS

La Genética Toxicológica ha desarrollado diversos métodos para evaluar los daños o beneficios que los compuestos y sus metabolitos intermediarios pudieran causar sobre el material genético del organismo, tratando de comprender los eventos que ocurren desde la interacción del ADN con el xenobiótico, hasta la expresión fenotípica del daño, por lo que hace uso de diversos bioensayos, tanto a corto como a largo plazo, entre los cuales destacan (Sánchez *et al.*, 2000):

- ★ Prueba de Ames con *Salmonella typhimurium*.
- ★ Prueba con *Saccharomyces cerevisiae* D7.
- ★ Ensayo de micronúcleos en: médula ósea (roedores), sangre periférica (roedores, humanos), cultivos de linfocitos, células meristemáticas (*Allium cepa*, *Vicia faba*), tétradas (*Tradescantia* spp.).
- ★ Intercambio de cromátides hermanas en: cultivo de linfocitos de sangre periférica (roedores, humanos), cultivos de células de ovario de hámster chino (CHO), células de médula ósea (roedores), células meristemáticas (*Vicia faba*).
- ★ Ensayo cometa (*Single Cell Gel Microelectrophoresis*) en linfocitos.
- ★ Prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) en ala y ojo (*Drosophila melanogaster*).

Los bioensayos hechos con *D. melanogaster* tal como SMART son reconocidos como ideal para realizar investigación (Vogel *et al.*, 1999) debido a que se pueden realizar *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).

SMART en ala de *D. melanogaster* es un bioensayo a corto plazo que ha sido suficientemente validado a la fecha (Graf *et al.*, 1996). Se fundamenta en la pérdida de heterocigosis de genes marcadores que se expresan como manchas de tricomas múltiples o malformados ocasionada por el efecto de compuestos con efecto genotóxico (Anexo 1). La principal ventaja de esta prueba es que se realiza *in vivo* y no sólo detecta varios tipos de mutación (mutaciones puntuales,

deleciones y aneuploidias), sino que es posible cuantificar la actividad recombinogénica y el efecto sobre la división celular (Spanó y Graf 1998; Graf *et al.*, 1984) (Anexo 1.1 figura 17a y 17b).

SMART en ala utiliza tres cepas mutantes de *D. melanogaster* con marcadores recesivos: *mwh/mwh* (*multiple wing hairs*), *flr³ / TM3, Bd^s* (*flare³*) y *ORR(1); ORR(2); flr³ / TM3, Bd^s* (*Oregon-flare³*) (para detalles ver Anexo 1.2), con las que se realizan dos cruza: la cruza estándar (CE) (hembras vírgenes *flare³* con machos *mwh/mwh*) (Graf *et al.*, 1989) y la cruza de bioactivación elevada (CBE) (hembras vírgenes *Oregon-flare³* con machos *mwh/mwh*) (Graf y Van Schaik, 1992). En la CE se producen 2 tipos de descendientes: trans-heterocigotos *mwh +/+ flr³* con alas de tipo silvestre y heterocigotos *mwh +/- TM3, Bd^s* con alas de fenotipo *Beaded Serratia*; la CBE produce dos tipos de descendientes: trans-heterocigotos *ORR(1);ORR(2);mwh +/+ flr³* con alas de fenotipo silvestre y heterocigotos *ORR(1);ORR(2);mwh +/- TM3, Bd^s* con alas de fenotipo *Beaded Serratia*.

D. melanogaster

D. melanogaster ofrece una serie de ventajas como sistema de prueba de genotoxicidad tales como: (1) es un modelo *in vivo*, (2) es un organismo eucariótico pluricelular con un ciclo de vida corto, (3) tiene una descendencia numerosa por generación, (4) es de fácil mantenimiento, (5) posee marcadores genéticos específicos, (6) el genoma está totalmente mapeado y secuenciado, (7) las enzimas del MX son similares a las que poseen los humanos. Además es un organismo extensamente estudiado ya que por muchos años se ha utilizados en la investigación científica de disciplinas como: Genética, Biología del Desarrollo, Genética Toxicológica, entre otras (Castañeda-Partida *et al.*, 2008; Guzmán y Graf, 1995).

ANTECEDENTES

De acuerdo con La Vecchia en 1998, la dieta mediterránea, es rica en jitomate, por lo que en diversos estudios epidemiológicos se ha asociado su ingesta o la de sus productos derivados con la reducción de la incidencia de algunos tipos de cáncer (Giovannucci, 1999; Clinton, 1998). Esta propiedad se ha atribuido a que el jitomate contiene compuestos bioactivos tales como los carotenoides, entre los cuales destaca el LYCO, compuesto que ha despertado un gran interés alrededor del mundo debido a sus propiedades benéficas. Se han llevado a cabo diversos estudios que han demostrado que este carotenoide, no presenta actividad genotóxica, como lo reportan Gocke en 1996 y Aizawa en el 2000 (ambos citados en EFSA, 2008), los cuales no mostraron actividad mutagénica en la prueba de Ames; Muster en 1996 (citado en EFSA, 2008) con la prueba ML/TK (Mouse Lymphoma/Thymidine Kinase Test) no detectó mutaciones, ni daño cromosómico en células de mamíferos con y sin activación metabólica; Miller en 1996 (citado en EFSA, 2008) y Rauscher et al. (1998), no encontraron daños al ADN en la prueba de micronúcleos en medula de ratón; Pool-Zobel et al. (1997); Collins et al. (1998) y Riso et al. (1999) no encontraron daños al ADN en el ensayo cometa en linfocitos humanos tratados con diferentes concentraciones y periodos de exposición de LYCO.

Además varios estudios han demostrado que el LYCO presenta efectos antioxidantes; Rao y Agarwal en 1998 reportan que después de la ingesta de jugo de jitomate o de cápsulas de LYCO por una semana hubo incremento significativo de este carotenoide en el suero y como consecuencia de esta ingesta hubo reducción en la oxidación de lípidos, proteínas y ADN. En 1999 esto mismos autores reportan que las propiedades antioxidantes del LYCO se podrían deber a la captura o neutralización de EROs como H₂O₂, que se ha utilizado en varios modelos *in vitro* para causar daño celular a través de estrés oxidativo (Gardner et al., 1997).

El LYCO también puede presentar efectos anticancerígenos, como lo reportan Levy et al. (1995), Kotake-Nara et al. (2001), Zhang et al. (2003) y Tang et al. (2005) al observar la inhibición del crecimiento de células cancerosas; o antígenotóxicos ya que puede actuar como modulador de las vías metabólicas de mutágenos indirectos según lo reportaron Scolastici et al. (2008) quienes observaron efecto antígenotóxico del LYCO sobre *N*-nitrosodietilamina (DEN), potente procancerígeno que necesita ser metabolizado para causar daño. Así mismo, Louisa et al. (2009) reportaron que el LYCO inhibió el CYP2E1, el cual participa en la biotransformación de ciertos compuestos xenobióticos o cancerígenos. Breinholt et al. (2000) y Velmurugan et al. (2002) (citado en Wertz et al., 2004) observaron que el LYCO indujo la enzima GST e incrementó los niveles de GSH; Kemper et al. (1995) reportaron que éstos podrían jugar un papel importante en la desintoxicación de metabolitos de xenobióticos tales como el URE.

Sin embargo también hay reportes como los de Yeh y Hu (2000) que demostraron que el LYCO puede tener efectos pro-oxidantes y causar lipoperoxidación, estos mismos autores en el 2001 trabajaron con LYCO oxidado y observaron que los productos de la oxidación de este carotenoide provocaron daño oxidativo al ADN, infiriendo que este efecto pudo haber sido provocado por metabolitos epóxidos del LYCO ya que se ha demostrado que la oxidación del LYCO puede formar epóxidos (Khachik et al., 1998; Ben-Aziz et al., 1973).

JUSTIFICACIÓN

El uso de algunos compuestos de origen natural está ganando popularidad como uno de los procedimientos más eficaces para prevenir el cáncer. Dado que existen diferentes modos de acción por los cuales estos compuestos podrían tener efectos antimutagénicos y anticancerígenos reduciendo o previniendo el daño como es el caso del LYCO, se decidió valorar el presumible efecto antigenotóxico de este carotenoide en pre-tratamiento ante el URE y el H₂O₂.

HIPÓTESIS

El LYCO ha sido reportado con efectos antigenotóxicos por lo tanto se espera que disminuya el efecto del URE y del H₂O₂ en la prueba SMART en ala de *D. melanogaster*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del pre-tratamiento LYCO ante el URE y el H₂O₂ en la prueba SMART en ala de *D. melanogaster* en la cruza de bioactivación elevada (CBE).

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

- Uretano 99% de pureza $\text{NH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ (Fluka 94300) CAS. 51-79-6.
- Medio instantáneo Carolina (MIC) (Carolina Biological Supply Company Burlington N.C. USA).
- Licopeno $\text{C}_{40}\text{H}_{56} \geq 90\%$, a partir de jitomate (Sigma Aldrich) CAS. 502-65-8.
- Entellan (Merck, Darmstadt, Germany) CAS. 1.07961
- Solución conservadora (5 mL de tegosept al 12% (OH), 5 mL de ácido propiónico: ácido ortofosfórico (1:10) aforados a 1 litro de agua) (Dueñas *et al.*, 2001).
- Acetona 99% de pureza CH_3COCH_3 (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) CAS. 67-64-1.
- Solución de peróxido de hidrógeno H_2O_2 30% (w/w) (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) CAS. 7722-84-1.
- Hexano 95% de pureza $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ (Sigma Aldrich) CAS. 110-54-3.
- Cepas de *D. melanogaster*: Oregon-flare³ (ORR(1);ORR(2);*flr*³/TM3,Bd^s) y *multiple wing hair (mwh/mwh)* del Laboratorio de Genética Toxicológica de la FES-Iztacala, UNAM, donadas originalmente por el Dr. Ulrich Graf del Instituto de Toxicología (Swiss Federal Institute of Technology) y de la Universidad de Zurich, Schwerzenbach, Suiza.

MÉTODOS

CULTIVO Y PROPAGACIÓN DE CEPAS DE *D. melanogaster*

Las cepas de *D. melanogaster* Oregon-flare³ (ORR (1); ORR (2); *flr*³/TM3, Bd^s), y la cepa *multiple wing hairs (mwh/mwh)* se propagaron en frascos de vidrio de 250mL con 5 g de puré de papa instantáneo en hojuelas hidratado con 20mL de solución conservadora (Dueñas *et al.*, 2001) manteniéndose en incubadora a 25°C y 60% de humedad.

PRUEBA DE GENOTOXICIDAD (SMART)

CRUZA BIOACTIVACIÓN ELEVADA (CBE)

Las hembras vírgenes de la cepa *Oregon-flare*³ y los machos de la cepa *mwh* se separaron (Anexo 2). La CBE se realizó colocando hembras vírgenes *Oregon-flare* y machos *mwh* en frascos de vidrio de 250mL con puré de papa hidratado con solución conservadora, por 72 h, lo que permitió que las hembras fueran fecundadas. Posteriormente se trasvasaron las moscas en frascos que contenían medio de levadura fresca de uso comercial (Anexo 3) y éstos se mantuvieron durante 8 h en una incubadora a 25° C y 65% de humedad en completa oscuridad, transcurrido este tiempo se sacaron los adultos y los frascos regresaron a la incubadora. Después de 72 h se recuperaron las larvas (3^{er} estadio) diluyendo la levadura con agua corriente (25°C) y haciéndola pasar por una coladera de acero inoxidable de malla fina.

DISEÑO EXPERIMENTAL

La misma cantidad de larvas de 72 ± 4 h se colocaron en los pre-tratamientos: agua miliQ (agua) y acetona al 2%/ hexano (0.17 μ L/mL) (acetona-hexano) como controles negativos y LYCO a 0.45, 0.9 y 1.8 μ M disuelto en la mezcla acetona-hexano. La combinación de estos solventes fue utilizada para disolver completamente al LYCO, éste fue mantenido previamente en viales ámbar con una atmósfera de nitrógeno para evitar su oxidación. Los pre-tratamientos se realizaron en tubos de plástico con una malla de nylon en la parte inferior con 1 g de medio instantáneo carolina (MIC) molido para facilitar la recuperación de las larvas e inmerso en un vaso de precipitados de 250mL con 18mL de cualquiera de los tratamientos mencionados. Todo lo anterior se llevó a cabo en un cuarto oscuro con una lámpara de luz roja (15 W), para evitar la fotodegradación del LYCO. Los pre-tratamientos se incubaron durante 6 h a 25° C. Transcurrido este tiempo se recuperaron las larvas y se trasvasaron a tubos de ensayo con 0.5 g de MIC hidratado con 2 mL de los siguientes tratamientos: agua, URE 20 mM ó H₂O₂ 20 mM (Tabla 1). Los tubos se incubaron a 25° C hasta que emergieron los adultos. Estos se colectaron y almacenaron en frascos con alcohol al 70%.

Tabla 1. Resumen del diseño experimental (el signo positivo (+) indica qué pre-tratamiento corresponde a cada tratamiento)

Pretratamientos Tratamientos	Agua miliQ	Acetona- hexano	LYCO 0.45µM	LYCO 0.9µM	LYCO 1.8µM
Agua	-	-	-	-	+
Agua	-	-	-	+	-
Agua	-	-	+	-	-
Agua	-	+	-	-	-
Agua	+	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	+
URE	-	-	-	+	-
URE	-	-	+	-	-
URE	-	+	-	-	-
H ₂ O ₂	-	-	-	-	+
H ₂ O ₂	-	-	-	+	-
H ₂ O ₂	-	-	+	-	-
H ₂ O ₂	-	+	-	-	-

Las alas de las moscas con fenotipo silvestre (trans-heterocigotas) se disectaron y se montaron en preparaciones permanentes con Entellan. Estas se analizaron al microscopio óptico (40x) para cuantificar el número, tamaño y tipo de clones mutantes o mancha (Graf *et al.*, 1984).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tres experimentos independientes se realizaron con tres repeticiones por tratamiento. Para el análisis se tomaron en cuenta de 57 a 60 individuos por tratamiento (tamaño de muestra óptimo para la prueba 55) (Frei y Würgler, 1995) con el programa estadístico SMART PC-versión 2.1 (Frei y Würgler, 1988) que analiza estadísticamente los resultados detectando las diferencias que puedan existir entre los valores espontáneos de un testigo y las series de tratamientos experimentales. Este análisis está basado en la prueba no paramétrica de ji cuadrada para proporciones (de una cola), con un grado de libertad y una probabilidad de ≤ 0.05 .

El análisis permite decidir si la frecuencia de manchas inducidas en los tratamientos tiene un diagnóstico positivo, débil positivo, negativo o indeciso con base en las siguientes hipótesis:

- ★ Hipótesis nula (H_0): 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 cuántas veces debe incrementarse el número de eventos de los tratamientos con respecto al testigo para considerar una respuesta positiva.

Las manchas pequeñas (1-2 células) son más comunes, por lo que predominan en relación con la frecuencia de manchas grandes (>3 células) y las manchas gemelas (cuando se expresa *flare*³ junto a *mwh*). De esta manera, para considerar un incremento significativo en la frecuencia de manchas pequeñas y totales (se obtiene de la suma de todas las manchas, por lo que la contribución de las manchas pequeñas es predominante) se utiliza **m=2**, mientras que para las manchas grandes y gemelas **m=5** por ser menos comunes. Por ende son posibles las siguientes cuatro decisiones (Frei y Würzler, 1988):

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

A los resultados indecisos o débiles positivos, obtenidos con SMART se les realizó la prueba de *U* de Mann-Whitney y Wilcoxon, que considera la variabilidad entre los individuos y no requiere una distribución normal de los datos (prueba no paramétrica) con modificaciones para dos colas para datos individuales usando el programa estadístico STAT-Graphics versión 6.0. En este análisis estadístico, el diagnóstico es significativo cuando *p* es menor o igual a 0.05.

Para el análisis de las distribuciones del tamaño de los clones *mwh* 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.

RESULTADOS

Testigos Agua, Acetona y LYCO.

En la Tabla 2 y la Figura 5 se comparan los resultados obtenidos con la progenie trans-heterocigota de la CBE, después de los pre-tratamientos: agua y acetona 2%-hexano (act/hex) y el tratamiento: agua. No se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias de manchas de estos tratamientos.

Tabla 2. Frecuencia de manchas/individuo de los resultados SMART para la CBE y su diagnóstico estadístico*. Testigo agua-agua y act/hex-agua.

Manchas por individuo (número de manchas) diagnóstico estadístico*						
Pretratamiento-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) -	0.38 (023)

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

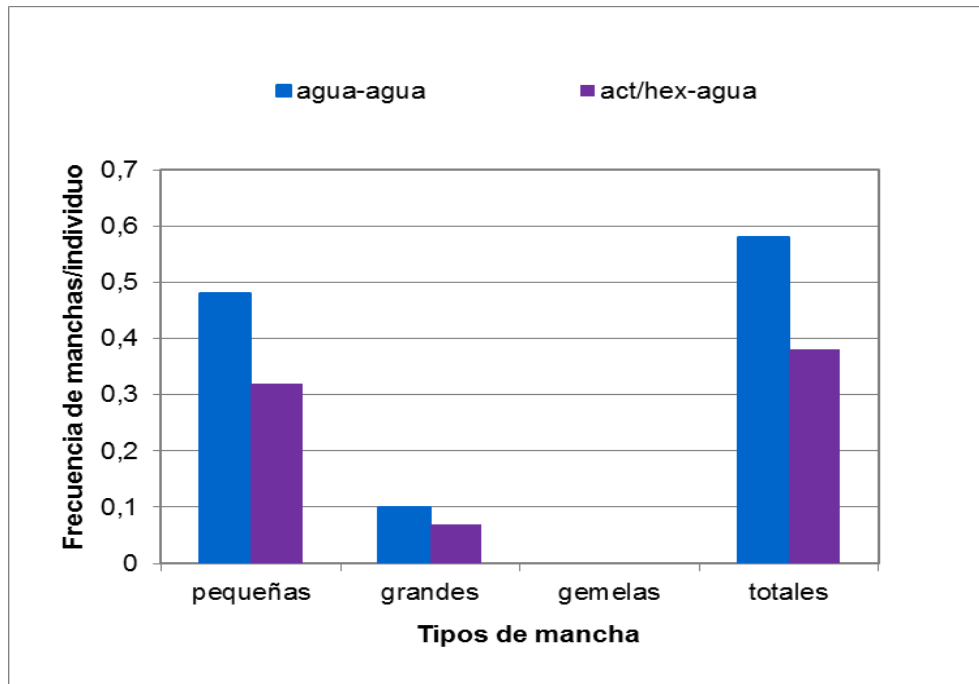


Fig. 5. Frecuencia/individuo de los diferentes tipos de mancha después del pre-tratamiento con agua ó acetona/hexano (act/hex) y el tratamiento con agua.

La distribución del tamaño de clones *mwh* por individuo para los testigos negativos agua-agua y acetona/hexano-agua, mostró que hubo diferencias significativas de acuerdo con la prueba de K-S (Figura 6).

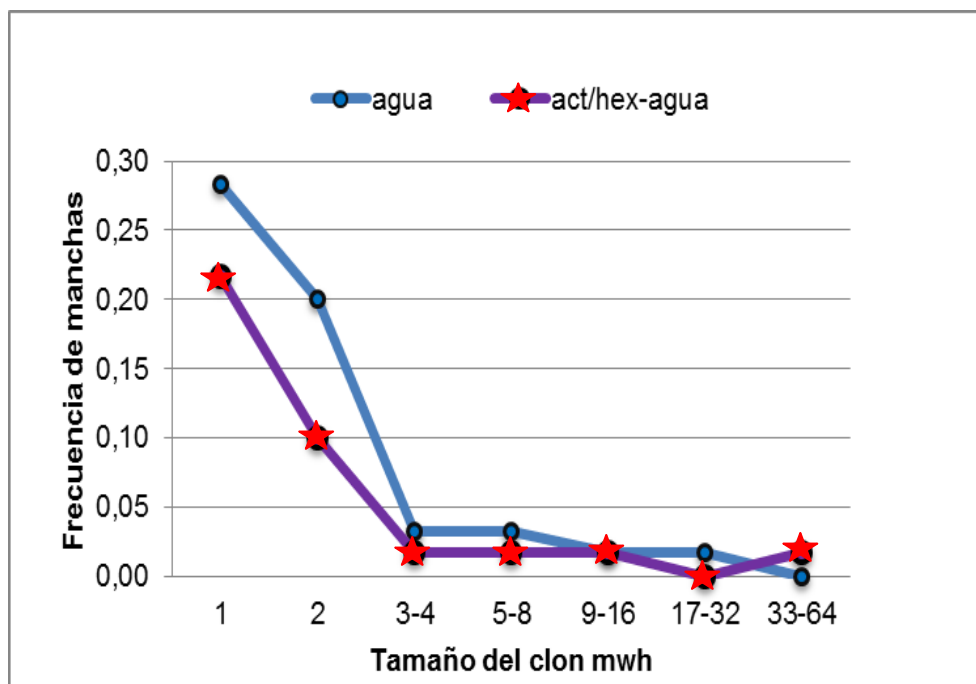


Fig. 6. Distribución del tamaño de clones *mwh* por individuo después del pre-tratamiento con agua ó acetona/hexano (act/hex) y el tratamiento con agua. Donde: ★ indica el tratamiento que tuvo diferencias significativas.

Al comparar entre el testigo negativo acetona/hexano-agua y las diferentes concentraciones de LYCO-agua no se encontraron diferencias significativas entre estos tratamientos (Tabla 3 y Figura 7).

Tabla 3. Frecuencia de manchas/individuo de los resultados SMART para la CBE y su diagnóstico estadístico*. Testigo acetona/hexano-agua vs LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μ M)-agua.

Manchas por individuo (número de manchas) diagnóstico estadístico*						
Pretratamiento-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)	0.38 (023)
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 Würigler (1988). Prueba de una cola. m = factor de multiplicación del riesgo mínimo para evaluar resultados negativos. Resultados: -, negativo; ($p < 0.05$).

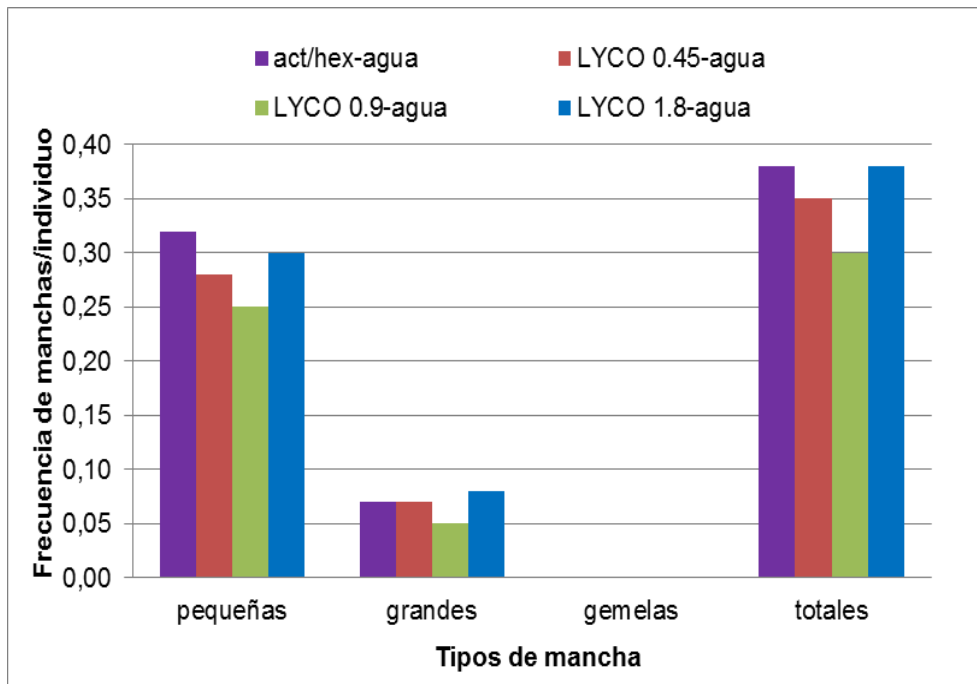


Fig. 7. Frecuencia/individuo de los diferentes tipos de mancha después del pre-tratamiento con acetona/hexano (act/hex) ó LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μM), y el tratamiento con agua.

En la distribución del tamaño de clones *mwh* por individuo para el testigo negativo acetona/hexano-agua y los tratamientos LYCO-agua, se observaron diferencias significativas sólo a la concentración de 0.9 μM de acuerdo con la prueba de K-S (Figura 8).

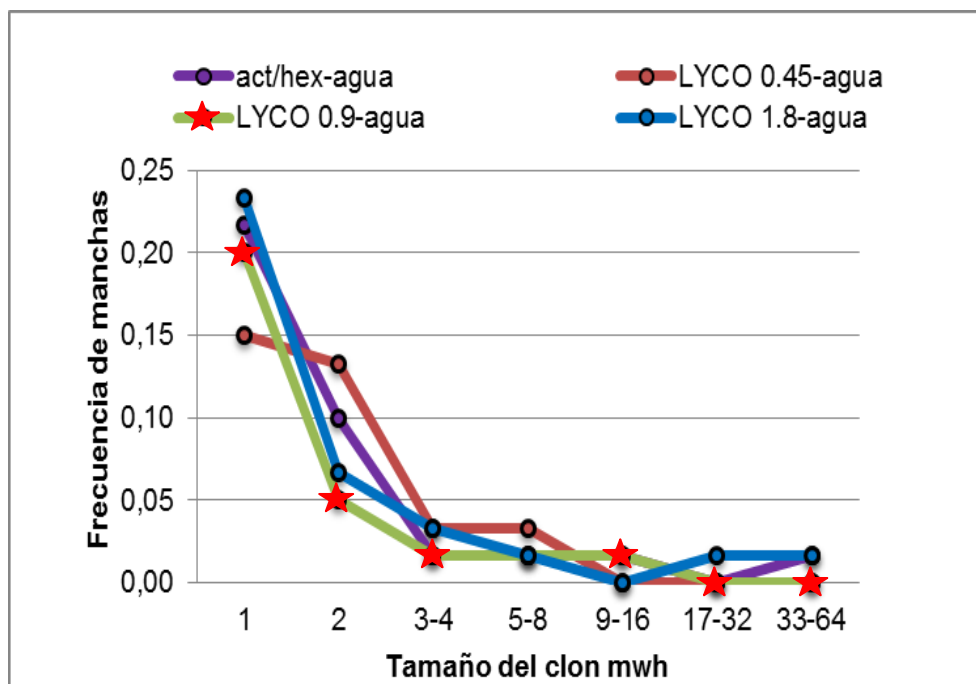


Fig. 8. Distribución del tamaño de clones *mwh* por individuo después del pre-tratamiento con acetona/hexano (act/hex), ó LYCO (1.8, 0.9 y 0.45 μ M), y el tratamiento con Agua. Donde: ★ indica el tratamiento que tuvo diferencias significativas con respecto al testigo act/hex-agua.

Pre-tratamiento LYCO vs tratamiento URE

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos para la progenie trans-heterocigota de la CBE, después de los pre-tratamientos: acetona/hexano (act/hex) ó LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μ M) y tratamientos: agua o URE 20 mM.

Tabla 4. Frecuencia de manchas/individuo de los resultados SMART para la CBE y su diagnóstico estadístico*/**. A) Testigo acetona/hexano-agua vs URE 20 mM ó LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μ M)-URE 20 mM; y B) Testigo URE 20 mM vs LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μ M)-URE 20 mM.

Manchas por individuo (número de manchas) diagnóstico estadístico*/**						
Pretratamiento-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)	0.38 (023)
act/hex-URE/agua	60	5.67 (340) +	0.55 (033) +	0.00 (00) -	6.22 (373) +	6.22 (373)
LYCO 0.45-URE	57	2.63 (150) +	0.14 (008) +	0.00 (00) -	2.77 (158) +	2.77 (158)
LYCO 0.9-URE	59	2.66 (157) +	0.22 (013) +	0.00 (00) -	2.88 (170) +	2.88 (170)
LYCO 1.8-URE	59	2.93 (173) +	0.25 (015) +	0.00 (00) -	3.19 (188) +	3.19 (188)
B)						
act/hex-URE/agua	60	5.67 (340)	0.55 (033)	0.00 (00)	6.22 (373)	6.22 (373)
LYCO 0.45-URE	57	2.63 (150) ↓	0.14 (008) ↓	0.00 (00) -	2.77 (158) ↓	2.77 (158)
LYCO 0.9-URE	59	2.66 (157) ↓	0.22 (013) -/s	0.00 (00) -	2.88 (170) ↓	2.88 (170)
LYCO 1.8-URE	59	2.93 (173) ↓	0.25 (015) -/ns	0.00 (00) -	3.19 (188) ↓	3.19 (188)

* 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; +, positivo; ↓, reducción significativa (P<0.05).

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

Al comparar el testigo acetona/hexano-agua contra el testigo positivo URE y las diferentes concentraciones de los tratamientos LYCO-URE, se obtuvieron incrementos significativos en la frecuencia de manchas pequeñas, grandes y totales para todos los tratamientos (Tabla 4(A) y Figura 9).

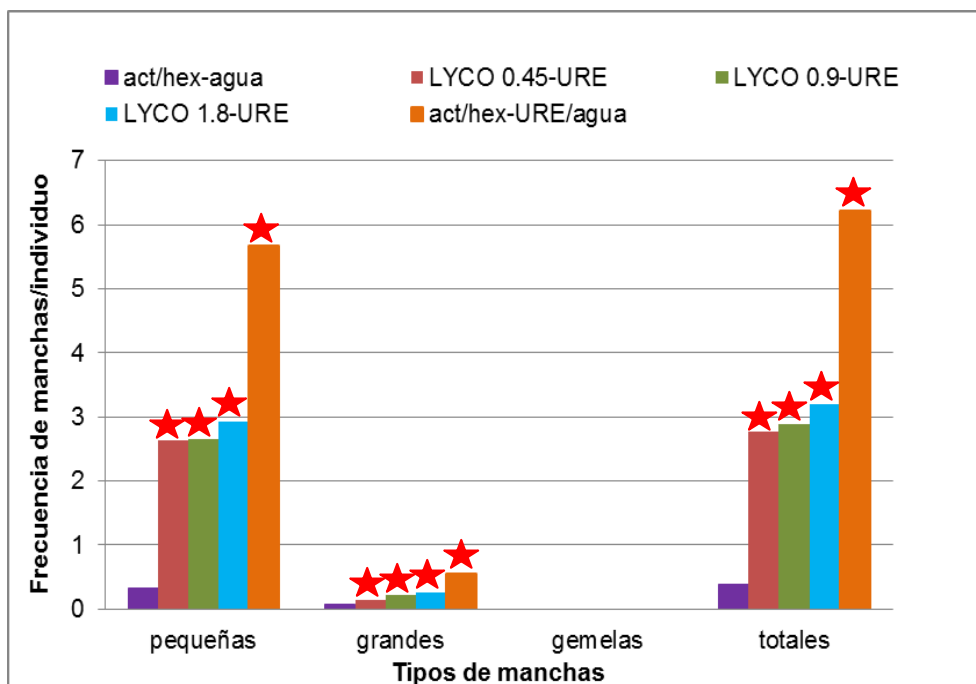


Fig. 9. Frecuencia/individuo de los diferentes tipos de mancha después del pre-tratamiento con acetona/hexano (act/hex) ó LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μM) y el tratamiento con agua ó URE 20 mM. Donde: ★ indica diferencia estadísticamente significativo con una $p \leq 0.05$ con respecto al testigo act/hex-agua.

Al comparar el testigo URE (Tabla 4 (B) y Figura 10) con los diferentes tratamientos LYCO-URE, no se encontraron incrementos significativos de la frecuencia de manchas en ninguno de los casos. Por lo anterior, se realizaron los SMART inversos y los resultados indicaron que las tres concentraciones de LYCO redujeron de manera significativa la frecuencia de manchas pequeñas y totales presentada por el testigo URE. Además en la concentración de LYCO 0.45 y 0.9 μM , también se observó reducción significativa en la frecuencia de manchas grandes.

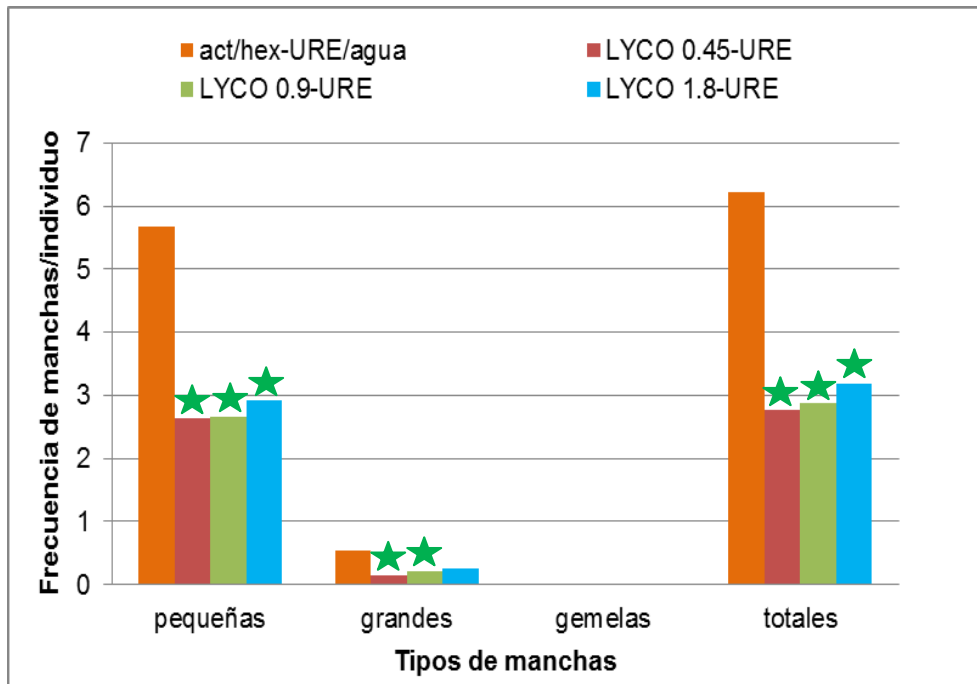


Fig. 10. Frecuencia/individuo de los diferentes tipos de mancha después del pre-tratamiento con acetona/hexano (act/hex) ó LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μ M) y el tratamiento con URE 20 mM. Donde:★ indica diferencia estadísticamente significativa con una $p \leq 0.05$ con respecto al tratamiento act/hex-URE/agua.

Como se esperaba al comparar la distribución del tamaño de clones *mwh* por individuo entre el testigo negativo acetona/hexano-agua con el testigo positivo acetona/hexano-URE/agua y los tratamientos LYCO-URE hubo diferencias estadísticamente significativas (Figura 11). También las hubo entre los tratamientos LYCO-URE, y el testigo positivo de acuerdo a la prueba de K-S (Figura 12).

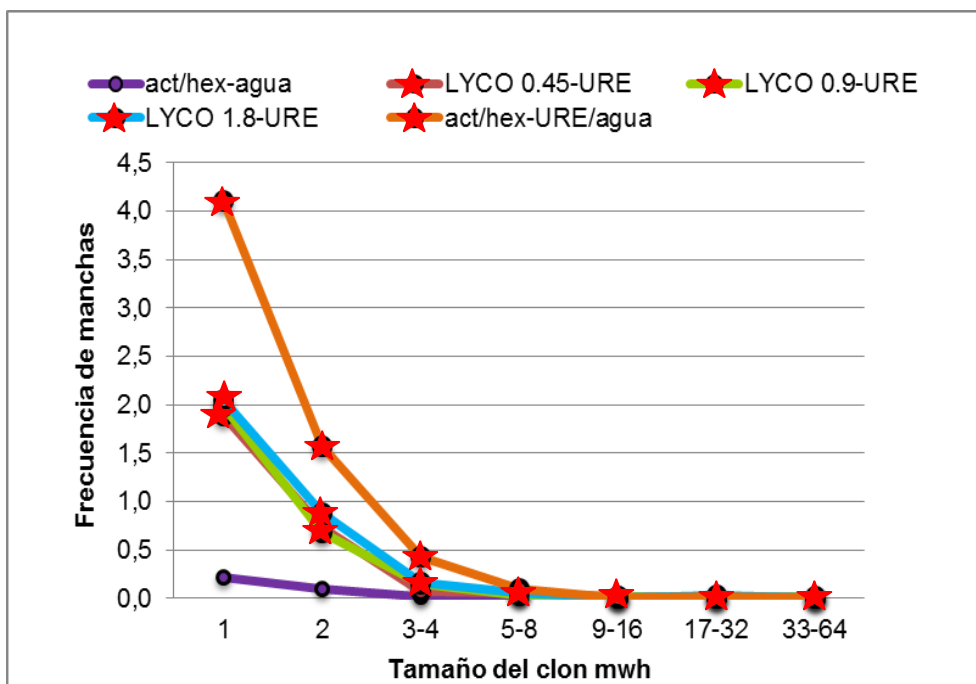


Fig. 11. Distribución del tamaño de clones *mwh* por individuo después del pre-tratamiento con acetona/hexano (act/hex), ó LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μ M), y el tratamiento con agua ó URE 20 mM.

Donde: ★ indica los tratamientos que tuvieron diferencias significativas con respecto al tratamiento act/hex-agua.

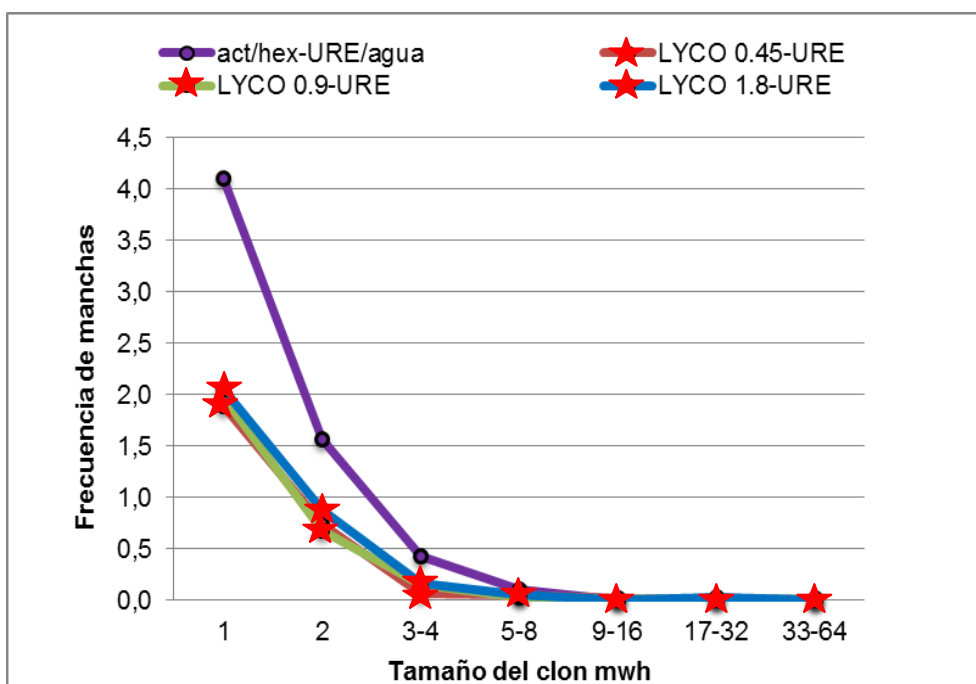


Fig. 12. Distribución del tamaño de clones *mwh* por individuo después del pre-tratamiento con acetona/hexano (act/hex), ó LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μ M), y el tratamiento con URE 20 mM. Donde: ★ indica los tratamientos que tuvieron diferencias significativas con respecto al testigo positivo.

Pre-tratamiento LYCO vs tratamiento H₂O₂.

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos para la progenie trans-heterocigota de la CBE, después de los pre-tratamientos: acetona/hexano (act/hex) ó LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 µM) y tratamientos: Agua ó H₂O₂ 20 mM.

Tabla 5. Frecuencia de manchas/individuo de los resultados SMART para la CBE y su diagnóstico estadístico*/**. A) Testigo acetona/hexano-agua vs H₂O₂ 20 mM ó LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 µM)-H₂O₂; y B) Testigo acetona/hexano-H₂O₂ 20 mM vs LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 µM)-H₂O₂ mM.

Manchas por individuo (número de manchas) diagnóstico estadístico*/**						
Pretratamiento-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 biactivación elevada (CBE)						
A)						
act/hex-agua	60	0.32 (019)	0.07 (004)	0.00 (00)	0.38 (023)	0.38 (023)
act/hex-H ₂ O ₂	60	0.22 (013) -	0.03 (002) -	0.00 (00) -	0.25 (015) -	0.25 (015)
LYCO 0.45-H ₂ O ₂	60	0.52 (032) i/s	0.10 (006) -	0.02 (01) -	0.63 (039) +	0.63 (0.39)
LYCO 0.9-H ₂ O ₂	60	0.40 (024) i/ns	0.07 (004) -	0.00 (00) -	0.47 (028) i/ns	0.47 (028)
LYCO 1.8-H ₂ O ₂	60	0.30 (018) -	0.12 (007) -	0.02 (01) -	0.43 (026) -	0.43 (026)
B)						
act/hex-H ₂ O ₂	60	0.22 (013)	0.03 (002)	0.00 (00)	0.25 (015)	0.25 (015)
LYCO 0.45-H ₂ O ₂	60	0.52 (032) +	0.10 (006) -	0.02 (01) -	0.63 (039) +	0.63 (0.39)
LYCO 0.9-H ₂ O ₂	60	0.40 (024) +	0.07 (004) -	0.00 (00) -	0.47 (028) +	0.47 (028)
LYCO 1.8-H ₂ O ₂	60	0.30 (018) i/ns	0.12 (007) -	0.02 (01) -	0.43 (026) i/ns	0.43 (026)

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

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

Al comparar el testigo acetona/hexano-agua con el tratamiento acetona/hexano-H₂O₂ y las diferentes concentraciones de LYCO-H₂O₂, se obtuvo un incremento significativo en la frecuencia de manchas pequeñas y totales con el tratamiento LYCO 0.45µM-H₂O₂ (Tabla 5 (A) y Figura 13).

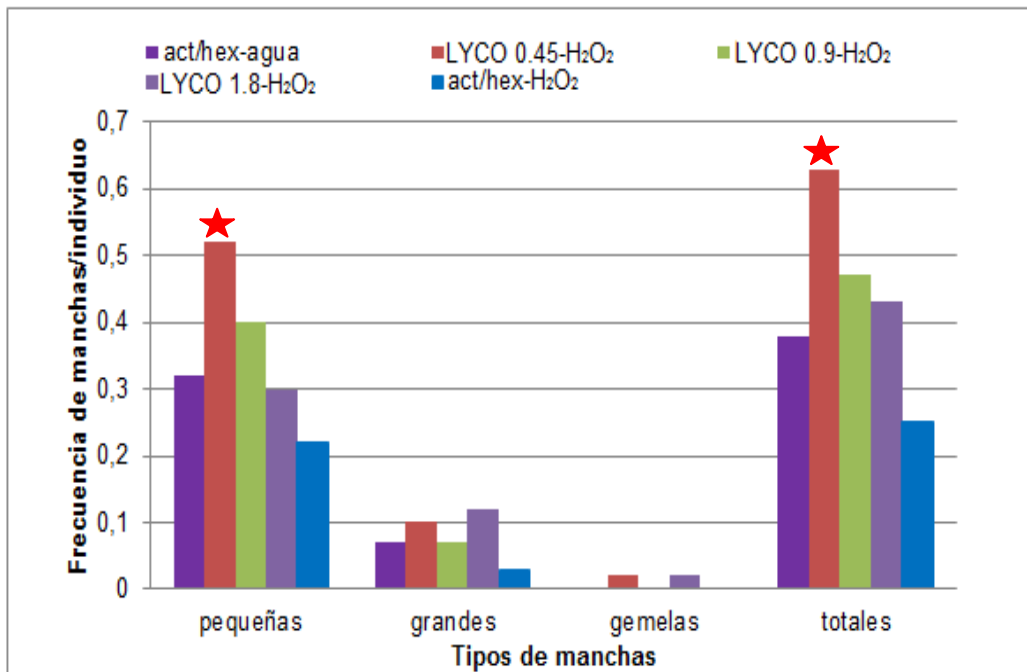


Fig. 13. Frecuencia/individuo de los diferentes tipos de mancha después del pre-tratamiento con acetona/hexano (act/hex) ó LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μ M), y el tratamiento con agua ó H₂O₂ 20 mM. Donde:★ indica un incremento estadísticamente significativo con una $p \leq 0.05$ con respecto al testigo act/hex-agua.

Al contrastar estadísticamente el testigo acetona/hexano-H₂O₂ con los diferentes tratamientos LYCO-H₂O₂, se obtuvo un incremento significativo en la frecuencia de manchas pequeñas y totales, en 0.45 y 0.9 μ M de LYCO-H₂O₂ (Tabla 5(B) y Figura 14).

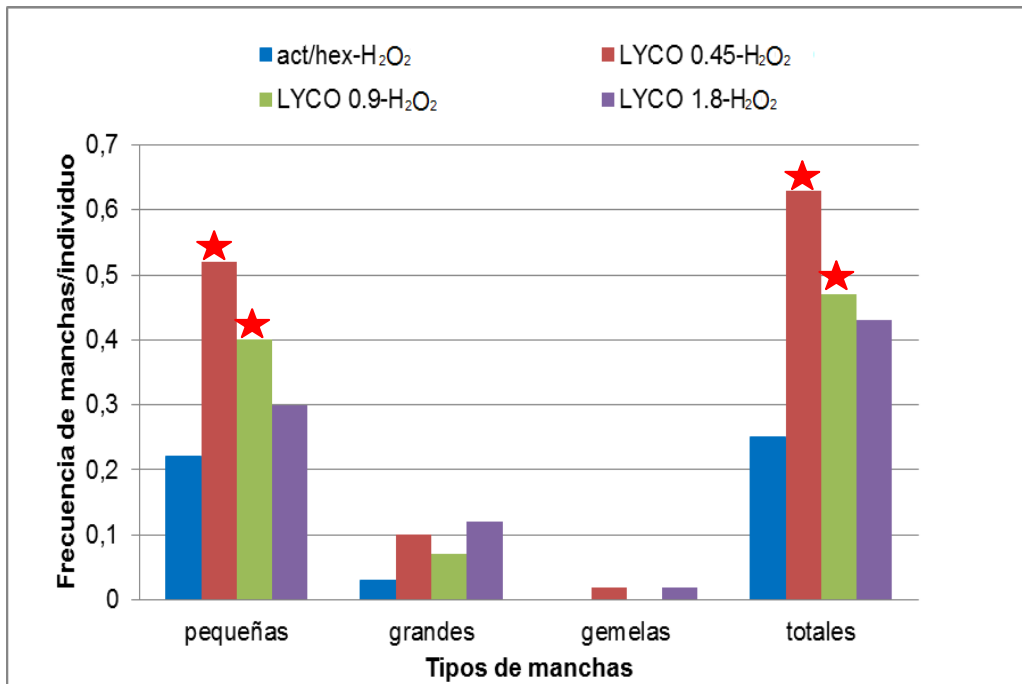


Fig. 14. Frecuencia/individuo de los diferentes tipos de mancha después del pre-tratamiento con acetona/hexano (act/hex) ó LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μ M), y el tratamiento con H₂O₂ 20 mM. Donde: ★ indica un incremento estadísticamente significativo con una $p \leq 0.05$ con respecto al tratamiento act/hex-H₂O₂.

La distribución del tamaño de clones *mwh* por individuo entre el testigo negativo acetona/hexano-agua con los tratamientos LYCO-H₂O₂ y acetona/hexano-H₂O₂, mostró diferencias estadísticamente significativas (Figura 15). También hubo diferencias entre los tratamientos LYCO-H₂O₂ y acetona/hexano-H₂O₂ de acuerdo con la prueba de K-S (Figura 16).

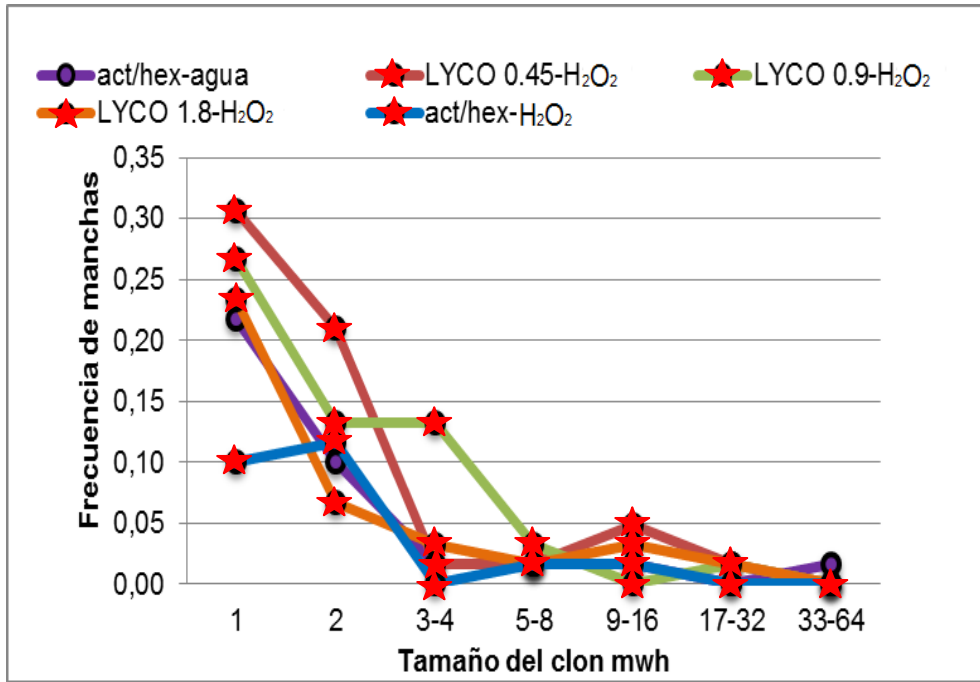


Fig. 15. Distribución del tamaño de clones *mwh* por individuo después del pre-tratamiento con acetona/hexano, ó LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μM), y el tratamiento con agua ó H_2O_2 20 mM. Donde: ★ indica los tratamientos que tuvieron diferencias significativas con respecto al testigo act/hex-agua.

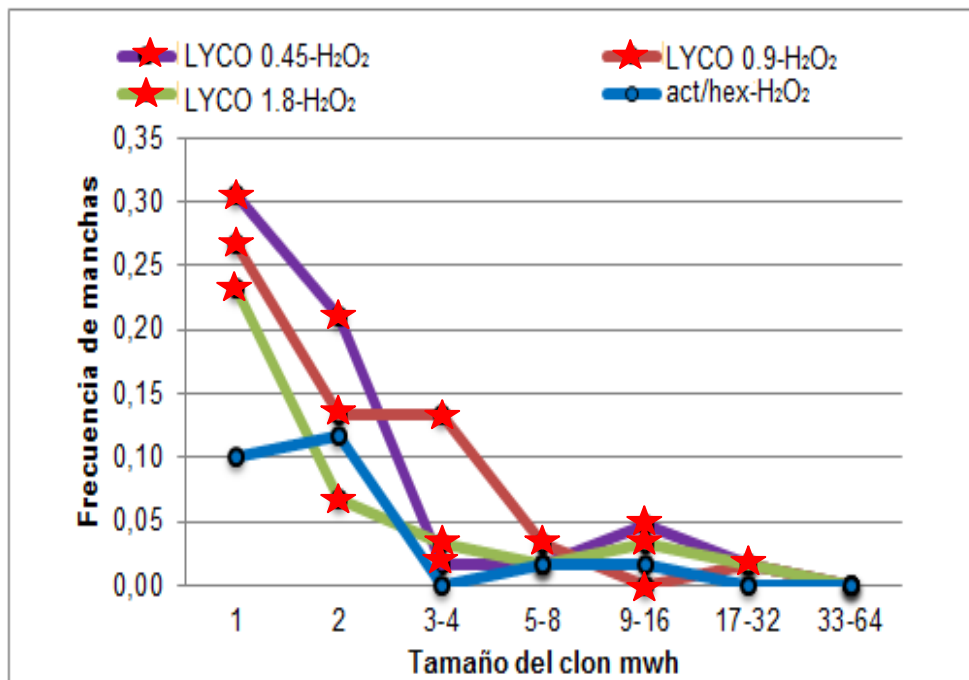


Fig. 16. Distribución del tamaño de clones *mwh* por individuo después del pre-tratamiento con acetona/hexano, ó LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μM), y el tratamiento con H_2O_2 20 mM. Donde: ★ indica los tratamientos que tuvieron diferencias significativas con respecto al testigo act/hex-H₂O₂.

DISCUSIÓN

Testigos agua y acetona.

Las frecuencias de manchas del testigo agua-agua concuerdan estadísticamente (datos no mostrados) con las frecuencias registradas para el testigo histórico agua obtenido en el Laboratorio de Genética Toxicológica (correspondiente a 34 experimentos independientes).

El tratamiento acetona/hexano-agua comparado con el testigo negativo agua-agua, no mostró diferencias significativas en las frecuencias de manchas, esto indica que la acetona/hexano en pre-tratamiento no tiene efecto genotóxico a las concentraciones manejadas, sin embargo causó diferencias significativas en la distribución del tamaño de clones *mwh* indicando que provocó alteración en la división celular que podría ser por algún efecto citotóxico, citostático o apoptótico.

Tratamientos con LYCO.

Ninguna de las concentraciones (0.45, 0.9 y 1.8 μM) de LYCO mostraron diferencias significativas en las frecuencias de manchas con respecto al testigo solvente acetona/hexano-agua, por lo tanto se asume que el LYCO no presenta efecto genotóxico. Estos resultados concuerdan con varios autores que han realizado diversas pruebas de genotoxicidad con el LYCO, resultando que este carotenoide no ocasiona daños al ADN, como: Aizawa en el 2000 y Gocke en 1996 (ambos citados en EFSA, 2008) con la prueba de Ames con y sin activación metabólica; Muster en 1996 (citado en EFSA 2008) con la prueba ML/TK (*Mouse Lymphoma/Thymidine Kinase Test*); Miller en 1996 (citado en EFSA 2008) y Rauscher et al. (1998), con la prueba de micronúcleos en medula de ratón; Pool-Zobel et al. (1997); Collins et al. (1998) y Riso et al. (1999) con el ensayo cometa en linfocitos humanos tratados con diferentes concentraciones y periodos de exposición de LYCO.

El análisis de distribución del tamaño de clones *mwh* indicó que sólo a la concentración de 0.9 μM hubo diferencias significativas, por lo tanto el LYCO

provocó alteración en la división celular que podría ser por efecto apoptótico ó inhibición del ciclo celular (Wertz *et al.*, 2004).

Testigo URE.

El URE es un compuesto promutágeno cancerígeno que al ser metabolizado genera epóxidos los cuales pueden ocasionar daño al material genético mediante aductos (Frölich y Würigler 1990; Miller y Miller, 1983).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, el URE produjo un incremento estadísticamente significativo en la frecuencia de manchas con respecto al testigo acetona/hexano-agua, lo que era de esperarse, ya que los trabajos de Graf *et al.* (1998) y Frölich y Würigler (1990) han demostrado el claro efecto genotóxico que tiene el URE sobre *D. melanogaster*.

El análisis de distribución del tamaño de clones *mwh* indicó que el URE altera la división celular, ya que puede incrementar (Hoffler *et al.*, 2005; Takahashi, 1954) o inhibir (Field y Lang, 1988) la actividad mitótica.

Tratamientos LYCO-URE.

Al comparar el testigo URE con los diferentes tratamientos LYCO-URE se encontró que las tres concentraciones de LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μM) redujeron significativamente la frecuencia de manchas presentada por el URE. Esto demuestra el posible efecto quimiopreventivo que posee el LYCO sobre el efecto genotóxico del URE. El daño producido por el URE radica en la formación de epóxidos que pueden generar aductos en el ADN, el efecto del LYCO puede ser porque modula el MX. De acuerdo con la literatura revisada los principales mecanismos son: 1) Inhibición del CYP450 que participa en la biotransformación del URE en *D. melanogaster*, ya que de acuerdo a Louisa *et al.* (2009) el LYCO inhibe el CYP2E1 que en mamíferos metaboliza al URE. Danielson *et al.*, (1997, 1998) han demostrado que hay familias de CYP450s en *D. melanogaster* que muestran fuertes homologías con las de los vertebrados; 2) Inducción de enzimas de la Fase II (Wang *et al.*, 2010), como la GST (Wertz *et al.*, 2004; Breinholt *et al.*,

2000), y de GSH, que en conjunto pudieron haber participado en la desintoxicación del URE (Kemper *et al.*, 1995).

El análisis de distribución del tamaño de clones *mwh* mostró diferencias significativas entre el testigo URE y los tratamientos LYCO-URE mostrando que ambos compuestos alteraron la división celular (Hoffler *et al.*, 2005; Wertz *et al.*, 2004; Field y Lang, 1988; Takahashi, 1954).

Testigo H₂O₂.

El H₂O₂ se ha utilizado en varios modelos para causar daño tanto *in vitro* (Barbouti *et al.*, 2002; Gardner *et al.*, 1997; Janero *et al.*, 1991), como *in vivo* (Furukawa *et al.*, 1993). Este compuesto tiene la capacidad de atravesar fácilmente las membranas celulares y formar radicales libres, por lo que llega a provocar lipoperoxidación y daño al ADN, éste puede ser por la modificación de bases, rompimientos de cadena dobles y simples (Meneghini, 1997; Halliwell and Aruoma, 1991).

En el presente trabajo los resultados demostraron que el H₂O₂ no mostró efecto genotóxico lo que concuerda con Furukawa *et al.* (1993) y Kawai *et al.* (1995) que realizaron la prueba SMART en ala de *D. melanogaster* y tampoco observaron actividad genotóxica por parte del H₂O₂, estos autores también midieron la actividad de catalasa y observaron que los tratamientos con H₂O₂ tenían mayor actividad de dicha enzima; por lo tanto es posible que se evite o se repare el daño genotóxico que el H₂O₂ llegue a ocasionar. Pese a esto el análisis de distribución del tamaño de clones *mwh* indicó que el H₂O₂ altera la división celular debido a que puede tener efectos citotóxicos o apoptóticos (Barbouti *et al.*, 2002; Gardner *et al.*, 1997).

Tratamientos LYCO-H₂O₂.

Debido a que se ha reportado que la propiedad quimiopreventiva del LYCO está relacionada con su poder antioxidante (Riso, 2004; Porrini y Riso, 2000; Di Mascio *et al.*, 1989), en este trabajo se le retó con el H₂O₂, debido a los posibles daños que provoca este último.

Al comparar el tratamiento H₂O₂ con los tratamientos LYCO-H₂O₂ se observó un incremento en la frecuencia de manchas a la concentración de 0.45 μM y 0.9 μM de LYCO. Debido a que ninguno mostró genotoxicidad por sí mismo (LYCO y H₂O₂), los resultados podrían indicar algún tipo de interacción dentro de la célula entre ambos compuestos. De acuerdo con Young y Lowe (2001), el LYCO puede unirse a proteínas o lipoproteínas en la membrana celular, y es aquí donde puede actuar como primer sistema de defensa ante las EROs. Sin embargo, puede ser tanto antioxidante como pro-oxidante dependiendo de la concentración a la que se encuentre o del compuesto que lo oxide (Yeh y Hu, 2000). En este caso el daño observado en los tratamientos LYCO-H₂O₂ pudo haber sido por: 1) un posible efecto pro-oxidante del LYCO, causando lipoperoxidación y viéndose reflejado en daño genotóxico; 2) la formación de metabolitos epóxidos (Ben-Aziz *et al.*, 1973) que dañan al ADN como lo reporta Gocke en 1996 (citado en EFSA 2008) y Yeh y Hu en el 2001. Se ha demostrado que la oxidación del LYCO con H₂O₂ puede formar epóxidos (Dos Anjos *et al.*, 2004) tales como licopeno-1,2-epóxido y licopeno-5,6-epóxido (Kim 2001). Aunque se requieren de más estudios para demostrar que productos de la oxidación del LYCO son los responsables del aumento observado.

En el análisis de distribución del tamaño de clones *mwh* hubo diferencias significativas entre el tratamiento act/hex-H₂O₂ y los tratamientos LYCO-H₂O₂ indicando que hubo alteración en la división celular probablemente por los efectos citotóxicos o apoptóticos de ambos compuestos (Wertz *et al.*, 2004; Barbouti *et al.*, 2002; Gardner *et al.*, 1997).

CONCLUSIONES

El LYCO:

- ★ *Per se* no causó daño genotóxico a ninguna de las concentraciones utilizadas.
- ★ Disminuyó el efecto genotóxico causado por el URE.
- ★ Con el tratamiento H₂O₂ tiene efecto genotóxico.

RECOMENDACIONES

- ★ Identificar los metabolitos resultantes de la oxidación del LYCO por el H₂O₂ en *D. melanogaster* y determinar si estos presentan un efecto genotóxico.
- ★ Cuantificar los niveles tanto de GSH como de GST en larvas de *D. melanogaster* tratadas con y sin LYCO.
- ★ Cuantificar la actividad de catalasa en larvas de *D. melanogaster* tratadas con y sin H₂O₂.
- ★ Determinar el nivel de lipoperoxidación mediante la cuantificación de malonaldehído.
- ★ Cuantificar la actividad de CYP450s de tratamientos con y sin LYCO.

REFERENCIAS

- Aust O.**, Ale-Agha N., Zhang L., Wollersen H., Sies H., and Stahl. W. (2003). Lycopene oxidation product enhances gap junctional communication. *Food and Chemical Toxicology*. **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 Radical Biology & Medicine*. **33** (5): 691–702.
- Ben-Aziz A.**, Britton G., and Goodwin T.W. (1973). Carotene epoxides of *Lycopersicon esculentum*. *Phytochemistry*. **12**: 2759–2764.
- Bhuvanewari V.** and Nagini, S., (2005). Lycopene: a review of its potential as an anticancer agent. *Current Medicine Chemical Anticancer Agents*. **5**: 627–635.
- Bordons A.**, Gil J., Araque I., Carreté R., y Reguant C. (2004). Estudios para minimizar la producción de aminas biógenas y de carbamato de etilo por parte de las bacterias lácticas. (En línea) fecha de acceso 15 de noviembre del 2011, disponible en http://www.haro.org/pdf/resumen_bordons_haro2004.pdf.
- 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 Letters*. **154**: 201-210.
- Burdon R.** (1995). Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radical Biology & Medicine*. **18**: 775–794.
- Castell J. V.** (2005). Metabolismo de fármacos y hepatotoxicidad. Jornada de Toxicología *Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular SEQC*. Madrid.
- Castañeda-Partida L.**, Heres P. M. E. y Dueñas G. I. E. (2008). *Drosophila melanogaster* un modelo experimental. FES Iztacala, UNAM. 86 pp.
- Clinton, S. K.** (1998). Lycopene: Chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutrition Reviews*. **56**: 35–51.
- 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.

- Danielson P. B.**, MacIntyre R. J., and Fogleman J. C. (1997). Molecular cloning of a family of xenobiotic-inducible drosophilid cytochrome p450s: evidence for involvement in host-plant allelochemical resistance. *PNAS*. **94**: 10797-10802.
- Danielson P. B.**, Fister J. L., McMahon M. M., Smith M. K., and Fogleman J. C. (1998). Induction by alkaloids and phenobarbital of family 4 cytochrome P450s in *Drosophila*: evidence for involvement in host plant utilization. *Molecular & General Genetics*. **259**: 54-59.
- Del Valle C.F.R.** (2003). Carcinógenos y Anticarcinógenos en los alimentos. *Expresiones Médicas*. **2** (6): 30-37.
- Di Mascio P.**, Kaiser S. and Sies H. (1989). Lycopene as the Most Efficient Biological Carotenoid Singlet Oxygen Quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **274** (2): 532-538.
- Dos Anjos F. A. L.**, Yeum K. J., Russell R. M., Krinsky N. I., and Tang G. (2004). Enzymatic and oxidative metabolites of lycopene. *Journal of Nutritional Biochemistry*. **15**: 493–502.
- Dueñas G. I. E.**, Heres P. M. E., Castañeda L. and U. Graf. (2001). Easy raising of *Drosophila melanogaster* on a medium consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. *Drosophila Information Service*. **84**: 166.
- European Food Safety Authority.** (2008). Use of lycopene as a food colour. *The EFSA Journal*. **674**: 1-66.
- Field K. J.** and Lang C. M. (1988). Hazards of urethane (ethyl carbamate): a review of the literature. *Laboratory Animals*. **22**: 255-262.
- Fossa A. A.**, Baird W. M. and Carlson G. P. (1985). Distribution of urethane and its binding to DNA, RNA, and protein in SENCAR and BALB/c mice following oral and dermal administration. *Journal of toxicology and environmental health*. **15** (5): 635-54.
- Frei H.** and Würgler F. E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research*. **203**: 297-308.
- 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*. *Mutation Research*. **334**: 247-258.

- Frölich** A. and Würgler F. E. (1990). Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing spot test: dependence on genotype-controlled metabolic capacity. *Mutation Research*. **244**: 201-208.
- Furukawa** H., Kawai K., and Miyazawa T. (1993). Low-level chemiluminescence from *Drosophila melanogaster* fed with hydrogen peroxide. *Mutation Research*. **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 Radical Biology & Medicine*. **22**: 73–83.
- Giovannucci** E. (1999). Tomatoes, Tomato-Based Products, Lycopene, and Cancer: Review of the Epidemiologic Literature. *Journal of the National Cancer Institute*. **91** (4): 317-331.
- 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*. *Environmental Mutagenesis*. **6**: 153-188.
- Graf** U., Frei H., Kägi A., Katz A. J. and Würgler F. E. (1989). Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research*. **222**: 359-373.
- Graf**, U. and Van Schaik N. (1992). Improved high bioactivation cross for the wing Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. **8**: 15-27.
- Graf**, U., Spanó M. A., Guzmán Rincón J., Abraham S. K. and Andrade H. H. (1996). The wing Somatic Mutation And Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: an efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. *The African Newsletter on Occupational Health and Safety*. **6**: 9-13.
- Graf** U., Abraham S. K., Judith Guzmán R. J. and Würgler F. E. (1998). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*. **402**: 203-209.
- Guzmán**, R. J. and Graf U. (1995). *Drosophila melanogaster* Somatic Mutation and Recombination Test as a biomonitor. In: Biomonitors and biomarkers as indicators of environmental change. *Environmental Science Research*. **50**: 169-181.

Halliwell B. and Aruoma O. I. (1991). DNA damage by oxygen-derived species its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letter*. **281**: 9-19.

Heres P. M. E., Dueñas G. I. E., Castañeda P. L., Santos C. L. F., Vega C. V., Rebollar V. R., Gómez L. J. C. and Durán D. A. (2010). Genotoxicity studies of organically grown broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and its interactions with urethane, methyl methanesulfonate and 4-nitroquinoline-1-oxide genotoxicity in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology*. **48** (1): 120-128.

Hoffler U., Dixon D., Peddada S. and Ghanayema B. I. (2005). Inhibition of urethane-induced genotoxicity and cell proliferation in CYP2E1-null mice. *Mutation Research*. **572**: 58–72.

International Agency for Research on Cancer. (1987). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs Volumes 1 a 42. Lyons, Francia.

Janero R. D., Hreniuk D. and Sharif H. M. (1991). Hydrogen peroxide-induced oxidative stress to the mammalian heart-muscle cell (cardiomyocyte): lethal peroxidative membrane injury. *Journal of Cellular Physiology*. **149**: 347-364.

Kawai K. and Furukawa H. (1995). Oxidative damage of *Drosophila melanogaster* fed with hydrogen peroxide. *Mutation Research*. **334** (3): 385-427.

Kemper, R. A., Myers S. R. and Hurst H. E. (1995). Detoxification of vinyl carbamate epoxide by glutathione: evidence for participation of glutathione S-transferases in metabolism of ethyl carbamate. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **135**: 110-118.

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. *Analytical Chemistry*. **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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **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.**, Masayo Kushiro M., Zhang H., Sugawara T., Miyashita K. and Nagao A. (2001). Carotenoids Affect Proliferation of Human Prostate Cancer Cells. *Journal of Nutrition*. **131**: 3303-3306.
- La Vecchia C.** (1998). Mediterranean epidemiological evidence on tomatoes and the prevention of digestive-tract cancers. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. **218** (2): 125-8.
- Lee M.T.** and Chen B. H. (2002). Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. *Food Chemistry*. **78**: 425–432.
- 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. *Nutrition and Cancer*. **24** (3): 257-66.
- 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. *Medical Journal of Indonesia*. **18** (4): 233-238.
- Meneghini R.** (1997). Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radical Biology & Medicine*. **23** (5): 783–792.
- Miller J. A.** and Miller E. C. (1983). The metabolic activation and nucleic acid adducts of naturally-occurring carcinogens: Recent results with ethyl carbamate and the spice flavors safrole and estragole. *British Journal of Cancer*. **48**: 1-15.
- Murray R. K.**, Granner D. K., Mayes P. A. and Rodwell V. W. (1992). Bioquímica de Harper. 12^a Editorial Manual Moderno México, pp. 656-660.
- Nelson D.** and Cox M. (2001). Lenhinger principios de bioquímica. 3^a Edición. Omega Barcelona, España. p 1152.
- Ortiz de Montellano D.** (1995). Cytochrome P450: Structure, mechanism and biochemistry. 2^{da} Editorial Plenum Press, New York. p 700.
- 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.

- Porrini M.** and Riso P. (2000). Lymphocyte lycopene concentration and DNA protection from oxidative damage is increased in women after a short period of tomato consumption. *Journal of Nutrition*. **130**: 189–192.
- 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. *Nutrition and 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. *Nutrition Research*. **19** (2): 305-323.
- Rao G. L.,** Guns E. and Rao V. A. (2003). Lycopene: Its role in human health and disease. *Agro food industry 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. *Mutation Research*. **413** (2): 129-142.
- Riso P.,** Pinder A., Santangelo A. and Porrini M., (1999). Does tomato consumption effectively increase the resistance of lymphocyte DNA to oxidative damage?. *American Journal of Clinical Nutrition* **69**: 712-718.
- Riso P.,** Visioli F., Testolin G. and Porrini M. (2004). Lycopene and vitamin C concentrations increase in plasma and lymphocytes after tomato intake. Effects on cellular antioxidant protection. *European Journal of Clinical Nutrition*. **58**: 1350–1358.
- Sakano K.,** Oikawa S., Hiraku Y. and Kawanishi S. (2002). Metabolism of carcinogenic urethane to nitric oxide is involved in oxidative DNA damage. *Free Radical Biology & Medicine*. **33**: 703-714.
- Sánchez L. A.,** Fonseca L. G., Trujillo C. N. y Fernández F. D. (2000). Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba. *Revista Cubana de Farmacia*. **34**: 34-43.
- Schmeltz I.,** Chiong K. G. and Hoffmann D. J. (1978). Formation and determination of ethyl carbamate in tobacco and tobacco smoke. *Analytical Toxicology*. **2**: 265–268.
- Scolastici C.,** Alves de Lima R. O., Barbisan L. F., Ferreira A. L. A., Ribeiro D. A. and Salvadori D.M.F. (2008). Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test. *Toxicology in Vitro*. **22**: 510–514.

- Spanò M. A.**, y Graf U. (1998). Segundo taller sobre SMART: Un método para detectar las actividades mutagénicas y recombinogénicas en células somáticas de *Drosophila* en la Universidad Federal de Uberlandia (MG) Brasil. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. **14** (12): 111-114.
- Stahl W.** and Sies H. (1996). Perspectives in biochemistry and biophysics Lycopene: A Biologically Important Carotenoid for Humans?. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **336** (1): 1–9.
- Takahashi M.** (1954). A study on the mitotic activity in the bone marrow of normal mice following treatment with urethane. *Journal of the Faculty of Science Hokkaido University*. **12** (1-2): 169-174.
- 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. *Journal of Nutrition*. **135** (2): 287-90.
- 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 Scientific Publications*. **146**: 427–470.
- 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.
- Wertz K.**, Siler U. and Goralczyk R. (2004). Lycopene: modes of action to promote prostate health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **430**: 127–134.
- Woo Cha S.**, Gu H. K., Lee K. P., Lee M. H., Han S. S. and Jeong T. C. (2000). Immunotoxicity of ethyl carbamate in female BALB/c mice: role of esterase and cytochrome P450. *Toxicology Letters*. **115**: 173-181.
- Xu C.**, Yong-TaoLi C. and Tony Kong A. (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of Pharmacal Research*. **28**: 249-268.
- Yeh S. L.** and Hu M. L. (2000). Antioxidant and pro-oxidant effects of lycopene in comparison with b-carotene on oxidant-induced damage in Hs68 cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. **11**: 548-554.
- Yeh S. L.** and HU M. L. (2001). Induction of Oxidative DNA Damage in Human Foreskin Fibroblast Hs68 Cells by Oxidized fl-Carotene and Lycopene. *Free Radical Research*. **35**: 203-213.

Young A. J. and Lowe G. M. (2001). Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **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): 2109-14.

Zhang H., Kotake-Nara E., Ono H. and Nagao A. (2003). A novel cleavage product formed by autoxidation of lycopene induces apoptosis in HL-60 cells. *Free Radical Biology & Medicine*. **35** (12): 1653-63.

ANEXO 1

Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART)

SMART se basa en el hecho de que durante el desarrollo embrionario temprano de *D. melanogaster* un grupo de células (discos imagales) proliferan mitóticamente hasta diferenciarse, durante la metamorfosis, en estructuras (ojos, alas, patas, etc.) de la mosca adulta. Por lo tanto esta prueba tiene la posibilidad de exponer grandes poblaciones de células, en constante división, a compuestos con efecto genotóxico o antigenotóxico. Si ocurre una alteración genética en una de estas células de los discos imagales, esta alteración estará presente en todas las células descendientes y formarán un clon de células mutantes, si la alteración causa un daño visible en el fenotipo, este clon puede ser detectado como una mancha de células mutantes en la superficie del cuerpo de las moscas adultas.

Anexo 1.1

Eventos genéticos que pueden ser reconocidos en SMART en ala. Se ejemplifica con el marcador *mwh*, sin embargo los clones también pueden resultar con el marcador *flr³*.

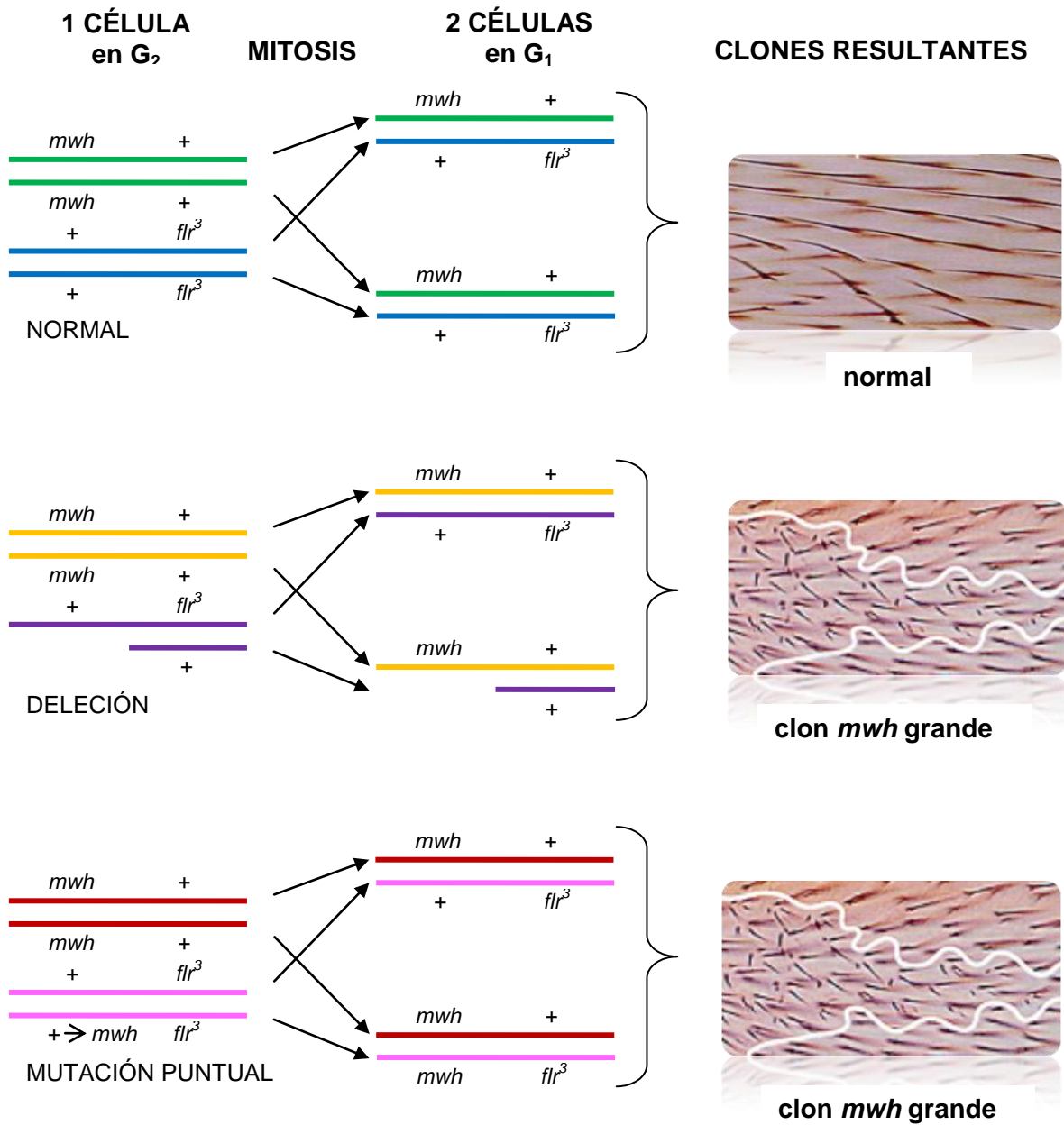


Fig. 17a. Eventos genéticos que ocasionan la pérdida de heterocigosis, para los marcadores *flr³* y *mwh*, y la formación de manchas en SMART en ala.

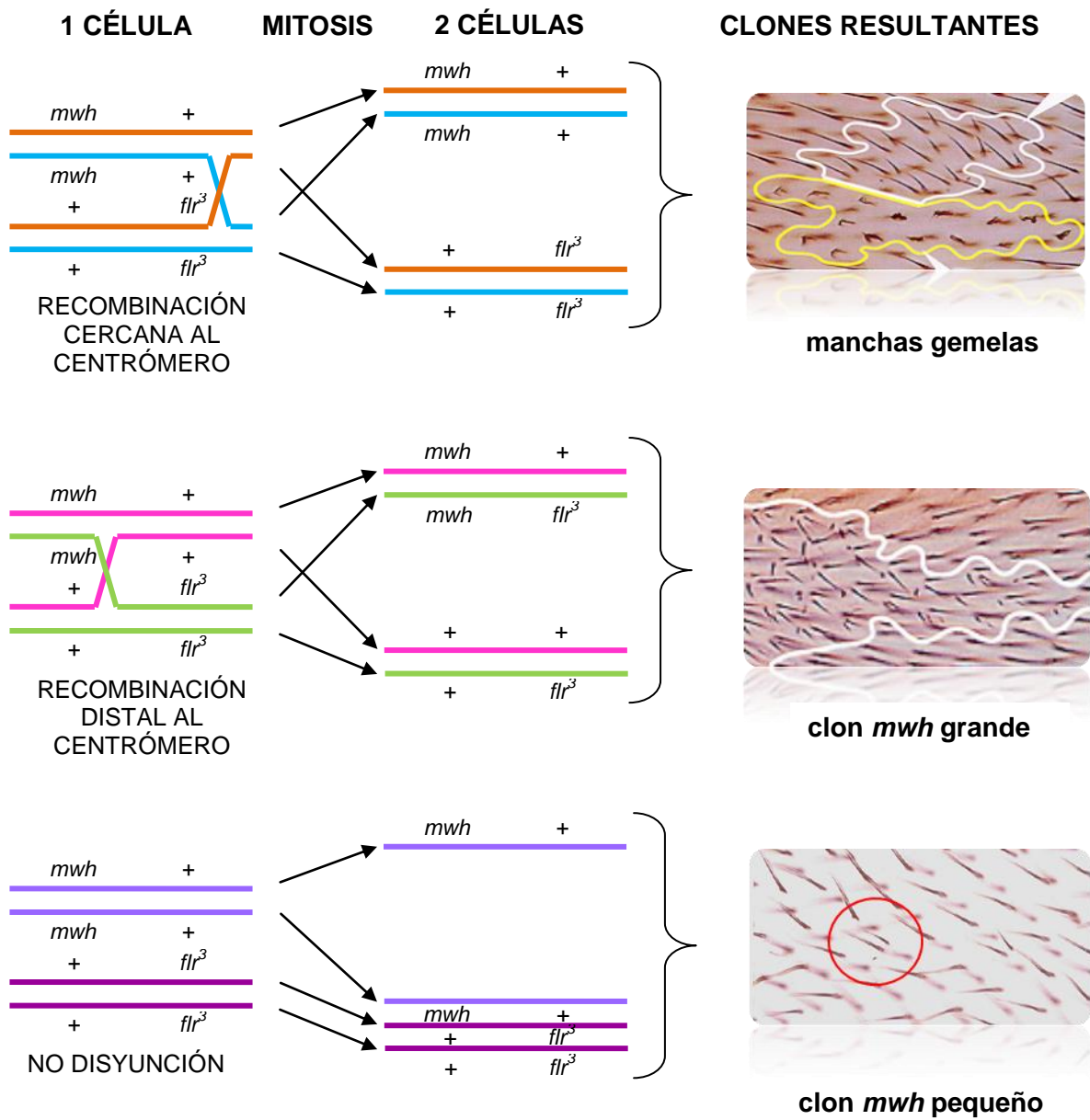


Fig. 17b. Eventos genéticos que ocasionan la pérdida de heterocigosis, para los marcadores *flr³* y *mwh*, y la formación de manchas en SMART en ala.

Anexo 1.2

Cepas mutantes de *D. melanogaster*

multiple wing hairs (mwh/mwh): Presenta una mutación recesiva homocigótica localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-0.3) y su expresión fenotípica se observa como un cambio en el número de tricomas por célula (3-5), comparado con el fenotipo silvestre que sólo presenta un tricoma por célula (Graf *et al.*, 1996; 1984).

flr³ / TM3, Bd^s (flare³): Tiene una mutación recesiva localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-38.8) que se expresa como tricomas mal formados y cortos con apariencia de flama o roseta de maíz. En homocigosis es letal por lo que la línea posee el cromosoma balanceador TM3 (*In(3LR)TM3* (Inversion (3 Left, Right) Third Multiple 3) que porta tres inversiones, lo que reduce la probabilidad de obtener recombinación entre los cromosomas del par tres durante la meiosis, manteniendo así intacto al gen mutante de interés, ya que se impide la formación de nuevos arreglos cromosómicos originados por recombinación. Se puede reconocer fenotípicamente a la línea *flare³* por la presencia del gen dominante *Bd^s (Beaded-Serratia)* que se manifiesta como muescas en el borde de las alas, localizado en el cromosoma 3 (3-92.5), el cual también es letal en homocigosis (Graf *et al.*, 1996; 1984).

ORR(1); ORR(2); flr³ / TM3, Bd^s (Oregon-flare³): Presenta los cromosomas 1 y 2 de la cepa Oregon R (R) resistente al DDT. El cromosoma 2 (2-65) acarrea una mutación dominante *Rst (2) DDT* que provoca la alta expresión de los CYP450s, haciéndola una cepa muy sensible para identificar un gran número de promutágenos y/o procancerígenos (Graf *et al.*, 1998; Graf y Van Schaik, 1992; Graf y Singer, 1992).

ANEXO 2

Sexado de D. melanogaster

- 1) Seleccionar frascos con pupas a punto de emerger, retirarles las moscas adultas y meterlos a incubar a 25° C por un periodo de 4 h, posteriormente revisar los frascos, trasvasar las moscas que emergieron a un frasco vacío y dormir las con CO₂.
- 2) Separar las hembras con ayuda de un microscopio estereoscópico, distinguiéndolas de tres maneras: i) el tamaño (la hembra es más grande que el macho), ii) los machos tienen fusionados y melanizados los últimos tres segmentos abdominales; iii) los machos en el primer par de patas tienen un peine sexual (grupo de 10 cerdas). Para confirmar que las moscas son vírgenes hay que colocarlas en tubos de ensayo con 0.5g de puré de papa y 2mL de solución conservadora durante un periodo de 72 h (si en este lapso de tiempo no hay larvas se procede a realizar la cruce).

ANEXO 3

Preparación de medio de levadura activada

- 1) Desmoronar la levadura, agregar una pizca de azúcar y agua para activarla.
- 2) Poner la mezcla a baño maría a 38-40° C por 5 min., posteriormente retirarla y seguir mezclando a temperatura ambiente por otros 5 min. Repetir este proceso tres veces. La levadura se vacía a los frascos estériles y éstos se cubren con una gasa para facilitar el secado del medio.