



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“EVALUACION DEL DAÑO PRODUCIDO POR
EL METILMETANOSULFONATO, EN LARVAS DE *Drosophila melanogaster*
(CRUZA E) PRETRATADAS CON LICOPENO,
MEDIANTE SMART EN ALA.”

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:

Martín Hernández Carmen Elena

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



Los Reyes Iztacala, Edo. México, 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.

Dedicatoria:

*....siempre nos reprochamos cuando perdemos
a aquellos que amamos, pero si meditamos podemos
ver como ellos pueden inspirar nuestras vidas.....*

Siempre estarás conmigo.....

Carlos V. González Villamar

Agradecimientos

A TÍ por estar conmigo siempre, por escucharme y ayudarme a culminar uno de mis objetivos en la vida.

A mi padre Eduardo Martín-Álvarez, por darme las herramientas necesarias para lograr todo lo que me propongo....A mi madre Teresa Hernández-Espinosa por estar conmigo siempre, apoyarme, escucharme y ser esa vocecita en mi interior.... A los dos gracias por toda una vida de esfuerzo compartido... todos tenemos a alguien que encarna un desafío, que nos obliga a apuntar más allá de lo alcanzable... gracias por ser esa persona para mí.

A mis hermanas Ana y Mónica Martín- Hernández, gracias por recordarme que nada es sencillo, por hacerme fuerte, “cuidarme” y por tratar de entenderme.....aunque no lo crean las quiero B. V.!!!!

A toda mi familia, tíos, primos y a mi Abuelita Ma. Luisa Álvarez, que fueron espectadores en mi camino, por brindarme su mano y ayudarme cuando lo necesité.....Familias: González-Villamar, Vázquez-Villamar, Álvarez-González, Lucero-Álvarez, Guerrero-Rodríguez, Rodríguez-Espinosa.

A mis muy mejores amigos... Miriam Pérez, Roberto Landeros, Cristina Morales, Pablo Flores, porque aunque no cursaron conmigo esta hermosa carrera estuvieron en cada momento junto a mí, a ustedes les adeudo la ternura, las palabras de aliento y el abrazo, por compartir conmigo la factura que nos presenta la vida paso a paso.....son los mejores.

A mis amigos de la FES (grupo 06-04) Williams Chávez, Adrián Navarro, José María Torres, Felipe Martínez., Ángela Sánchez, Mario Velasco, Edgar Mancilla, Víctor Becerra, Selma Medina, Saida Zúñiga, Viridiana Rojas, Marlene Gutiérrez, Perla Silva.... Por compartir conmigo innumerables momentos (clases, prácticas de campo, quemas de bata, cumpleaños etc.), a ustedes les adeudo la

paciencia de tolerarme las espinas más agudas, los arrebatos del humor, la negligencia, las vanidades, los temores y las dudas....gracias por hacer que mi estancia en la FES fuera increíble y estos cinco años los mejores.... Los quiero.

A Jessica Regalado, Adriana Mendoza, José Luis Rivera y Alberto Trejo.... Por brindarme su amistad incondicional y por enseñarme que la distancia no es un impedimento para enriquecerla.

A mis amigas de laboratorio: Andrea Hernández., Joselin de la Cruz, Viridiana Cisneros (the fly group) por compartir conmigo estos años de trabajo y esfuerzo (vienen a mi mente los “pastos” de la FES), por enseñarme que las mejores amistades se encuentra donde menos lo esperas, las quiero mucho niñas!!!...Gracias!!!.

A mis profesores del Laboratorio de Genética Toxicológica: M. en C. Irma E. Dueñas, M. en C. Laura Castañeda y Biól. Luis Santos.... por transmitirme su conocimiento, brindarme su confianza y ayudarme a mejorar cada día.... Gracias por dejarme ser parte de su “familia”.

A mi asesora y directora de tesis, M. en C. María Eugenia Heres (Mamá Maru), gracias por acogerme y darme su confianza, por todos sus consejos y observaciones hacia mí y hacia este trabajo, por ayudarme ser una mejor persona (profesional y personalmente), por su honestidad y por preocuparse por mí.

A mis sinodales M. en C. Víctor R. Moreno, Dr. Guillermo Ávila, M. en C. Ángel Durán, por su tiempo, consejos y comentarios para enriquecer este trabajo.

A la UNAM, por toda mi preparación académica y por darme la oportunidad de lograr mi meta.

ÍNDICE

RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
<i>Lycopeno (LYCO)</i>	9
<i>Peróxido de Hidrógeno y Especies Reactivas</i> <i>de Oxígeno (ROS)</i>	13
<i>Metilmetanosulfonato (MMS)</i>	15
<i>Drosophila melanogaster</i>	17
<i>Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en ala</i>	18
ANTECEDENTES.....	19
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
RESULTADOS.....	26
<i>SMART en ala</i>	26
<i>Distribución de Clones mwh</i>	30
DISCUSIÓN.....	34
CONCLUSIONES.....	41
RECOMENDACIONES.....	42
BIBLIOGRAFÍA.....	43
ANEXO 1.....	50
ANEXO 2.....	51

RESUMEN

El licopeno (LYCO) es un caroteno acíclico con actividad antioxidante o pro-oxidante, modulada por su concentración, e inductor de apoptosis. Para evaluar si el LYCO protege o no del daño inducido por el metil metanosulfonato (MMS) se usó la prueba SMART en ala de *D. melanogaster*, craza estándar (CE). A larvas de 72 ± 4 h, se les aplicaron los pre-tratamientos de 6 h con LYCO (0.45, 0.90, $1.8\mu\text{M}$), agua miliQ o acetona(2% v/v)/hexano($0.17\mu\text{L/mL}$) (Act-Hex) en oscuridad y 25°C . Las larvas pre-tratadas se trasladaron a tubos con MMS (0.5mM) o agua miliQ. Se fijaron en alcohol 70% ~55 imagos/tratamiento. Con las alas silvestres se hicieron preparaciones permanentes 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. Las distribuciones del tamaño de los clones *mwh* se analizaron con la prueba de Kolmogorov. Con LYCO $1.8\mu\text{M}$ /agua y LYCO $1.8\mu\text{M}$ /MMS, se obtuvo disminución significativa en la frecuencia de manchas y modificación de la división celular lo cual puede indicar dos posibles efectos: (i) pro-oxidante a concentraciones altas; (ii) inducción de apoptosis. Se obtuvo mayor daño con Act-Hex/MMS que con agua/MMS. Se propone que este aumento se deba a la menor polaridad de la mezcla Act-Hex, y un efecto acarreador del disolvente aumentando el ingreso del MMS a la célula. Se concluye que el LYCO modificó la frecuencia de manchas y alteró la división celular

INTRODUCCIÓN

Junto con los factores genéticos y la edad, el estilo de vida y la dieta son considerados factores de riesgo importantes en el padecimiento de enfermedades crónicas (Agarwal y Rao, 2000). Es por eso que la dieta de quimioprevención ha emergido como una estrategia para controlar las enfermedades crónicas más prevalentes, incluido el cáncer (Scolastici *et al.*, 2007). Estas enfermedades son la mayor causa de muerte en el mundo occidental (Agarwal y Rao, 2000). Un planteamiento nutricional para la prevención del cáncer incluye la valoración y evaluación de los efectos contra el mismo de frutas y verduras que contienen micronutrientes reconocidos, tales como los carotenos, flavonoides y otros compuestos (Bhuvaneswari y Nagini, 2005).

Los carotenos son pigmentos naturales responsables de la coloración de diversas frutas y verduras y sus actividades como colorantes y antioxidantes son consecuencia de sus estructuras únicas y un amplio sistema de dobles enlaces conjugados (Stahl y Sies, 1996).

Licopeno (LYCO)

Debido a sus propiedades antioxidantes, el licopeno (LYCO) ha llamado la atención y se ha convertido en uno de los agentes quimiopreventivos más estudiados (Stahl y Sies, 1996). Es un carotenoide acíclico (Figura 1) compuesto de 40 átomos de carbono, que contiene 11 dobles enlaces conjugados y 2 no-conjugados, dispuestos en una matriz lineal. Su fórmula molecular es $C_{40}H_{56}$ y su peso molecular es de 536.85 daltons, es un compuesto lipofílico insoluble en agua (Rao y Agarwal, 1999). Se encuentra presente en los frutos rojos, en el jitomate y en los productos derivados de él (Tang *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009). Kris-Etherton *et al.* (2002) mencionan que es uno de los compuestos más bioactivos que se encuentra en los alimentos y que ayuda en la prevención de ciertos padecimientos. En el plasma humano las concentraciones de LYCO van desde 0.22 a 1.06 nmol/mL (0.5 mg/mL o 0.9 μ M) (Stahl y Sies, 1996).

Estudios epidemiológicos han dado evidencia de que un alto consumo de LYCO disminuye el riesgo de enfermedades cardiovasculares y del cáncer, por su capacidad antioxidante (Scolastici *et al.*, 2007). Agarwal y Rao en el 2000 mencionan que una dieta con este carotenoide puede mejorar el estatus del mismo en el cuerpo y, actuando como antioxidante, puede atrapar especies reactivas de oxígeno (ROS), aumentar el potencial antioxidante total o reducir el daño oxidativo a los lípidos (lipoproteínas y lípidos de membrana), a las proteínas (enzimas im-

portantes) y al DNA, lo que reduce el estrés oxidativo y esto a su vez disminuya el riesgo de cáncer y/o enfermedades cardiovasculares.

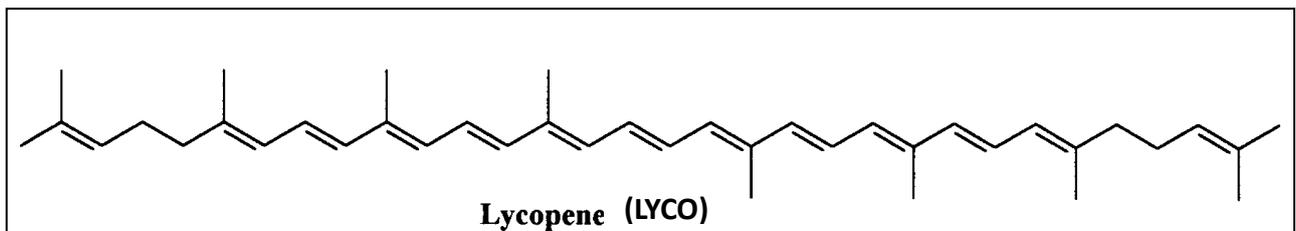


Fig. 1 Estructura del LYCO (Tomado de Socaciu *et al.*, 2000)

Algunos estudios epidemiológicos sugieren que el consumo de LYCO puede proteger contra varios tipos de cáncer como el de próstata, cérvix, faringe, esófago, estómago y colon rectal (Kris-Etherton *et al.*, 2002), aunque el efecto del LYCO se ha estudiado más exhaustivamente en hombres con cáncer de próstata (Van Patten *et al.*, 2008; Willis y Wians, 2003). Además, parece que también juega un papel en la protección contra la exposición a la luz ultravioleta (Candelas-Castillo *et al.*, 2005; Kris-Etherton *et al.*, 2002) y al humo del cigarro, aunque en el 2002 Kris-Etherton *et al.*, comentan que hace falta más investigación en estos campos.

Wertz *et al.* en el 2004 mencionan que gracias al carácter lipofílico del LYCO, éste puede alojarse en la membrana celular (Figura 2) y así actuar a través de dife-

rentes mecanismos que tienen el potencial para retrasar la progresión del ciclo celular, reducir el daño al DNA y promover la defensa contra el estrés oxidativo.

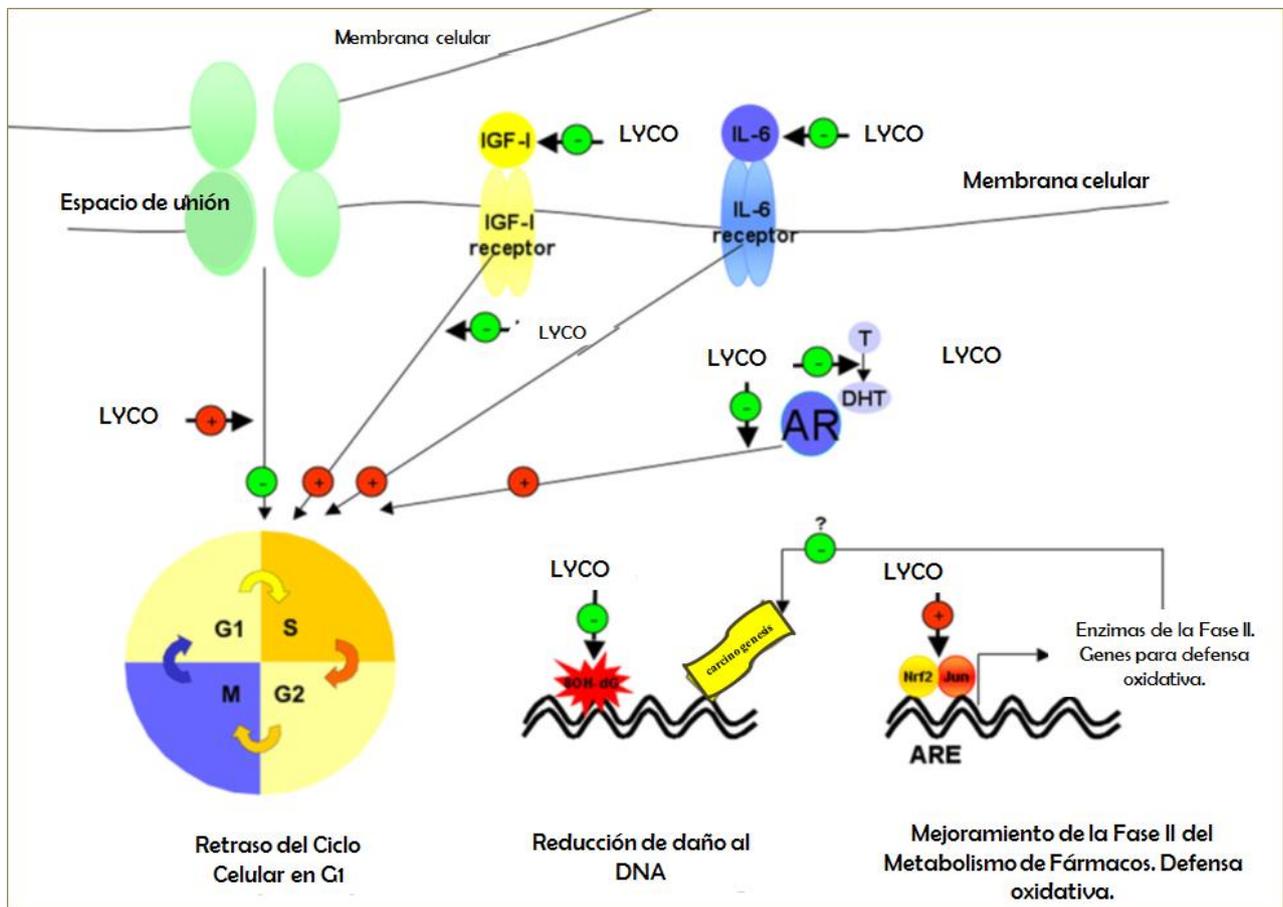


Fig. 2 Mecanismos de integración del LYCO (Tomado y modificado de Wertz *et al.*, 2004).

Por otra parte, también se le atribuyen propiedades antiproliferativas ya que ha mostrado ser un inhibidor más potente que el α - o β -carotenos (Yeh y Hu, 2000) contra el crecimiento de células tumorales y proliferación celular.

Se ha encontrado que el LYCO inhibe la proliferación celular en varios tipos de cáncer incluyendo pulmón, mama y endometrio (Heber y Quing-Yi, 2002).

Los productos de oxidación del LYCO contribuyen a su potencial anti-cancerígeno (Zhang *et al.*, 2003) y se ha demostrado previamente que una mezcla de auto-oxidación del LYCO inhibe el crecimiento e induce apoptosis en células HL-60 (Nara *et al.* 2001, citado en Zhang *et al.*, 2003). Se ha sugerido que este carotenode puede inhibir la progresión del ciclo celular en la fase G₀ y G₁ (Agarwal y Rao, 2000; Amir *et al.* 1999 en Heber y Quing-Yi, 2002) y que los productos de oxidación del mismo tienen efectos pro-apoptóticos (Zhang *et al.*, 2003).

Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) y Especies Reactivas de Oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés)

Hasta ahora el daño oxidativo al DNA ha sido reconocido como causa principal de muerte celular y mutaciones en todos los organismos aeróbicos. En los seres humanos se considera un importante promotor de cáncer (Slupphaug *et al.*, 2003).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas de oxígeno que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado, dando una configuración espacial que genera inestabilidad. Esto las hace reactivas y con una enorme capacidad de combinarse inespecíficamente con moléculas integrantes de estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos. En el DNA, las ROS producen bases modificadas, lo que genera mutaciones y carcinogénesis o pérdida de la expresión por daño al gen específico (Rodríguez *et al.*, 2001). El estrés oxidativo inducido por ROS es uno de los principales temas de investigación relacionados con el cáncer y enfermedades cardiovasculares. Hay una fuerte evidencia de que el daño inducido por ROS desempeña un papel importante en la aparición de enfermedades crónicas (Agarwal y Rao, 2000).

Los más importantes son: $O_2^{\bullet -}$ (radical superóxido), OH^{\bullet} (radical hidroxil) y H_2O_2 (peróxido de hidrógeno) (Slupphaug *et al.* 2003).

Se han sugerido dos posibles explicaciones para el daño inducido al DNA por el H_2O_2 ; el primero es la formación de radicales OH (Cohen, 1985 en Horváthová *et al.*, 1998); es probable que muchos de los efectos biológicos de H_2O_2 están mediados por los radicales hidroxilo que son altamente reactivos, OH^{\bullet} , generados en un proceso catalizado por iones metálicos de transición, por lo general Fe^{2+} . A esta reacción se le conoce como la reacción de Fenton (Cohen, 1985 y Dreher *et al.*, 1996 en Horváthová *et al.*, 1998). La segunda explicación es que se desencadena una serie de eventos metabólicos dentro de la célula que conducen a la activación de enzimas nucleasas, (Halliwell *et al.*, 1991 en Horváthová *et al.*, 1998) las cuales se unirán al DNA en un mecanismo parecido al de la apoptosis. Estos dos mecanismos no son mutuamente excluyentes, es decir, que ambos podrían suceder.

Metil metanosulfonato (MMS)

El MMS es utilizado como solvente, insecticida y agente quimioterapéutico. Es un agente alquilante mutagénico, que posee gran afinidad a centros nucleofílicos del DNA como el N7G y N3A. Debido a que el reactivo final del MMS es el ión metilo (CH_3^+) tiene propiedades electrofílicas, una vía de reacción alquilante $\text{S}_{\text{N}}2$ y es de tipo monofuncional, porque sólo dona un metilo a cualquier oxígeno o nitrógeno de las bases nitrogenadas, excepto el N1 de las pirimidinas y el N9 de las purinas que se unen a la d-ribosa (Jenkins *et al.*, 2005).

El MMS es de tipo directo, porque no necesita ser metabolizado para inducir alquilaciones en el DNA y produce un 9% de mutaciones de tipo transición (Friedberg *et al.*, 1995). De los aductos que forma el MMS 81-85% son el N7G, 10.4-11.3% en N3A, 1.8% en N7A, 0.6% en N3G (Jenkins *et al.*, 2005). Se clasifica como un mutágeno relativamente débil (Tao *et al.*, 1993), posiblemente los aductos predominantes N7G y N3A no son mutágenos por si mismos, ya que puede ocurrir la replicación sin desemparejamientos.

La alquilación celular del DNA provocado por el MMS, puede ser modificada por antioxidantes y de manera indirecta (Mangal *et al.*, 2009).

Este alquilante directo produce sitiosapurínicos/apirimídicos (AP) porque tiende a romperse espontáneamente el anillo en los C8 y C9, y hay labilidad de la unión

glicosídica con el C1 de la d-ribosa. Estos sitios AP producen mutaciones cuando posteriormente se inserta una base incorrecta, o después de la replicación; si provocaron rupturas simples éstas se convierten en dobles (DSB) lo que provoca reparación por recombinación entre homólogos (HRR) y unión de extremos (NEHJ). Además al abrirse el anillo metilado (N7-meG) se inhibe la replicación lo cual es potencialmente mutagénico (Jenkins *et al.*, 2005).

Se sabe que el sistema de reparación por escisión de bases (BER) interviene en la reparación de N7-meG y N3-meA, por lo que puede contribuir a determinar el umbral de respuesta genotóxica del MMS (Jenkins *et al.*, 2005). Los daños del MMS también son reparados rápidamente por alquiltransferasas sin consecuencias genotóxicas.

Existen tres sistemas principales que reparan los daños producidos por el MMS al Nitrógeno 3 de la adenina (N3A): la reparación post-replicativa (HRR) y la reparación por edición durante la replicación (Jenkins *et al.*, 2005). Sin embargo la apoptosis y los check points (puntos de chequeo) son otros sistemas de protección de la célula que son independientes al tipo de daño producido.

Drosophila melanogaster

Drosophila melanogaster (*D. melanogaster*) también se conoce como mosca de la fruta o del vinagre, es un insecto díptero holometábolo que posee un número de cromosomas reducido (4 pares). Presenta un ciclo de vida corto de 10-12 días a 25°C con cuatro estadios: huevo, larva, pupa y adulto (Amorós, 2001). Durante el estadio larval la ingestión del alimento es continua, llegando a consumir de tres a cinco veces su peso, lo que hace que éste se incremente de 0.05 a 2.0 mg, esta etapa dura alrededor de 4 días (Mitchel y Combes, 1984).

La metamorfosis ocurre en el estadio de pupa, en donde se forman las estructuras adultas (antenas, alas, ojos etc.) esto, a partir de los discos imagales. El par de discos imagales de las alas consisten en aproximadamente 30,000 células en la pupa temprana, cuando inicia la diferenciación del ala (Graf, 1995; Mitchel y Combes, 1984). La madurez sexual de un macho adulto se alcanza entre las seis y ocho horas después de haber emergido del pupario, mientras que una hembra tarda de diez a doce horas en alcanzar esta madurez. Una hembra fecundada puede depositar entre 50-75 huevos en un día, posteriormente disminuye esta producción (Graf, 1995; Mitchel y Combes, 1984).

Este organismo es uno de los eucariontes más utilizados en investigaciones biológicas, particularmente en Genética y Biología del Desarrollo (Cullinton, 2000).

Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en ala.

La prueba SMART es un ensayo de una sola generación en el cual se utilizan marcadores recesivos que se expresan en la superficie del ala de las moscas adultas. Se fundamenta en la pérdida de la heterocigosis de los genes marcadores (VER ANEXO 2) (Graf *et.al.* 1984).

La principal ventaja de estos sistemas de prueba somáticos reside en el hecho de que no sólo detectan varios tipos de eventos de mutación, sino que también manifiestan la recombinación somática. La prueba de mancha en ala ofrece la ventaja de que los experimentos con un número alto de manchas gemelas es posible cuantificar la actividad recombinogénica contra la mutagénica (Frei y Würgler, 1995).

ANTECEDENTES

Scolastici *et al.* (2007) evaluaron la actividad del LYCO contra el daño químico inducido *in Vitro* contra el DNA de células de ovario de hámster (CHO) utilizando como mutágenos el metil metanosulfonato (MMS), el 1-óxido-4-nitroquinolina (4-NQO) y el peróxido de hidrogeno (H₂O₂). Reportaron que el LYCO previene lesiones en el DNA y aberraciones cromosómicas, pero la actividad quimiopreventiva depende de la dosis y del tratamiento utilizado así como del mutágeno utilizado.

Zhang *et al.* (2003) aislaron e identificaron una nueva división de productos a partir de una mezcla de auto-oxidación del LYCO y evaluaron su actividad inductora de apoptosis contra las células HL-60. En este estudio se aisló un nuevo producto con actividad inductora de apoptosis, el (E, E, E)-4-methyl-8-oxo-2, 4, 6-nonatrial (MON). Los autores reportan que el MON redujo la viabilidad celular por la inducción de apoptosis en células HL-60 y que los productos de oxidación del LYCO contribuyen a su potencial anti-cancerígeno.

En el 2007, Tang *et al.*, analizaron la modulación de la toxicidad de aflatoxinas y biomarcadores por acción del LYCO en ratas F344, encontrando que el caroteno tiene actividad inhibitoria en la Fase I del metabolismo xenobiótico y activa enzimas de la Fase II. También confirmaron su actividad antioxidante.

Los efectos antioxidantes y pro-oxidantes del LYCO en comparación con los del β -caroteno y en contra del daño oxidativo inducido en células Hs68 fueron analizado por Yeh y Hu (2000) reportando que el LYCO y el β -caroteno pueden ser tanto antioxidantes como pro-oxidantes, dependiendo del oxidante utilizado y que los efectos de LYCO son más fuertes que los del β -caroteno.

Guttenplan *et al.* (2001) observaron el efecto del LYCO en la mutagénesis espontánea o inducida en próstata, colon y pulmón de ratones tratados con benzo[α]pireno. Encontraron una divergencia en los efectos del LYCO, lo que sugiere una posible especificidad del carotenoide para la actividad inhibitoria en la próstata. También reportaron que no aumentaron las mutaciones espontáneas en los órganos tratados. Concluyen que su estudio apoya parcialmente el papel del LYCO en la reducción de mutaciones espontáneas.

OBJETIVO

- Demostrar si el pre-tratamiento con LYCO protege o no del daño provocado por el agente alquilante MMS, esto mediante la prueba SMART en ala de *D. melanogaster*, cruza estándar (CE).

HIPÓTESIS

- 1) Si al LYCO se le atribuyen propiedades antioxidantes, pro-apoptóticas y antiproliferativas y puede proteger contra algunos mutágenos directos, entonces reducirá el daño provocado por el agente alquilante directo MMS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas de D. melanogaster:

Donadas originalmente por Ulrich Graf (*Institute of Animal Science, Section Physiology and Animal Husbandry, Swiss Federal Institute of Technology. Schwerzenbach, Switzerland*) y mantenidas en el Laboratorio de Genética Toxicológica de la FES Iztacala.

- “*multiple wing hairs*” (*mwh/mwh*). En adelante *mwh*, contiene una mutación homocigótica viable localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-0.3), que produce tricomas múltiples en las alas en lugar del tricoma único de la condición silvestre.
- “*flare*” (*flr³/In (3LR) TM3, ri p^o sep bx^{34e} e^s Bd^(s)*); de forma abreviada: (*flr³/TM3, Bd^(s)*). En adelante *flr³*. Se caracteriza por tener una mutación que afecta la forma de los tricomas, localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-38.8) y es letal en homocigosis. Se mantiene la heterocigosis por efecto del cromosoma que lleva el balanceador TM3.

Químicos

- LYCO (CAS 502-65-8, pureza \geq 90%, 0.45, 0.9, 1.8 μ M)
- MMS (CAS 66-27-3, pureza 98%, 0.5 mM)
- Acetona 2% (CAS 67-64-1, pureza 99.9%)
- Hexano (CAS 110-54-3, 60-66% n-Hexano, 0.17 μ L/mL)
- Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) (CAS 7722-84-1, pureza 30%, 0.02 M).

Fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EE.UU.). El Medio Instantáneo *Drosophila* (DIM, por sus siglas en inglés) se obtuvo de Carolina Biological Supply Co. (Burlington, North Carolina, EUA)

Métodos:

Propagación:

Las líneas mwh y flr³ se propagaron en frascos con 5 g de hojuelas de papa deshidratada para puré (Maggi®), posteriormente se hidrataron con solución conservadora (5 mL de ácido propiónico + 5 mL de Tegosept 12%) (Dueñas *et al.*, 2002).

Cruza Estándar (CE)

Se aislaron machos de la línea mwh y hembras vírgenes de la línea flr³ y se llevó a cabo la CE. Se colectaron los huevos de la crua en levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) activada con sacarosa, bajo condiciones de oscuridad, a una temperatura de 25 °C y HR 60% durante 8 h. Tres días después, larvas de 72 ± 4 h de edad se retiraron del medio lavando con agua corriente (25 °C) y con la ayuda de un colador metálico de malla muy fina.

Pre-tratamientos

Para SMART en ala se sometieron las larvas de 72 ± 4 h de edad a los pre-tratamientos de LYCO (0.45, 0.9, 1.8 µM), la mezcla [acetona (2% v/v)/hexano (0.17 µL)mL] y agua miliQ. Los pre-tratamientos se desarrollaron en condiciones de oscuridad y se incubaron 6h a 25°C y HR 60% en tubos con 1g de DIM y 18 mL de cada uno de los pre-tratamientos a las concentraciones ya mencionadas.

Tratamientos

Se recuperaron las larvas y se trasvasaron a tubos con 0.5 g de DIM y 2 mL de MMS (0.5 mM), agua miliQ o H₂O₂ (0.02 M). Se realizaron tres experimentos independientes con tres réplicas por tratamiento.

SMART en ala

De 10-12 días después de haber colectado los huevos, se colectaron de 55 a 61 imágos (Frei y Würgler, 1995) por tratamiento en frascos viales con alcohol al 70%. Posteriormente, con las alas silvestres, se hicieron preparaciones permanentes utilizando Entellan®.

Se revisaron las superficies de cada ala en un microscopio óptico a 40x y se registraron el número y tipos de mancha o clones de células mutantes presentes de acuerdo con Graf *et al.*, 1984.

Para el análisis de SMART se utilizó el programa para PC SMART (Frei y Würgler, 1988) que evalúa estadísticamente las frecuencias de las manchas en las alas con una significancia de $\alpha=\beta \leq 0.05$. En caso de obtener resultados débiles o indecisos se realizó el análisis con la prueba no paramétrica U de Wilcoxon-Mann-Whitney que considera la variabilidad individual (Frei y Würgler, 1995).

Para el análisis de las distribuciones de los tamaños de los clones *mwh* se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnoff , 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 $p < 0.05$ los resultados indican que hay diferencias significativas entre ambas distribuciones y por lo tanto una distribución es diferente de la otra.

RESULTADOS

SMART EN ALA

En el Cuadro 1 se muestra que no hubo diferencia en las frecuencias de las manchas entre los testigos Agua/Agua y Acetona-Hex/Agua. Al comparar el testigo Acetona-Hex/ Agua vs LYCO (0.45, 0.9, 1.8 μ M)/ Agua se observó una tendencia hacia la disminución en la frecuencia de manchas pequeñas conforme aumenta la concentración de LYCO, aunque esto sólo fue significativo para manchas pequeñas en la concentración 1.8 μ M.

Cuadro 1. Resultados obtenidos de SMART en ala de *D. melanogaster* CE, se muestra la frecuencia y el número de manchas por individuo para el tratamiento LYCO (0.45, 0.9, 1.8 μ M)/Agua, para el cual su testigo fue Acetona-Hex/ Agua.

Pre- tratamiento/ Post-	No. individuos	Manchas por individuo (número de manchas) diagnóstico estadístico*				
		Manchas	Manchas	Manchas	Manchas to-	

tratamiento		pequeñas (1-2 células) m=2		grandes (> 2 células) m=5		gemelas m=5		tales m=2		Clones mwh
Agua/ Agua	60	0.57	(34)	0.05	(3)	0.0	(0)	0.62	(37)	36
Acetona-Hex/ Agua	59	0.59	(35) -	0.10	(6) -	0.0	(0) -	0.69	(41) -	41
Acetona-Hex/ Agua	59	0.59	(35)	0.1	(6) 0	0.0	(0)	0.69	(41)	41
LYCO 0.45 μ M / Agua	58	0.50	(29) -	0.09	(5) -	0.02	(1) -	0.60	(35) -	34
LYCO 0.9 μ M / Agua	60	0.40	(24) -	0.13	(8) -	0.0	(0) -	0.53	(32) -	27
LYCO 1.8 μ M / Agua	59	0.34	(20) ↓	0.14	(8) -	0.0	(0) -	0.47	(28) -	26

* Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würigler (1988) comparado con su testigo correspondiente. Donde: m: factor de multiplicación, negativo: (-), disminución de frecuencia (↓). Prueba estadística de una cola. Niveles de probabilidad α y β = 0.05

En la comparación Acetona-Hex/ H₂O₂ vs LYCO (0.45, 0.9, 1.8 μ M)/ H₂O₂ (Cuadro 2) no se encontraron diferencias entre los tratamientos y su testigo.

Cuadro 2. Resultados obtenidos de SMART en ala de *D. melanogaster* CE, se muestra la frecuencia y el número de manchas por individuo para el tratamiento LYCO (0.45, 0.9, 1.8 μ M)/ H₂O₂ para el cual su testigo fue Acetona-Hex/ H₂O₂.

Pre-	Manchas por individuo (número de manchas) diagnóstico estadístico*
-------------	---

tratamiento/ Post- tratamiento	No. individuos	Manchas pequeñas (1-2 células)		Manchas grandes (> 2 células)		Manchas gemelas		Manchas to- tales		Clones <i>mwh</i>
		m=2		m=5		m=5		m=2		
Agua/ Agua	60	0.57	(34)	0.05	(3)	0.0	(0)	0.62	(37)	36
Acetona-Hex / H ₂ O ₂	59	0.46	(27)	-	0.10 (6)	-	0.0 (0)	0.56	(33)	33
Acetona-Hex / H ₂ O ₂	59	0.46	(27)	0.10	(6)	0.0	(0)	0.56	(33)	33
LYCO 0.45 μM / H ₂ O ₂	61	0.46	(28)	-	0.08 (5)	-	0.02 (1)	0.56	(34)	34
LYCO 0.9 μM / H ₂ O ₂	60	0.27	(16)	-	0.10 (6)	-	0.02 (1)	0.38	(23)	23
LYCO 1.8 μM / H ₂ O ₂	61	0.38	(23)	-	0.10 (6)	-	0.0 (0)	0.48	(29)	27

* Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988) comparado con su testigo correspondiente. Donde: m: factor de multiplicación, negativo: (-). Prueba estadística de una cola. Niveles de probabilidad α y β = 0.05.

Con respecto a los tratamientos con MMS (Cuadro 3) se muestra que el testigo Acetona-Hex/ MMS tuvo frecuencias significativamente por arriba de las encontradas en el testigo Agua/ MMS.

Cuadro 3. Resultados obtenidos con SMART en ala de *D. melanogaster* CE, se muestra la frecuencia y el número de manchas por individuo para el tratamiento: LYCO (0.45, 0.9, 1.8 μM)/ MMS, para el cual el testigo fue Acetona-Hex/ MMS.

Pre- tratamiento/	No.	Manchas por individuo (número de manchas) diagnóstico estadístico*				
		Manchas pequeñas	Manchas grandes	Manchas gemelas	Manchas to- tales	Clones

Post-tratamiento	individuos	(1-2 células)		(> 2 células)						<i>mwh</i>
		m=2		m=5		m=5		m=2		
Agua/ MMS	60	4.85	(291)	1.73	(104)	0.03	(2)	6.62	(397)	386
Acetona-Hex / MMS	56	7.14	(400) -	4.11	(230) +	0.21	(12) -	11.46	(642) +	628
Acetona-Hex / MMS	56	7.14	(400)	4.11	(230)	0.21	(12)	11.46	(642)	628
LYCO 0.45 μ M / MMS	56	8.05	(451) -	3.91	(219) -	0.29	(16) -	12.25	(686) -	674
LYCO 0.9 μ M / MMS	59	9.69	(572) -	5.07	(299) -	0.14	(8) -	14.90	(879) -	862
LYCO 1.8 μ M / MMS	55	3.13	(172) ↓	2.24	(123) ↓	0.0	(0) ↓	5.36	(295) ↓	278

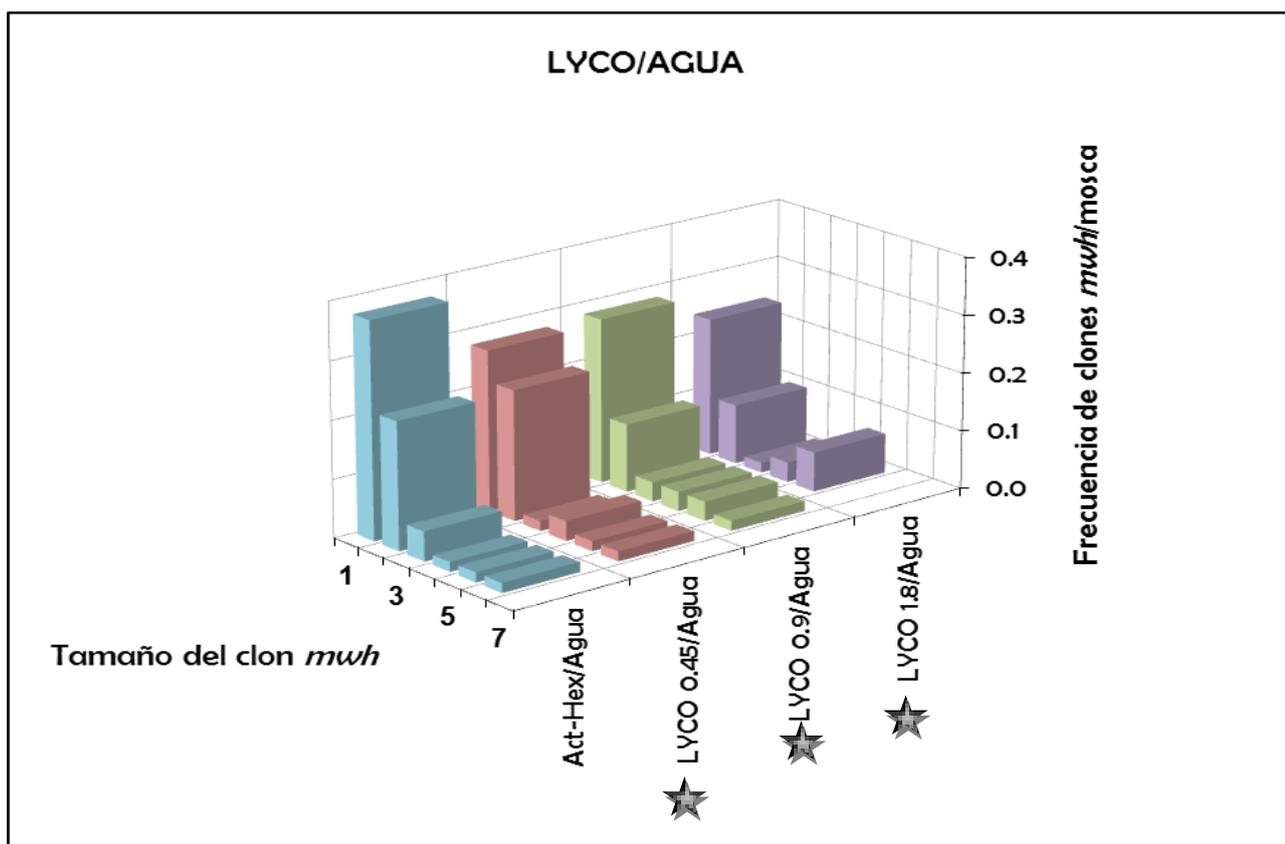
* Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988) comparado con su testigo correspondiente. Donde: m: factor de multiplicación, negativo: (-), disminución de frecuencia (↓). Prueba estadística de una cola. Niveles de probabilidad α y β = 0.05.

Además, en los tratamientos LYCO 0.45 y 0.9 μ M, con respecto al testigo Acetona-Hex/ MMS, las frecuencias de manchas pequeñas y grandes muestran una tendencia a aumentar de manera proporcional a la concentración de carotenoide, aunque esto no fue estadísticamente significativo.

Con el tratamiento LYCO 1.8 μ M hubo un descenso significativo en la frecuencia de todas las clases de manchas con respecto a su testigo e incluso por debajo del tratamiento Agua/ MMS, aunque para este último no fue significativo para todos los tipos de manchas.

TAMAÑO Y DISTRIBUCION DEL CLON *mwh*

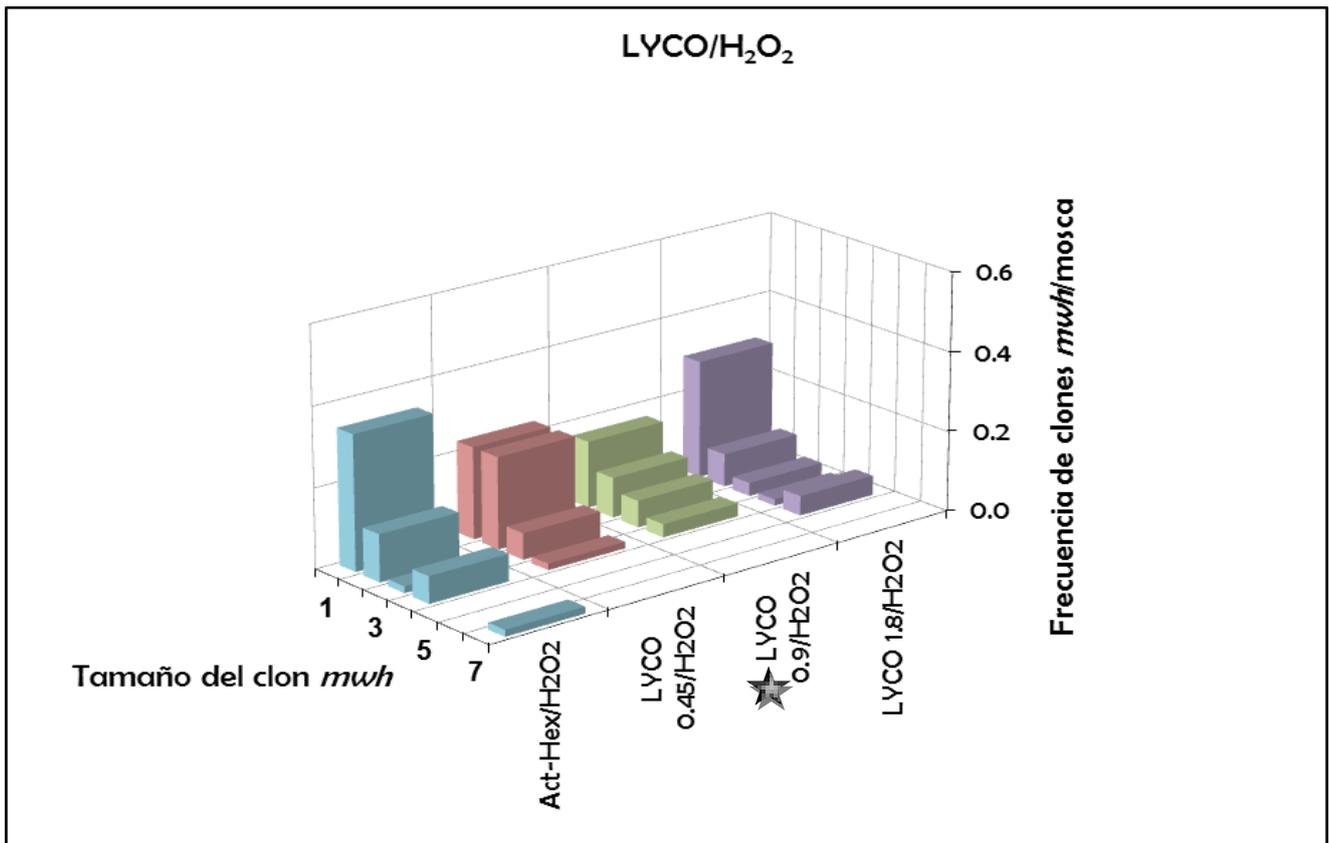
La distribución y frecuencia de clones *mwh* en los testigos negativos, que representa el número de divisiones de las células de los discos imagales sin tratamiento, se comparó estadísticamente con las de los tratamientos LYCO/Agua (Gráfica 1). Todos los tratamientos con LYCO tuvieron una distribución estadísticamente diferente a la encontrada en el testigo Acetona-Hex/ y una mayor frecuencia en los clones de 1 célula.



Gráfica 1. Frecuencia y distribución de clones *mwh*, obtenidos en los tratamientos LYCO (0.45, 0.9, 1.8 μ M)/ Agua y en el testigo Acetona-Hex/ Agua. ★ valores estadísticamente significativos de acuerdo con la Prueba Kolmogorov-Smirnoff ($p < 0.05$).

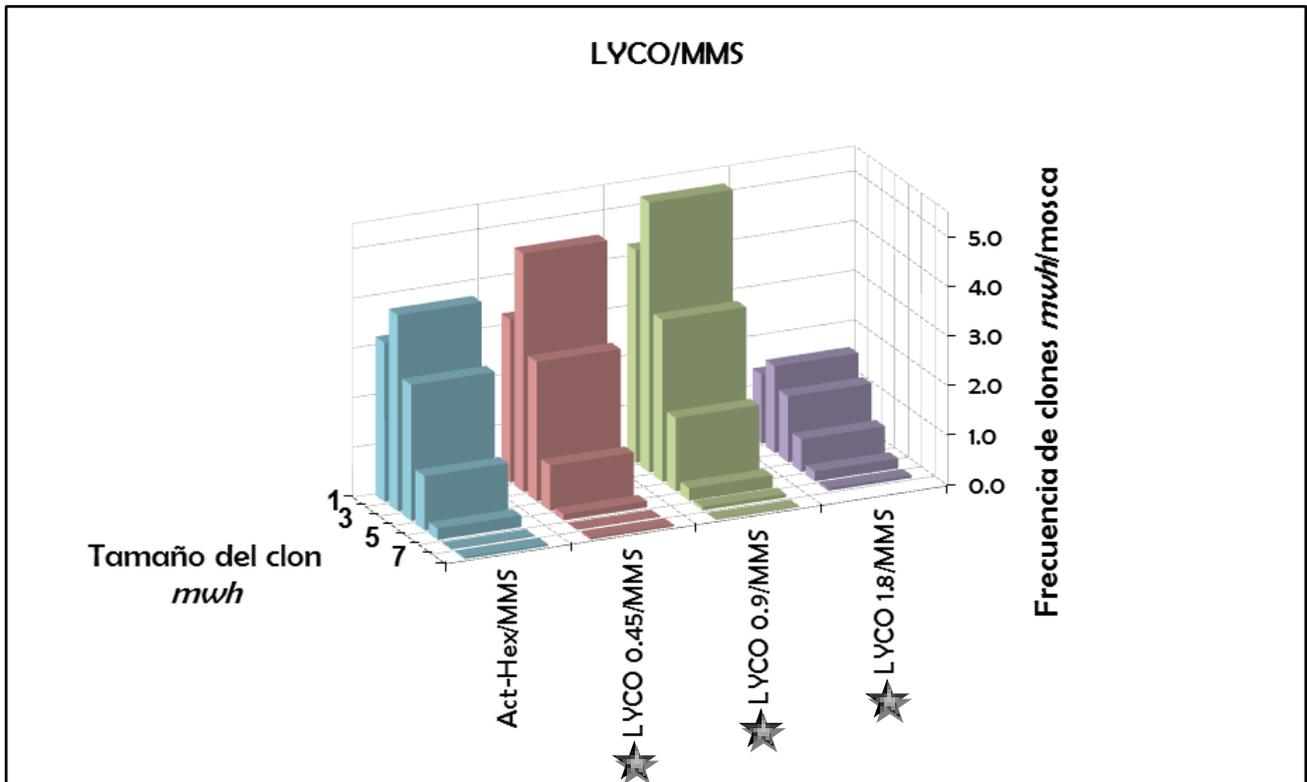
La frecuencia y distribución de clones *mwh* para el testigo Acetona-Hex/ H₂O₂ y los tratamientos LYCO /H₂O₂ (Gráfica 2) mostró que sólo el tratamiento LYCO 0.9 µM/ H₂O₂ tuvo una distribución estadísticamente diferente a la encontrada en el testigo y en los demás tratamientos.

En todos los tratamientos de LYCO/ H₂O₂ así como en el testigo Acetona-Hex/ H₂O₂ se encontró que la mayor frecuencia de clones *mwh* la tienen las manchas de 1 célula excepto en el tratamiento LYCO 0.45 µM obtuvo una mayor frecuencia en manchas de 1 y 2 células.



Gráfica 2. Frecuencia y distribución de clones *mwh*, observados en los tratamientos LYCO (0.45, 0.9, 1.8 μM)/ H_2O_2 y el testigo Acetona-Hex/ H_2O_2 .★ Valores estadísticamente significativos de acuerdo con la Prueba Kolmogorov-Smirnoff ($p < 0.05$).

Para los tratamientos de LYCO/MMS, todos (LYCO 0.45, 0.9 y 1.8 μM) obtuvieron un distribución estadísticamente diferente a la de su testigo Acetona-Hex/MMS (Gráfica 3) presentando en todos los tratamientos una mayor frecuencia en las manchas de 2 células.



Gráfica 3. Frecuencia y distribución de clones *mwh*, obtenidos en los tratamientos LYCO (0.45, 0.9, 1.8 μ M)/ MMS y el testigo Acetona-Hex/ MMS.★ Valores estadísticamente significativos de acuerdo con la Prueba Kolmogorov-Smirnoff ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

LYCO/MMS

La alteración en la distribución de clones *mwh* obtenida con el tratamiento LYCO 1.8 μ M/MMS, coincide con la significancia estadística para la frecuencia de manchas

del mismo tratamiento, y apoya la idea de que hubo una menor frecuencia de daño genotóxico por efecto del LYCO posiblemente por la vía de la apoptosis.

Para explicar esto, se debe tener en cuenta que el LYCO es altamente susceptible a la oxidación debido a la presencia de 11 dobles enlaces conjugados (Khachik *et al.*, 1992 en Zhang *et al.*, 2003). Zhang *et al.* (2003) sugieren que los productos de oxidación de los carotenos tienen potencialmente efectos biológicos en la salud humana y mencionan específicamente que los productos de oxidación del LYCO son los que le pueden inducir la apoptosis; sin embargo, no se sabe de manera clara si estas reacciones se pueden presentar en un sistema *in Vivo* y si estos productos son benéficos o no para los sistemas biológicos; también sugiere que estos productos pueden “llevarse a cabo” *in Vivo* por acción de enzimas específicas (que el autor no menciona) y/o por reacciones del LYCO con ROS.

Se han identificado los productos de la auto-oxidación del LYCO en varias condiciones oxidativas *in Vitro*, que pueden ocurrir *in vivo* (Kim *et al.*, 2001 en Zhang *et al.* 2003).

También hay que tener en cuenta que la alquilación celular del DNA provocado por el MMS, puede causar un poco de daño oxidativo (Mangal *et al.*, 2009); el efecto del tratamiento LYCO 1.8 μM /MMS puede compararse con lo que reportaron Tada-Oikawa *et al.* (1999) quienes en su estudio encontraron que la formación de H_2O_2 precedió a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial in-

ducido por el proceso de apoptosis y que el daño al DNA y la producción de H_2O_2 probablemente fueron eventos paralelos provocados por el fármaco alquilante *Duamycin*. Por lo tanto, es probable que, en este trabajo, el LYCO haya tenido un efecto pro-apoptótico por su interacción con las ROS, al ser oxidado por estas especies reactivas se promovería la formación de sus productos de oxidación los cuales pueden dar el efecto apoptótico (Zhang *et al.* 2003).

Scolastici *et al.* (2007) encontraron que el LYCO tuvo un efecto “protector” cuando se administró antes o simultáneamente al MMS, tanto en el ensayo cometa como en el de micronúcleos. Los autores sugieren que el LYCO puede reducir el daño producido por la alquilación del MMS cuando es administrado antes o simultáneamente a la genotoxina y concluyen que el LYCO es un compuesto capaz de ejercer actividades anti-mutagénicas y anti-genotóxicas *in Vitro* aunque algunos autores consideran que puede ser muy prematuro llevar a cabo ensayos clínicos con LYCO (Yeh y Hu, 2000) ya que en los estudios *in Vitro* no se tienen en cuenta la compleja situación homeostática que ocurre *in Vivo*.

Por otro lado, es probable que el LYCO, en las concentraciones utilizadas, tenga una actividad parecida a la del β -caroteno el cual se ha reportado que induce efectos citostáticos en concentraciones de hasta 20 μM , que reducen la viabilidad celular y tiene efectos citotóxicos en concentraciones más altas y puede actuar como un agente proliferativo e inductor de apoptosis, dosis-dependiente (Palozza *et*

al., 2002 y 2001). En el estudio de Palozza *et al.*, 2001, el β -caroteno afectó la expresión del gen *Bcl-2* por un mecanismo que implica un aumento de los niveles de ROS. Sus datos apoyan la hipótesis de que ROS está relacionada con la actividad de Bcl-2 en el proceso de la apoptosis y señala la importancia de demostrar si la expresión de *Bcl-2* es modulada por β -caroteno a un nivel pre- o post-transcripcional.

También es posible que el LYCO actúe como un agente redox, al igual que el β -caroteno, protegiendo contra los radicales libres en ciertas circunstancias (antioxidante) y promoviendo la formación de los mismos en otras (pro-oxidante) (Palozza *et al.*, 2002; Yeh y Hu, 2000), esto en función de la concentración del caroteno en la célula, en la tensión del oxígeno en el ambiente biológico, así como del estado redox celular (Palozza *et al.*, 2001). Los autores reportan que el carotenoide en realidad actuó como un modulador intracelular de la producción de ROS en las células tumorales y que a través de esta modulación se regula el crecimiento celular del tumor.

Yeh *et al.* (2005) demostraron que el LYCO aumenta el estrés oxidativo inducido por UVA en células C3H. Los autores sugieren que debido a la radiación UVA el LYCO puede producir productos de oxidación que son los responsables de sus efectos pro-oxidantes.

LYCO/H₂O₂

El H₂O₂ es capaz de interactuar con el DNA a través del oxígeno altamente reactivo y especies radicales que causan gran daño oxidativo (Ratnam *et al.*, 2006).

En el caso del testigo oxidante H₂O₂, los tratamientos con LYCO no obtuvieron ningún efecto reflejado en SMART; y en la distribución de clones *mwh* solo el tratamiento LYCO 0.9 μM/ H₂O₂ alteró la división celular.

En 1993 Furukawa *et al.* probaron la actividad mutagénica del H₂O₂ con la prueba SMART en ala de *D. melanogaster*, y reportaron que la actividad de catalasas de las pupas alimentadas con H₂O₂ se incrementó 158 veces. Los autores consideraron que la función de antioxidantes como la catalasa parece proteger contra el daño oxidativo al DNA en *D. melanogaster*.

Kawai y Furukawa (1995) examinaron el efecto oxidativo del H₂O₂ en *D. melanogaster* mediante el método de CL-HPLC y determinando la formación de radicales libres en *D. melanogaster* con el ESR (JEOL RE-2X), encontraron que la actividad mutagénica y el daño al DNA por parte del H₂O₂ fueron negativos, y consideraron que el DNA estaba “protegido” por catalasas, antioxidantes y sistemas de reparación.

LYCO/Agua

La tendencia a la disminución de la tasa de mutación espontánea con LYCO/Agua y significancia para LYCO 1.8 μM /Agua concuerda con lo reportado por Guttenplan *et al.* (2001) quienes mencionan que su estudio apoya parcialmente el papel del LYCO en la reducción de mutaciones espontáneas.

Es posible que en este tratamiento estemos observando la actividad antioxidante del LYCO la cual ha sido reportada por Rao y Shen (2002) y Shi *et al.*,(2007); ya que en ambos estudios redujo eficientemente los marcadores oxidativos.

Disolvente Act-Hex

La elección de acetona 2%-Hexano (Acetona-Hex) como disolvente del LYCO fue una necesidad dada por el carácter lipofílico de este carotenoide. No se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias de manchas al comparar los tes-

tigos Agua-Agua vs Act-Hex/Agua pero en cuanto a la distribución de clones *mwh*, el testigo Act-Hex/Agua tuvo una distribución estadísticamente diferente a la de Agua-Agua (ANEXO 1).

Por otro lado, el mayor daño genotóxico encontrado en el testigo Acetona-Hex/MMS (Anexo 3) cuando fue comparado con Agua/MMS puede explicarse teniendo en consideración las polaridades de la acetona (polaridad media), el hexano (no polar) y el MMS (polar); como ya se sabe, los compuestos que son no polares, neutros o que tienen grupos polares débiles se difunden a través de las membranas celulares mucho más fácilmente que los compuestos con carga polar (Bevan *et al.* 1982; Bowman & Ran, 1985).

Ya sea por difusión o por la corriente que originan las diferencias hidrostáticas y osmóticas a través de la membrana y de la magnitud del flujo de agua, ésta puede arrastrar consigo moléculas (Goodman & Gilman, 2007) como el MMS. La membrana celular se puede conducir como si estuviera atravesada por pequeños “poros” o canales acuosos que permiten el paso libre de moléculas hidrosolubles y del agua misma (Bowman & Ran, 1985; Goodman & Gilman, 2007). En general los canales pueden estar abiertos o cerrados y estos son fenómenos por completo aleatorios (Goodman & Gilma, 2007) aunque pudieron haber sido mediados por la mezcla Acetona-Hex.

Es probable que, a través de los mecanismos ya descritos, la mezcla Acetona-Hex, haya facilitado la entrada de una mayor cantidad de MMS al interior de la célula, causando así un mayor daño cuando fue utilizada dicha mezcla como pretratamiento.

CONCLUSIONES

- El pre-tratamiento LYCO 1.8 μM disminuyó la frecuencia de manchas pequeñas en el tratamiento Agua y la de todas las manchas en el tratamiento MMS.
- Los tratamientos LYCO/ Agua alteraron la división celular en los discos marginales de las alas y las manchas de una célula tuvieron la frecuencia mayor.
- Se propone que esto se debe al efecto inductor de apoptosis del LYCO que se ha descrito en la literatura.
- El H_2O_2 no resultó ser un buen testigo oxidante *D. melanogaster*, posiblemente por la acción de catalasas, aunque se debe investigar más para confirmar esto.
- El aumento del daño provocado por el agente MMS, al pre-tratar las larvas con el disolvente Acetona-Hex, podría deberse a la menor polaridad de éste, lo cual habría facilitado el ingreso del MMS a la célula
- El disolvente Acetona-Hexano alteró la división celular y las manchas de una célula tuvieron la frecuencia mayor, pero de manera diferente a la obtenida con los tratamientos LYCO.

RECOMENDACIONES

En investigaciones posteriores (con el mismo protocolo de investigación), se propone que:

- Se realice la cuantificación de catalasas, para asegurar su actividad.
- Medir marcadores de apoptosis
- Medir marcadores de estrés oxidativo (8-oxo-dG)

BIBLIOGRAFÍA

- Amorós M., 2001. Estudio de mutantes del cromosoma III de *Drosophila melanogaster*: el gen ash-2 como regulador de diferenciación celular, Tesis de doctorado (Biología). Fac. Biología. Univ. de Barcelona. España. 153pp.
- Agarwal S., Rao A. V., 2000. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *CMAJ*. 163(6): 739-744.
- 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.
- Bhuvanewari V., Nagini S., 2005. Lycopene: A review of its potential as an anticancer agent. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents*. 5: 627-635.
- Bowman W. C., Rand M. J., 1985. Farmacología. Bases bioquímicas y patológicas. Aplicaciones Clínicas. 2da Edición. Interamericana. México. pp 43-44.
- Candelas-Castillo M. G., M. G. J. Alanís-Guzmán, M. Bautista-Justo, F. Del Rio-Olague y C. García-Díaz. 2005. Contenido de licopeno en jugo de tomate secado por aspersión. *Rev. Mex. Ing. Quim*. 4: 299-307.
- Chen J., J. Shi, S. J. Xue and Y. Ma. 2009. Comparison of lycopene stability in water- and oil- based food model systems under thermal- and light-irradiation treatments. *J. Food Sci*. 42: 740-747.

- Dueñas I. E., M. E. Heres, P. L. Castañeda 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.
- Frei H. and F. E. Würgler. 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 F. E. Würgler. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat. Res.* 203: 297-308.
- Friedberg E. C., Walker G. C., Siede W. 1995. *DNA repair and mutagenesis*. ASM Press. Washington D. C. 698.
- Furukawa H., Kawai K., Miyazawa T. 1993. Low-level chemiluminescence from *Drosophila melanogaster* fed with hydrogen peroxide. *Mutat. Res.* 292(3): 263-264.
- Goodman & Gilman. 2007. Las bases farmacológicas de la Terapéutica. Undécima Edición. McGraw Hill, Interamericana. México. pp 2017.
- Graf U, F. E. Würgler, A. J. Katz, H. Frei, H. Houn, C. B. Hall and P. G. Kale. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6: 153-188.

- 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.
- Guttenplan J. B., Chen M., Kosinska W., Thompson S., Zhao Z., Cohen L. A., 2001 Effects of a lycopene-rich diet on spontaneous and benzo[α]pyrene-induced mutagenesis in prostate, colon and lungs of the *lacZ* mouse. *Cancer Lett.* 164: 1-6.
- Herber D., and Quing-Yi L., 20002. Overview of Mechanisms of Action of Lycopene. *Exp. Biol. Med.* 227(10): 920-923.
- Horváthová E., Slamenová D., Hlincíková L., Mandal T. K., Gábelová A., Collins A. R., 1998. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. *Mutat. Res.* 409: 163-171.
- Jenkins G. J. S., S. H. Doak, G. E. Johnson, E. Quick, E. M. Waters, and J. M. Parry. 2005. Do dose response thresholds exist for genotoxic 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.
- Kris-Etherton P. M., K. D. Hecker, A. Bonanome, S. M. Coval, A. E. Binkoski, K. F. Hilpert, A. E. Griel and T. D. Etherton. 2002. Bioactive Compounds in

Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. *Am. J. Med.* 113: (9B), 715–885.

- Mangal D., Vudathala D., Park J. H., Lee S. H., Penning T. M., 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.
- Mitchell I, Combes RD., 1984. Mutation tests with the fruit fly *Drosophila melanogaster*, In: Venitt S, Parry JM (Eds.), *Mutagenicity testing; a practical approach*, IRL Press, Oxford. 149-185.
- Palozza P., Calviello G., Serini S., Maggiano N., Lanza P., Ranelletti F. O., Bartoli G. M., 2001. β -carotene at high concentrations induces apoptosis by enhancing oxy-radical production in human adenocarcinoma cells. *Free Radic Biol Med.* 30(9): 1000–1007.
- Palozza P., Serini S., Torsello A., Boninsegna A., Covacci V., Maggiano N., Ranelletti F. O., Wolf F. I., 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.
- Rao A. V., and Agarwal S., 1999. Role of Lycopene as Antioxidant Carotenoid in the Prevention of Chronic Diseases: A Review. *Nutr. Res.* 19 (2): 305-323.

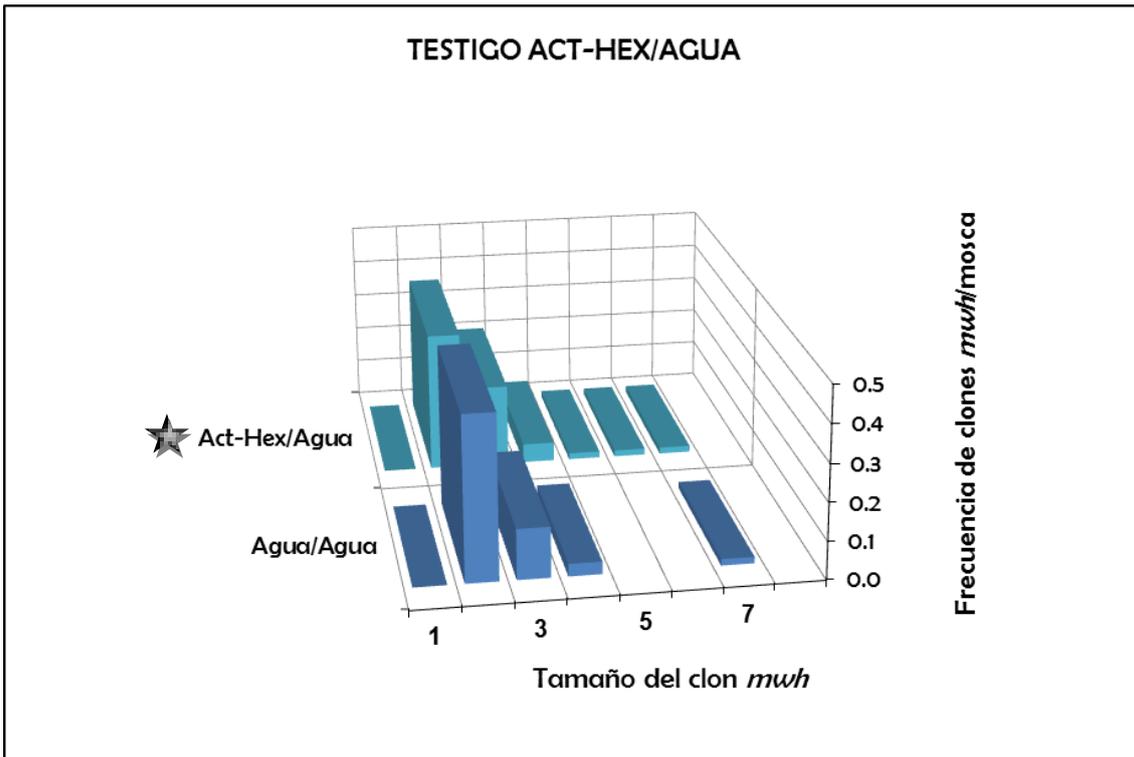
- Rao A. V., and Shen H., 2002. Effect of low dose lycopene intake on lycopene bioavailability and oxidative stress. *Nutr. Res.* 22: 1125-1131.
- Ratnam D. V., Ankola D. D., Bhardwaj V., Sahana D. K., Ravi-Kumar M. N. V., Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J. Control Release.* 113: 189-207.
- Rodríguez P. J. M., J. R. M. López y Y. T. López. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev. Cubana Méd. Mil.* 30: 36-44.
- Scolastici C., R. O. Alves de Lima, L. F. Barbisan, A. L. Ferreira, D. A. Ribeiro and D. M. F. Salvadori. 2007. Lycopene activity against chemically induced DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Toxicol. In Vitro* 21: 840-845.
- Shi J., Qu Q., Kakuda Y., Xue-Jun S., Jiang Y., Koide S., Shim Y. Y., 2007. Investigation of the antioxidant and synergistic activity of lycopene and other natural antioxidants using LAME and AMVN model systems. *J. Food Compos. Anal.* 20: 603-608.
- Slupphaug G., Kavli B., Krokan H. E., 2003. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res.* 531: 231-251.
- Socaciu C., Jessel R., Diehl H. A., 2000. Carotenoid incorporation into microsomes: yields, stability and membrane dynamics. *Spectrochim Acta Mol Biomol Spectrosc. A.* 56: 2799-2809.

- 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., H. Guan, X. Ding and J. Wang. 2007. Modulation of aflatoxin toxicity and biomarkers by lycopene in F344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 219: 10-17.
- Tao K. S., C. Urlando and J. A. Heddle. 1993. Mutagenicity of methylmethanesulfonate *in vivo* at the *dlb-1* locus and a *lac I* transgene. *Environ. Mol. Mutat.* 22: 293-296.
- Van Patten C. L., J. G. de Boer and E. S. G. Thomlinson. 2008. Diet and Dietary Supplement Intervention Trials for the Prevention of Prostate Cancer Recurrence: A Review of the Randomized Controlled Trial Evidence. *J. Urol.* 180: 2314-2321.
- Wertz K., Siler U., Goralczyk R., 2004. Lycopene: modes of action to promote prostate health. *Arch Biochem Biophys.* 430: 127-134.
- Willis M. S. and F. H. Wians JR. 2003. The role of nutrition in preventing prostate cancer: a review of the proposed mechanism of action of various dietary substances. *Clin. Chim. Acta.* 330: 57-83.

- Yeh, S. L. and M. L. Hu. 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.
- Zhang H., Nara-Kotake E., Ono H., 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

Distribución de clones mwh de los testigos Agua/Agua y Act-Hex/Agua.



Gráfica 4. Frecuencia y distribución de clones *mwh*, obtenidos en los testigos Agua/Agua y Acetona-Hex/ Agua. ★ valores estadísticamente significativos de acuerdo con la Prueba Kolmogorov-Smirnoff ($p < 0.05$).

ANEXO 2

Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en ala.

Se fundamenta en la pérdida de la heterocigosis de los genes marcadores en células de los discos imagales de las larvas transheterocigóticas ($mwh + / + flr$) expuestas a genotóxicos y/o tratamientos agudos o crónicos a diferentes edades (48-92 h), que se expresa con la formación de un clon de células mutantes que después de la metamorfosis se expresan como “manchas” o clones de tricomas en alas de los organismos adultos.

Se utilizan dos marcadores que afectan la apariencia de los tricomas de las alas:

- *multiple wing hairs* (mwh/mwh). Contiene una mutación homocigótica viable localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-0.3), que produce tricomas múltiples en las alas en lugar del tricoma único de la condición silvestre.
- *flare* ($flr^3/TM3, Bd^s$). Se caracteriza por tener una mutación que afecta la forma de los tricomas, localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-38.8) y es letal en homocigosis. Los alelos fl^3 pueden conservarse en las líneas de *D. melanogaster* introduciendo un balaceador con múltiples inversiones y un marcador dominante que es letal en estado homocigótico, y que están presentes en la línea $flr^3/TM3, Bd^s$: “*flare, Three Multiple 3, Beaded-Serrate*”.

Como ya se mencionó anteriormente el daño producido en los discos imagales de la lava es evidenciado en el fenotipo de los tricomas de la cutícula del ala del adulto. Las manchas simples se observan como tricomas múltiples (mwh) o mal formados (flr^3) que pueden indicar delección, mutación puntual y no disyunción. Las manchas gemelas indican recombinación por lo que se observan los dos tipos de marcadores flr y mwh (Graf, 1995).

Estas “manchas” se pueden observar y contabilizar con ayuda del microscopio óptico y analizar por medio de estadísticos, comparando el tipo y frecuencia de manchas en alas de los organismos expuestos contra las obtenidas en los organismos no expuestos (Graf *et.al.* 1984).

Las dimensiones de las manchas dependen del momento de la edad larvaria en que se provocó la mutación o la recombinación y se formó el clon. Por ejemplo cuando se observan clones mwh de manchas grandes, significa que el daño fue e los primeros momentos de diferenciación larval; cuando la frecuencia de estos clones es elevado en manchas pequeñas quiere decir que el daño no fue provocado a temprana edad larval (Graf, 1995).