



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL LICOPENO SOBRE EL 4-NQO
Y H₂O₂ MEDIANTE SMART EN ALA DE *Drosophila
melanogaster*, CRUZA DE BIOACTIVACIÓN ELEVADA**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
BIÓLOGA
PRESENTA:**

VIRIDIANA CISNEROS CARRILLO

**DIRECTORA DE TESIS:
M. EN C. IRMA ELENA DUEÑAS GARCÍA**



LOS REYES IZTACALA ESTADO DE 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.

DEDICATORIAS

A mis padres

Rosa Isela y Antonio: por la confianza que depositaron en mí, por su apoyo en la decisión tan importante de elegir mi Carrera y por darme la fuerza y seguridad para cumplir mis metas. Les agradezco la dedicación y esfuerzo que han puesto para sacar adelante a nuestra familia y por toda su ayuda en esta etapa de mi vida. Sé que siempre han estado, están y estarán apoyándome cuidándome y queriéndome. Este logro es también suyo porque sin ustedes no hubiera sido posible. Los amo.

A mis hermanos

Tony: por estar siempre conmigo y escucharme aunque te aburrieras, por todos los momentos y las risas compartidas. Gracias por dejarme compartir contigo algo de mis conocimientos, se que tú también me enseñarás mucho. Eres una persona muy inteligente, estoy orgullosa de ti, TQM. **Regina:** porque llegaste a esta familia a llenar de luz y alegría con tu presencia, porque a pesar de tu corta edad me ensañas mucho de la vida y me pones a pensar con tus curiosas preguntas, te gusta conocer muchas cosas y espero eso nunca cambie. Siempre serás mi princesa, TQM. Espero que esta tesis les sirva a ambos de aliciente en su vida y que lo tomen como ejemplo para saber que ustedes pueden lograr lo que se propongan.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por la oportunidad de existir, de vivir. Por permitirme llegar a donde me encuentro y hacer posible cada momento.

Leonardo: por la compañía, apoyo y cariño que me has demostrado todos estos años. Porque a lo largo de la Carrera siempre estuviste a mi lado en cada materia, cada proyecto, en cada examen y cada meta cumplida. Por creer en mí, ayudarme a levantar en todas mis caídas y jamás dejarme sola. Eres parte fundamental en la realización de mis sueños. Gracias Elo, por estrechar mi mano y caminar junto a mí, Te amo.

A mis compañeros de carrera y grandes amigos. **Joselin:** por brindarme tu amistad, escucharme y darme palabras de aliento o consejos siempre que los necesité, por tu confianza y apoyo absoluto. Siempre estaremos juntas mi paquetito, TQM. **Angélica:** por todos los momentos tan agradables a tu lado, tu grandiosa bondad y sinceridad, por brindarme tu compañía y apoyo, TQM amiga. **Dalia:** por siempre escucharme y demostrarme que a pesar de las diferencias cuento con tu apoyo y cariño incondicional, TQM amiga. ¡Gracias por esta amistad tan valiosa mis queridas puerquitas! **Alejandra y Vladimir:** por todos los momentos tan divertidos con sus ocurrencias y por siempre hacerme reír hasta en los momentos más estresantes en la Carrera, los Quiero Mucho. **Sergio:** por tu sinceridad, apoyo, confianza y cariño, sé que podré contar contigo siempre, TQM.

Al gran equipo del Laboratorio de Genética Toxicológica. **Andy, Carmen y Noemí:** por los todos los momentos compartidos, las largas charlas mientras trabajábamos y aprendíamos juntas, por el gran equipo que formamos y la bonita amistad que surgió. ¡Gracias Niñas! **M. en C. Irma Dueñas G.:** por la confianza que tuvo en mí desde el inicio hasta el final del proyecto y por ser parte fundamental de mi formación. Le agradezco su apoyo y paciencia para la conclusión de esta Tesis y por todo lo que me permitió aprender de usted. **M. en C. María Eugenia Heres P., M. en C. Laura Castañeda P. y Biol. Luis F. Santos C.:** por su apoyo, consejos, conocimientos y experiencias que me compartieron. Por esa chispa de buen humor que le imprimieron a mi estancia en el laboratorio. Gracias por darme la oportunidad de conocer y ser parte de este grandioso equipo.

A los revisores de tesis. **M. en C. Ramón Moreno:** por su tiempo para la revisión de mi Tesis y enriquecimiento con sus opiniones. **Dra. Ana María García Bores:** por su dedicación en la revisión y su contribución con el curso de Especies Reactivas, que sin duda me ayudó a entender y enriquecer mucho de mi trabajo.

Biól. Víctor Esparza: por abrir un poco más mi panorama de vida, por sus consejos y “jalones de orejas”. Gracias Vic.

Antes pensábamos que nuestro futuro estaba en las estrellas.

Ahora sabemos que está en nuestros genes.

James Watson

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	3
LICOPENO	5
4-NQO	8
METABOLISMO XENOBIÓTICO	11
SMART	13
ANTECEDENTES	18
JUSTIFICACIÓN.....	20
OBJETIVO.....	20
HIPÓTESIS	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
QUÍMICOS	21
PROPAGACIÓN CRUZA Y COLECTA DE HUEVOS DE <i>Drosophila melanogaster</i>	21
PRE-TRATAMIENTOS Y TRATAMIENTOS CRÓNICOS.....	22
PREPARACIONES PERMANENTES Y CONTEO DE CLONES POR INDIVIDUO.....	24
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	25
RESULTADOS.....	26
DISCUSIÓN	34
TESTIGOS	34
INTERACCIÓN LYCO /4-NQO	35
INTERACCIÓN LYCO/H ₂ O ₂	39
CONCLUSIONES	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
APÉNDICE 1.....	53
<i>Drosophila melanogaster</i>	
APÉNDICE 2.....	57
PRUEBA KOLMOGOROV-SMIRNOV	

RESUMEN

En la actualidad se muestra gran interés en los beneficios a la salud que puede tener la ingesta de ciertos alimentos. Las frutas y verduras son fuente de muchos micronutrientes y fitoquímicos con potencial antioxidante; ejemplo de estos es el licopeno, carotenoide característico del jitomate. Debido a su capacidad antioxidante el licopeno ha sido relacionado con la disminución del riesgo de diferentes tipos de cáncer y con reducción del riesgo de daño oxidativo al DNA. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar el posible efecto antígenotóxico del licopeno sobre el efecto genotóxico del 4-NQO y H₂O₂ en SMART en ala de *Drosophila melanogaster* en la crua de bioactivación elevada (CBE). Se realizó la CBE (hembras: Oregon-flare³ X machos: *multiple wing hair*) y se recuperaron larvas de tercer estadio (72 ± 4 h de edad), las cuales se expusieron a pre-tratamientos de 6 h con licopeno (0.45, 0.9, 1.8 μM), acetona-hexano y agua; después se expusieron a tratamientos crónicos durante 42 h con 4-NQO (2 mM), H₂O₂ (20 mM), acetona 2% v/v o agua. Se recuperaron los imagos y se conservaron en alcohol al 70%, se les disectaron las alas y se realizaron preparaciones permanentes. Los resultados mostraron que el licopeno no modificó la tasa de mutación espontánea de *D. melanogaster* ni el daño producido por el 4-NQO en la CBE, lo cual pudo deberse a que en esta crua este carotenoide haya sido metabolizado sin cumplir su función antioxidante. Además el licopeno no modificó la activación del 4-NQO, posiblemente por no ser específico para los CYP450 que metabolizan a este promutágeno. Por otra parte, en esta prueba no se encontró efecto genotóxico del H₂O₂ a la concentración utilizada, sin embargo si hay evidencias de que afectó la división celular de las células de los discos imagales del ala.

Palabras clave: antioxidante, daño oxidativo, licopeno, antígenotóxico, genotóxico, 4-NQO, H₂O₂.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe gran interés en los beneficios a la salud que puede tener la ingesta de ciertos alimentos, ya que la dieta ha sido propuesta como uno de los factores en la etiología y prevención de diversas enfermedades. Alimentos consumidos frecuentemente como las frutas y verduras, han sido centro de una amplia investigación para determinar su influencia contra daños al DNA y el cáncer (Greenwald *et al.*, 2001; Waliszewski y Blasco, 2010).

El proceso de carcinogénesis puede ser entendido como un proceso multifactorial en el que se produce una agregación sucesiva de defectos en el DNA. Dicho daño puede ser detectado por los sistemas de vigilancia celulares que repararán las alteraciones producidas en el material genético o en caso de que ya no exista tal reparación, inducirán el proceso de apoptosis. Si el daño no fuese correctamente reparado se generará una lesión permanente que dará lugar a una célula posiblemente cancerosa (Almendro y Gascón, 2007). Entender cómo los nutrientes y otros factores relacionados con la dieta pueden inhibir daños al DNA y al proceso de carcinogénesis puede resultar esencial para el desarrollo de estrategias eficaces para la prevención del cáncer (Greenwald *et al.*, 2001).

Las dietas ricas en alimentos de origen vegetal con gran variedad de sustancias fitoquímicas de distinta naturaleza (flavonoides, carotenoides, monoterpénos, isotiocinatos y fitoesteroles) se han asociado con numerosos efectos beneficiosos para la salud (Periago *et al.*, 2001). Actualmente se ha mostrado gran interés en la determinación de los múltiples compuestos contenidos en estos alimentos, capaces de modular la señalización molecular y de prevenir un proceso carcinogénico. La mayoría de los estudios realizados, coinciden en que la mayor protección se produce con una alimentación rica en vegetales, frutas y cereales, aunque aún no se ha acabado de determinar, por la gran cantidad que contienen, los compuestos bioactivos que conferirían tal protección (Greenwald *et al.*, 2001).

Algunos micronutrientes contenidos en frutas y verduras tienen potencial antioxidante y hay evidencias que sugieren que estos componentes pueden proteger contra el daño oxidativo a biomoléculas, tales como lípidos, lipoproteínas y DNA. (Greenwald *et al.*, 2001; Ratnam *et al.*, 2006).

Lo anterior es importante porque muchas de las enfermedades descritas que afectan al hombre, como enfermedades cardíacas y cáncer, están asociadas a procesos de oxidación mediados por radicales libres y especies reactivas de oxígeno, y los compuestos con propiedades antioxidantes pueden tener gran efecto en la etiología y prevención de éstas (Ratnam *et al.*, 2006).

Especies Reactivas de Oxígeno

Si bien el oxígeno es imprescindible para el metabolismo y las funciones del organismo, en la actualidad es sabido que posee efectos tóxicos. De manera habitual, el oxígeno molecular se encuentra en su estado basal en lo que se conoce como estado triplete, en la que es poco reactivo; sin embargo, ya sea por reacciones químicas, por acciones enzimáticas o por efecto de las radiaciones ionizantes, se pueden producir una serie de especies químicas, derivadas de éste, capaces de causar múltiples reacciones con otros compuestos presentes en el organismo (Fridowich 1978 en Venereo, 2002).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son una serie de moléculas generadas a través de la reducción parcial del oxígeno molecular (Hernández-García *et al.*, 2010); consecutivas reducciones del O_2 a agua producen las tres ERO principales: superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y por ruptura de este último el radical hidroxil (HO^{\bullet}) (Fridowich, 1978 en Imlay *et al.*, 1988; Halliwell y Gutteridge, 2007).

Tanto el $O_2^{\bullet-}$ como el H_2O_2 son compuestos que reaccionan poco, ambos son tóxicos principalmente porque generan el radical HO^{\bullet} . Se considera que el H_2O_2 es el precursor inmediato del HO^{\bullet} ; cuando el H_2O_2 acepta un electrón de un metal de transición como el Fe^{2+} o el Cu^+ , se fragmenta y forma dicho radical, en lo que se

conoce como reacción de Fenton o Harber-Weiss (Meneghini, 1997; Hansberg, 2002). El HO[•] es una ERO que reacciona prácticamente con cualquier compuesto en el sitio en donde se produce (Hansberg, 2002). Se postula que el H₂O₂, que cruza fácilmente membranas biológicas, puede penetrar hasta el núcleo y reaccionar con iones de hierro o cobre formando el HO[•], el cual reacciona con el DNA y provoca daño (Halliwell y Aruoma, 1991). Las ERO que se producen en cualquier estado fisiológico producen continuamente daño al DNA, las proteínas y los lípidos mediante estrés oxidativo (Hansberg, 2002).

El estrés oxidativo ha sido definido como el desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes, a favor de los oxidantes, que lleva potencialmente a daño celular. Lo anterior puede suceder si las ERO no son adecuadamente removidas, ya sea porque los antioxidantes se agotan y/o si la formación de las ERO aumenta mas allá de la capacidad de éstos (Sies 1991 en Halliwell y Aruoma, 1991).

El estrés oxidativo está implicado en gran variedad de condiciones patológicas incluyendo el cáncer y el envejecimiento. Las lesiones al DNA por efecto de las ERO incluyen modificaciones de bases, sitios abásicos, rompimientos sencillos y dobles, entrecruzamientos, entre otros. Bajos niveles de daño pueden ser reparados eficientemente, pero niveles altos pueden llevar a la célula a apoptosis, mientras que un nivel intermedio de daño está predispuesto a enfermedades malignas (Halliwell y Aruoma, 1991; Halliwell y Gutteridge 2007).

Los sistemas utilizados para provocar condiciones de estrés oxidativo con efecto de estudio del daño provocado, incluyen la adición de concentraciones elevadas de ERO, adición directa de H₂O₂ o de compuestos cuyo metabolismo resulta en el aumento de la generación celular de H₂O₂ y/o O₂^{•-}. Existen diversos estudios, en donde se exponen diferentes tipos de células a diversas concentraciones de H₂O₂ (Palomba *et al.*, 1996; Gärdner *et al.*, 1997; Hampton *et al.*, 1997; Antunes *et al.*, 2001; Barbouti *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003; Scolastici *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2010), pues se utiliza este compuesto como testigo de daño celular.

Lycopeno

Para contrarrestar el daño producido por las ERO y por radicales libres, el organismo tiene ciertas defensas antioxidantes, sin embargo también existen antioxidantes externos que solo se adquieren mediante la ingesta. Entre los compuestos con esta capacidad se encuentran los carotenoides (Halliwell y Gutteridge 2007).

Los carotenoides son un grupo de pigmentos naturales sintetizados en las plantas que en muchos casos son los responsables de los colores amarillos, naranjas y rojos de frutas y verduras (Waliszewski y Blasco, 2010). La importancia médica de estos compuestos se ha centrado en los que tienen una actividad pro-vitamina A, sin embargo existen otros carotenoides, como el licopeno, que han generado gran interés debido a sus propiedades biológicas como antioxidantes (Periago *et al.*, 2001).

El licopeno es un carotenoide característico del jitomate y el principal pigmento responsable de su coloración roja. Es un compuesto lipofílico cuya función, como la de otros carotenoides, es absorber la luz durante la fotosíntesis protegiendo a la planta contra la fotosensibilización (Rao y Agarwal, 1999).

La estructura química de los carotenoides es determinante en sus propiedades físicas, reactividad química y función biológica (Fernández-Ruiz *et al.*, 2007). El licopeno es un carotenoide acíclico, con una cadena alifática formada por cuarenta átomos de carbono, con trece dobles enlaces de los cuales once son conjugados (Figura 1a), lo que le confiere su capacidad antioxidante por ser muy reactivo frente a los radicales libres, y por tanto de capacidad antioxidante (Vitale *et al.*, 2010). El licopeno puede presentarse como isómero *cis* e isómero *trans* aunque su forma natural en las plantas es la configuración *trans* (Figura 1b) (Periago *et al.*, 2001; Bhuvanewari y Nagini, 2005).

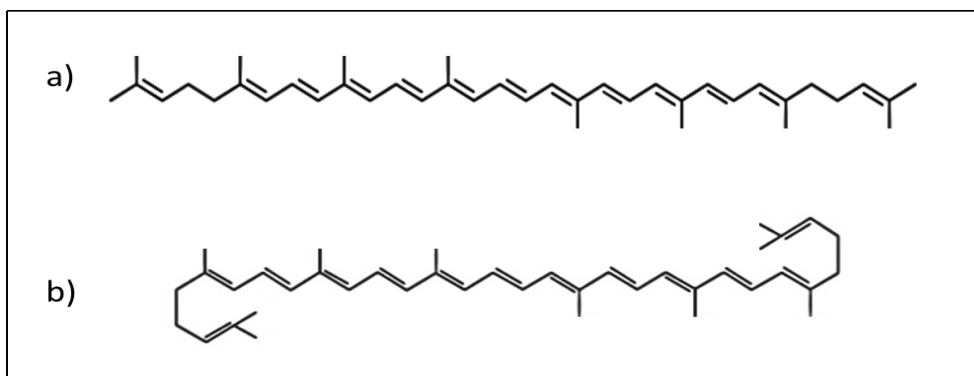


Fig. 1. a) Estructura química del licopeno. b) Estructura de la forma *trans* del licopeno (Woodall *et al.*, 1997).

La principal fuente de licopeno para el hombre es el jitomate, ya que tiene un elevado contenido de este compuesto, comprendiendo de 80 a 90% de los pigmentos presentes en él. Aunque el contenido de licopeno puede variar de acuerdo a la madurez y variedad del jitomate. También existe una amplia gama de productos hechos a base de este fruto (salsas, purés, zumos, sopas concentradas, etc.) que representan una importante fuente de licopeno (Tabla 1), incluso algunos autores han observado una mayor biodisponibilidad de este compuesto en productos procesados. Otras frutas y vegetales que contienen a este carotenoide son el albaricoque, la sandía, la papaya, la guayaba rosa y la toronja (Tabla 1) (Gärtner *et al.*, 1997; Clinton, 1998; Bhuvaneshwari y Nagini, 2005; Waliszewski y Blasco, 2010).

Fuente	Contenido de licopeno ($\mu\text{g/g}$ peso húmedo)
Jitomate fresco	8.8 - 42.0
Jitomate, jugo	50.0 - 116.0
Jitomate, salsa	62.0
Salsa cátsup	99.0-134.4
Salsa para pizza	127.1
Sandía	23.0 - 72.0
Guayaba rosa	54.0
Papaya	20.0 - 53.0

Tabla1.- Contenido de licopeno en varios alimentos
(Rao y Agarwal, 1999)

El licopeno una vez consumido, es incorporado dentro de las micelas de los lípidos de la dieta y absorbido en la mucosa intestinal por difusión pasiva, donde es incorporado a los quilomicrones y liberado al sistema linfático para ser transportado al hígado. El licopeno es transportado por las lipoproteínas dentro del plasma para la distribución a diferentes órganos (Parker, 1988 en Rao y Agarwal, 1999). La distribución de los carotenoides en los distintos tejidos no se realiza en modo uniforme, ya que se cree que existen tejidos específicos en los cuales éstos realizan su acción. Diferentes estudios han detectado la presencia de licopeno principalmente en testículos, glándulas adrenales, hígado y próstata, (Periago *et al.*, 2001; Rao y Agarwal, 1999).

Acerca del metabolismo y degradación del licopeno existen pocos estudios; hasta el momento se sugiere que, *in vivo*, puede sufrir una oxidación que da como resultado epóxidos, que después pueden ser reducidos a 5,6-dihidroxi-5,6dihidro-licopeno, metabolito que se ha encontrado en plasma humano (Khachik *et al.*, 1997 en Clinton, 1998).

El licopeno ha demostrado tener una potente actividad antioxidante; se ha descrito que ésta es tres veces superior a la del la vitamina E (Miller *et al.*, 1996). Al actuar como antioxidante puede atrapar especies reactivas de oxígeno (ERO), reducir el estrés oxidativo y el peligro de oxidación de componentes celulares, incluyendo lípidos, proteínas y DNA (Agarwal y Rao, 2000).

El daño oxidativo a diferentes biomoléculas está implicado en el desarrollo de enfermedades crónicas que afectan al hombre, como las cardiovasculares y el cáncer, por lo que el licopeno como potente antioxidante, puede actuar en la etiología de tales padecimientos. Debido a esto, como ya se ha mencionado, el licopeno ha sido estudiado con el objetivo de relacionarlo con la disminución del riesgo de diferentes tipos de cáncer y otras enfermedades, asimismo de la reducción del daño oxidativo del DNA y de lipoproteínas (Periago *et al.*, 2001).

Además de su principal efecto como antioxidante, se han ido sumando algunos otros mecanismos por los cuales el licopeno pudiera estar actuando, como su participación en la modulación de la comunicación intercelular, modulación de enzimas e incluso en la inducción de apoptosis (Omony y Aluko, 2005; Bramley, 2002).

El potencial de licopeno en la salud humana está empezando a ser reconocido, las principales evidencias de apoyo provienen de tres líneas de investigación: 1) estudios de actividad antiproliferativa en diferentes líneas celulares, 2) estudios de propiedades anti-tumorigénicas en modelos animales y 3) estudios epidemiológicos con poblaciones en riesgo (Rao y Agarwal, 1999).

4-Nitroquinolina-1-Óxido

De la misma manera en que hay productos con efectos quimiopreventivos, existen otros que se ha probado resultan ser estrictamente cancerígenos, uno de estos compuestos es el 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO) (Figura 2). Este compuesto (también conocido como 4NQO, 4Nqo ó NQO) es un potente mutágeno y cancerígeno derivado de quinolina, el cual se obtiene por síntesis química (Kanojia y Vaidya, 2006).

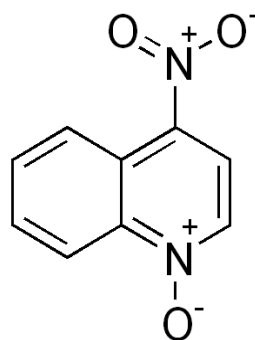


Fig. 2. Estructura molecular del 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO) (Schoop *et al.*, 2009).

El 4-NQO presenta como principal característica la producción de aductos en el DNA; también produce daño oxidativo y rompimientos simples en él. Sin embargo no reacciona directamente con el DNA, debe ser convertido, *in vivo*, en un intermediario activo para que reaccione con el genoma (Sato y Yamamoto, 1972). La acción

cancerígena del 4-NQO es iniciada por la reducción enzimática de éste en su grupo nitro [4-hidroxiquinolina-1-óxido (4HAQO)] (Figura 3), metabolito que está implicado en la formación de aductos (Kanojia y Vaidya, 2006) y que es considerado como principal responsable de su mutagenicidad y toxicidad (Arima *et al.*, 2006).

El 4HAQO puede ser metabolizado y acetilado por la seril-RNA-sintetasa para la forma del complejo seril-4-HAQO. Éste es el producto final capaz de introducir grupos quinolina en las purinas del DNA produciendo los aductos antes mencionados. Experimentos *in vivo* sugieren que el 4HAQO reacciona preferentemente con residuos de guanina. Este compuesto puede reaccionar con la glutatión-S-transferasa (GST) formando el conjugado 4-glutatión-S-quinolina-1-óxido (QO-SG), el cual puede ser expulsado de la célula (Varnes y Biaglow, 1979; Stephan *et al.*, 1978 en Kanojia y Vaidya, 2006).

El 4-NQO también ha mostrado ser un potente inductor de estrés oxidativo intracelular ya que genera ERO así como peróxido de hidrógeno o radicales superóxido. El 4-NQO puede sufrir un ciclo redox y producir ERO; en este ciclo la reducción enzimática de un electrón de los componentes parentales es seguida de una auto oxidación en presencia de oxígeno molecular. Aquí el oxígeno se reducirá a un ion superóxido que pueda conducir a la formación de otras ERO como el peróxido de hidrogeno y radicales hidroxil (Figura 3) (Nunoshiba y Demple, 1993).

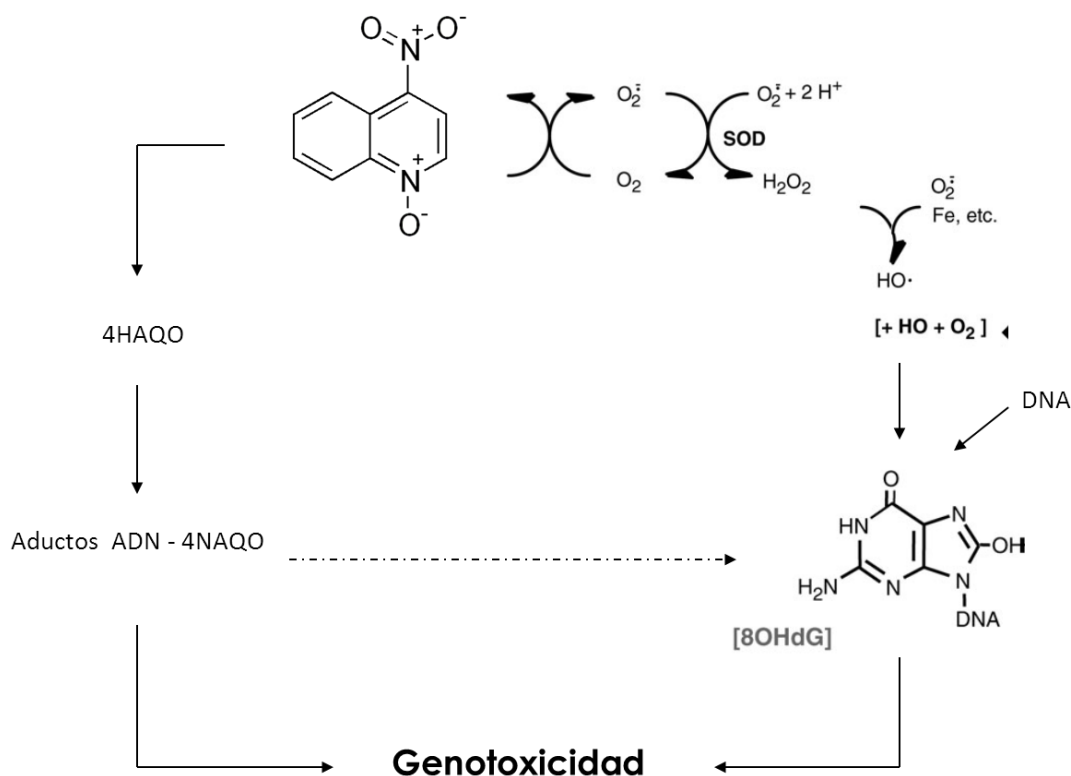


Fig. 3. Activación del 4-NQO (Modificado de Arima *et al.*, 2006).

La capacidad metabólica para la activación del 4-NQO se encuentra ampliamente distribuida entre los procariontes y eucariontes, incluyendo la mayoría de los órganos de los mamíferos relacionados con el metabolismo de xenobióticos (Stanley y Benson, 1988).

Las propiedades cancerígenas y mutagénicas del 4-NQO fueron reportadas por primera vez por Nakahara *et al.* en 1957. Este compuesto era inicialmente utilizado como agente quimioterapéutico, sin embargo ahora se sabe que el 4-NQO es un potente cancerígeno, demostrado en diferentes estudios con microorganismos y animales (Kanojia y Vaidya, 2006). Es un compuesto ampliamente utilizado en estudios que abordan inducción de mutaciones y cáncer en modelos mamíferos (ratón, rata, conejo), principalmente para el estudio de carcinogénesis oral (Vered *et al.*, 2005). También ha sido utilizado como testigo en estudios de genotoxicidad (Heres-Pulido *et al.*, 2004; Scolastici *et al.*, 2007 y Heres-Pulido *et al.*, 2010).

Metabolismo Xenobiótico

El ser humano se encuentra expuesto a un gran número de sustancias exógenas, extrañas al organismo (xenobióticos), tanto de origen natural como sintético, las cuales al entrar al cuerpo por diferentes vías (ingesta, inhalación o simple contacto con la piel) pueden reaccionar y ocasionar fenómenos de toxicidad. Para estas sustancias existen sistemas enzimáticos que llevan a cabo la biotransformación de dichos xenobióticos, lo que se conoce como metabolismo xenobiótico. Éste es esencialmente un mecanismo de desintoxicación, mediante el cual un sustrato exógeno poco soluble en agua se convierte en un metabolito más hidrosoluble lo que facilita su excreción del organismo (Rodríguez, 2004). El metabolismo xenobiótico se divide en dos fases (Figura 3):

- Fase I. Se llevan a cabo diversas reacciones químicas (oxidación, hidrólisis y reducción), mediante las cuales se introducen grupos funcionales o reactivos a las moléculas. Se producen metabolitos que pueden ser eliminados directamente o pueden ser sustrato para las reacciones de la fase II. La fase I es catalizada principalmente por el sistema enzimático de los citocromos P450 (Franklin y Yost, 2000; Rodríguez, 2004).
- Fase II. En esta se da la conjugación de los metabolitos generados en la fase I, con glutatión o algunos aminoácidos como ácido glutámico y glucorónico, en lo cual participan una serie de transferasas, principalmente glutatión-s-transferasa. Estas conjugaciones resultan en metabolitos más solubles en agua, lo que facilita su transporte y eliminación (Franklin y Yost, 2000; Rodríguez, 2004).

Un xenobiótico no necesariamente se metaboliza mediante la combinación secuencial de las reacciones de la fase I seguida por la fase II, para una eliminación eficaz. Puede someterse sólo a la fase I ó sólo a la fase II (Figura 4) y ocasionalmente las reacciones de fase I pueden ser posteriores a la conjugación de fase II (Franklin y Yost, 2000).

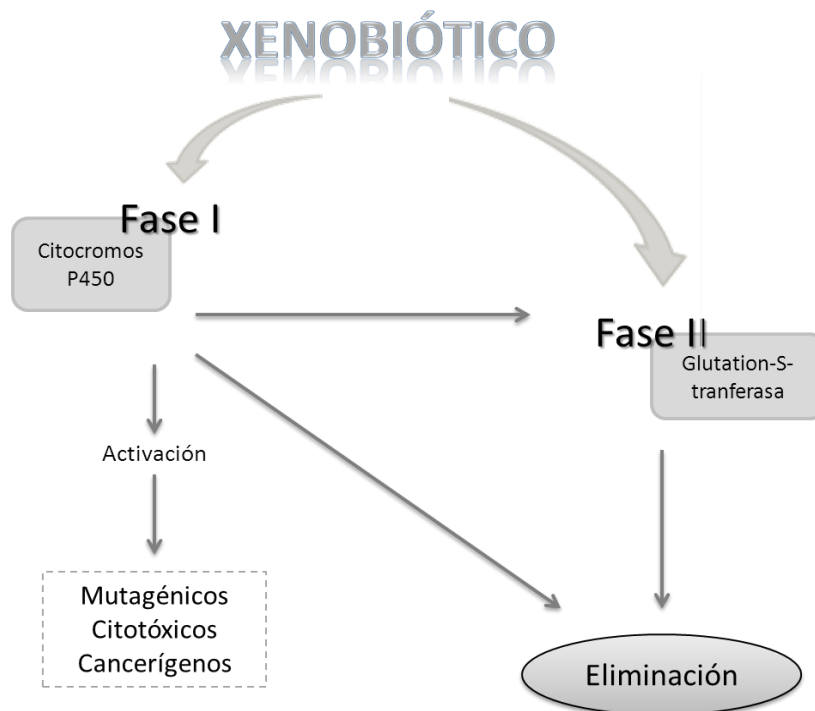


Fig. 4. Fases del metabolismo xenobiótico.

Aunque el objetivo principal de la biotransformación es el de promover la excreción de xenobióticos mediante la formación de éstos en metabolitos o productos solubles, también se sabe que en ocasiones puede ser un proceso de activación de compuestos inicialmente inertes a metabolitos intermedios muy reactivos (Franklin y Yost, 2000; Rodríguez, 2004).

Unas de las principales enzimas implicadas en el metabolismo y degradación de xenobióticos son los citocromos P450 (CYP450), que como ya se mencionó, catalizan las clásicas reacciones de fase I. Los CYP450 constituyen una superfamilia enzimática que se caracteriza por ser hemoproteínas capaces de transportar electrones. Al ser hemoproteínas, poseen una parte proteica y un grupo hemo, donde se localiza un átomo de hierro (Black y Coon 1986 en Santiago *et al.*, 2002). La denominación P-450 es debida a que absorben la luz ultravioleta en presencia de monóxido de carbono en una longitud de onda de 450 nm (Galli y Feijoo 2002; Orellana y Guajardo 2004).

El complejo de CYP450 se encuentra presente en numerosas especies, está altamente distribuido en animales, plantas y protistas (Oinonen y Lindros, 1998; Guengerich, 2006). En la actualidad se conoce una gran variedad de miembros de la superfamilia de CYP450, lo que permite una alta selectividad al momento de oxidar sustratos (Konigsberg 2008). Algunos genes de CYP450 se expresan constitutivamente mientras otros pueden ser inducibles (Denison y Whitlock, 1995).

El mecanismo de acción de los CYP450 consiste en la hidroxilación de un sustrato orgánico RH (sustrato principal) a R-OH a expensas de un átomo de una molécula de oxígeno. El otro átomo es reducido a H₂O por los equivalentes de reducción proporcionados por el NADH o NADPH, habitualmente transferidos al CYP450 directamente o vía citocromo b₅, gracias a una flavoproteína oxidoreductasa (Hollenberg, 1992 en Orellana y Guajardo, 2004).

Como ya se mencionó, la principal función de los CYP450 es mediando reacciones de desintoxicación, sin embargo bajo algunas circunstancias son los responsables de procesos de activación metabólica de ciertos compuestos durante el metabolismo xenobiotico, activación que produce compuestos que pueden llegar a ser cancerígenos, mutagénicos y/o citotóxicos (Denison y Whitlock, 1995). Los CYP450 además de participar en el metabolismo de sustratos de naturaleza exógena como drogas, pesticidas, procarcinógenos, anestésicos, solventes orgánicos, entre muchos otros, también participan en el metabolismo de sustratos endógenos de importancia biológica como el colesterol, los ácidos biliares, las hormonas esteroidales y los ácidos grasos (Capdevila *et al.*, 2002 en Orellana y Guajardo, 2003).

SMART

Para detectar el daño que pueden producir los xenobióticos al DNA, existen diversas pruebas de genotoxicidad tanto *in vitro* como *in vivo*. Una de las pruebas *in vivo* es el ensayo de mutación y recombinación somáticas o SMART, por sus siglas en inglés (*Somatic Mutation and Recombination Test*), en el modelo biológico *Drosophila melanogaster* (Apéndice 1). Este ensayo tiene como fundamento la pérdida de

heterocigocis de marcadores genéticos específicos (Graf *et al.*, 1984) y ha sido ampliamente utilizado en una versión con un marcador del color de ojos y en una versión basada en dos marcadores de las células de las alas. En ambos casos la pérdida de heterocigosis conduce a la expresión de los genes marcadores recesivos, dando lugar a clones de células mutantes que se muestran como un mosaico de manchas en los ojos o en las alas, respectivamente (Spanó *et al.*, 2001).

SMART en ala consiste en la exposición a mutágenos de poblaciones de células de los discos imaginales que originan las alas de *D. melanogaster*, dichas células son destinadas a multiplicarse en configuración relativamente fija, de manera que una mutación inducida en éstas, por la pérdida de heterocigocis de los marcadores genéticos, dará lugar a un clon detectable. Los daños genotóxicos causados en estas células se ven expresados después de la metamorfosis en las alas de los adultos (Graf *et al.*, 1984 y 1989). Los marcadores genéticos utilizados se expresan fenotípicamente en las células del ala, modificando la apariencia de los tricomas.

Los marcadores recesivos utilizados en el ensayo en ala son dos: *multiple wing hairs* (*mwh*) y *flare* (*flr³*) (Graf *et al.*, 1984 y 1989). El marcador *mwh* es una mutación recesiva homocigótica viable, localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3 - 0.3), que en homocigocis se expresa como tricomas múltiples (2-5) por célula (Figura 5b) en lugar del tricoma único (Figura 5a) de la condición silvestre. El marcador *flr³* es una mutación localizada también en el cromosoma 3 (3 - 3.38) que se expresa afectando la forma de los tricomas, observándose como flamas o rosetas de maíz (Figura 5c). De este último marcador se conocen tres alelos que en condición homocigótica son letales, sin embargo esta condición puede conservarse en las líneas de *D. melanogaster* introduciendo un balanceador con múltiples inversiones y un marcador dominante letal en homocigosis (Graf *et al.*, 1998).

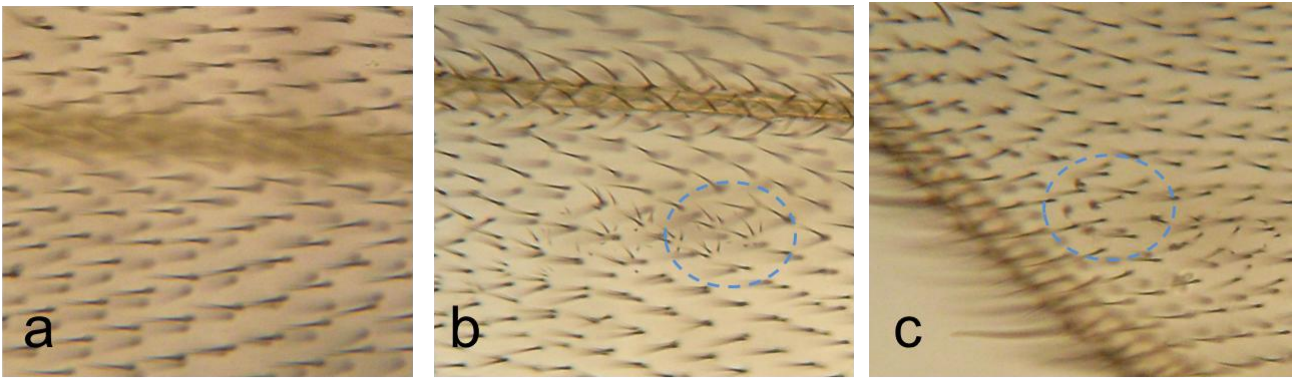


Fig. 5. Expresión fenotípica de los tricomas de las alas de *D. melanogaster*, a) condición silvestre, b) expresión del marcador *mwh*, c) expresión del marcador *flr³*. 40x

Los marcadores *mwh* y *flr³* han sido caracterizados y se mantienen como líneas de *D. melanogaster* que se identifican y nombran por el marcador que tienen. Las líneas son: *multiple wing hair* (*mwh / mwh*) por su marcador distintivo y *flare* (*flr³/TM3, Bd^s*); además de estas dos líneas existe otra muy importante para SMART en ala, la línea Oregon-*flare* [ORR(1); ORR(2); *flr³ / TM3, Bd^s*], la cual fue diseñada por Frölich y Würigler en 1989 con la mutación ORR resistente al DDT, que expresa niveles altos de CYP450. Las líneas *flare* y Oregon-*flare*, además de tener el marcador *flr³* tienen el marcador *Bd^s* el cual se expresa en las alas como muescas en las puntas, estas alas se denominan *Serratia*. El marcador conocido como TM3, también presente en las líneas *flare* y Oregon-*flare*, indica tres inversiones, lo que hace que se elimine la recombinación en meiosis del marcador *flr³*, ya que este marcador en condición de homocigosis es letal (Graf *et al.*, 1995).

Para la prueba SMART se utilizan poblaciones de larvas experimentales que presenten ambos marcadores (*mwh, flr³*), es decir larvas transheterocigotas (*mwh +/+ flr³*) que se obtienen mediante la cruce de las líneas de *D. melanogaster* ya mencionadas. Se realizan dos cruces distintas: la cruce estándar (CE) (hembras *flr³/TM3, Bd^s* y machos *mwh*) y la cruce de bioactivación elevada (CBE) (hembras Oregon-*flr³* y machos *mwh*). Esta última se caracteriza por ser sensible a un número de promutágenos y procancerígenos debido a que contiene altos niveles de CYP450 (Graf *et al.*, 1998; Spanó *et al.*, 2001). Las poblaciones de larvas derivadas de las

cruzas pueden ser sometidas a tratamientos agudos o crónicos, a diferentes edades (48-92 h) y a diferentes agentes genotóxicos (Graf *et al.*, 1984).

Existen diversos mecanismos que conducen a la aparición de los clones de los marcadores genéticos, como son: recombinación, deleción, mutación puntual y no disyunción. La recombinación cercana al centrómero, que envuelve intercambio de los fragmentos cromosómicos que contienen ambos marcadores lleva a la expresión de ambos marcadores en células adyacentes en forma de manchas gemelas; y la recombinación entre el marcador *flr³* y *mwh*, recombinación distal al centrómero, da origen a manchas simples *mwh*. El cambio de un alelo de tipo silvestre (mutación puntual) y la pérdida de un fragmento pequeño o extenso del cromosoma que involucre al alelo silvestre (deleción) originan manchas de tipo simple *mwh* o *flr³*, mientras que la pérdida de un cromosoma (no disyunción) que contenga al alelo silvestre dará como resultado manchas simples y pequeñas (1-2 células) *mwh* (Figura 6). Las manchas simples de cualquier tipo pueden ser pequeñas o grandes de acuerdo con el momento en el que ocurra el daño (Graf *et al.*, 1984; Frei *et al.* 1992 en Heres-Pulido, 2010).

Las células somáticas de *D. melanogaster* ofrecen la posibilidad de desarrollar ensayos de lapsos cortos rápidos y flexibles, capaces de detectar un gran espectro de agentes genotóxicos (Würgler and Vogel 1986, en Graf *et al.*, 1989). SMART ha demostrado gran eficacia y amplia capacidad de evaluación de los diversos tipos de agentes genotóxicos, desde compuestos de origen natural hasta compuestos sintéticos y diversos medicamentos. Este ensayo de genotoxicidad se encuentra validado con un gran número de agentes químicos y mezclas complejas y además está bien adaptado para poder realizar estudios de antigenotoxicidad (Graf *et al.*, 1989; Graf *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 1999; Spanó *et al.*, 2001).

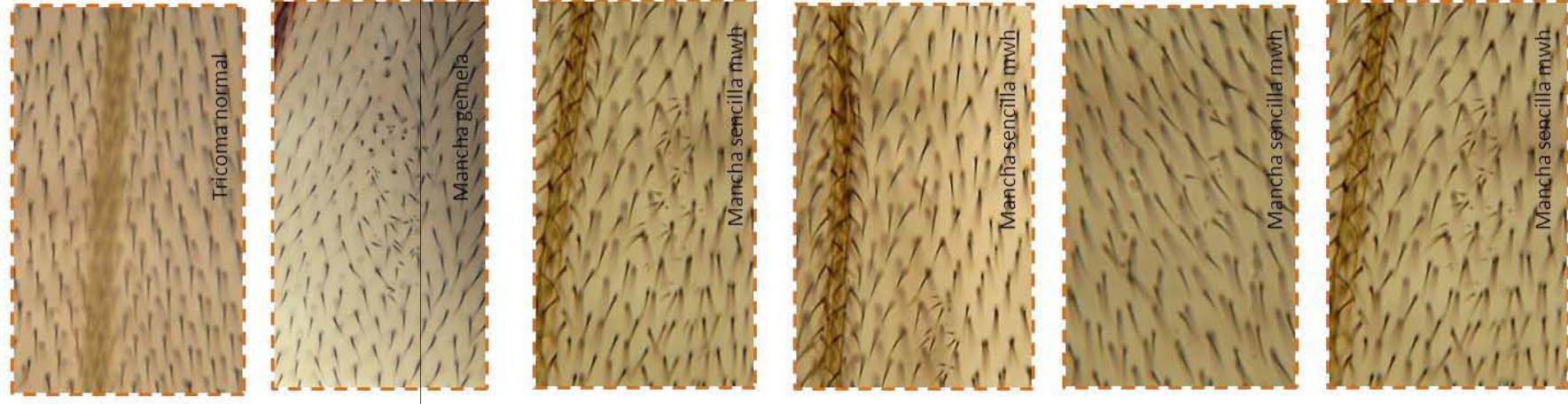
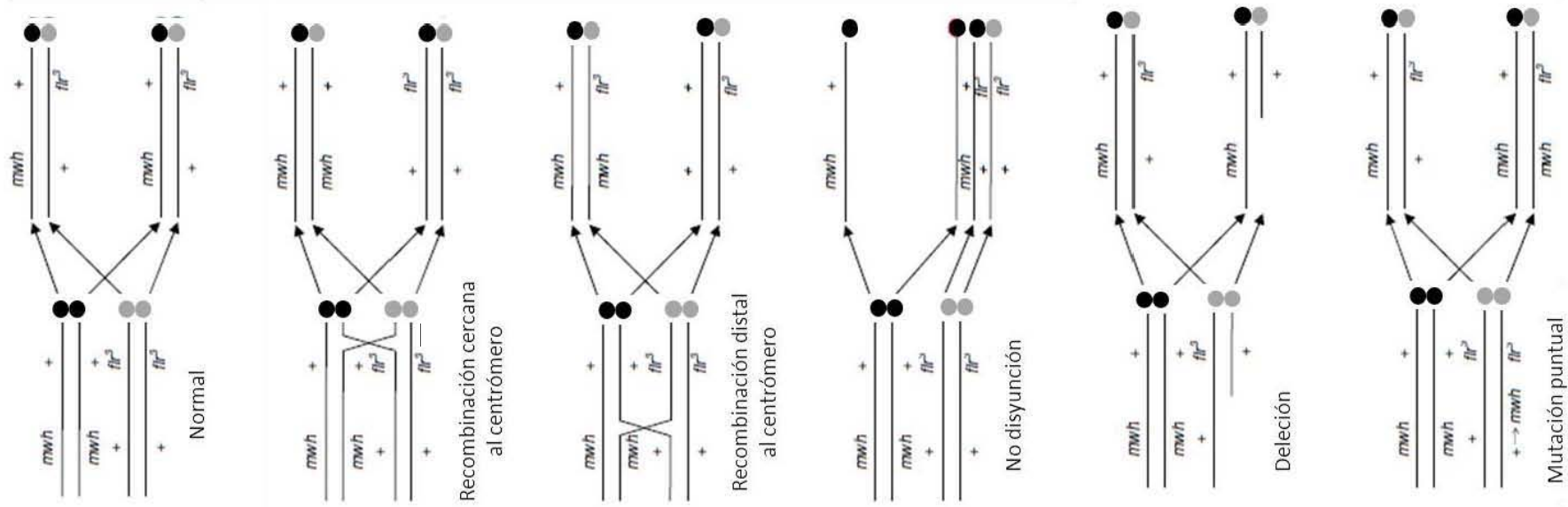


Fig. 6.- Eventos que conducen a la aparición de clones o manchas de los marcadores *mwh* y *flr³*

ANTECEDENTES

Diversos estudios se han realizado para comprobar el efecto antioxidante del licopeno en diversos modelos biológicos en los que esta actividad se confirma. Di Mascio et al. (1989) midieron la capacidad antioxidante de diferentes carotenoides en solución, mientras que Woodall et al. (1997) estudiaron la reactividad de una amplia gama de éstos compuestos con agentes oxidantes en solución orgánica, incluyendo en ambos trabajos al licopeno y encontraron que éste fue el más potente como antioxidante. Yeh y Hu (2000) evaluaron el efecto antioxidante y pro oxidante del licopeno en comparación con el β -caroteno, en células humanas con fibroblastos, y concluyeron que el licopeno puede ser tanto un antioxidante como un pro oxidante dependiendo del oxidante usado y que se comporta muy similar al β -caroteno.

El efecto del licopeno se ha evaluado en distintos tipos de células cancerosas. Pastori *et al.* (1998) evaluaron si el licopeno solo o en combinación con α -tocoferol afectaron el desarrollo de dos líneas celulares de cáncer de próstata. Estos autores encontraron que inhibió el desarrollo celular, tanto solo como en combinación. Fornelli *et al.* (2007) estudiaron la influencia del licopeno en la proliferación de la línea de células humanas de cáncer de mama y los datos indicaron un efecto inhibitorio por parte del licopeno.

También se ha estudiado el efecto benéfico del licopeno como antígenotóxico. Scolastici *et al.* (2007) investigaron mediante los ensayos del cometa y de micronúcleos, el efecto antígenotóxico del licopeno en células de ovario de hámster tratadas con H_2O_2 , metil metanosulfonato ó 4-NQO, encontrando que el licopeno reduce la frecuencia en la aparición de micronucleos inducidas por los tres mutágenos, encontraron resultados similares con el ensayo cometa. Lo anterior confirma la actividad quimiopreventiva del licopeno. Postulan también que el licopeno fue efectivo contra las lesiones por estrés oxidativo y alquilaciones inducidas por el 4-NQO. En otro estudio posterior, Scolastici et al. (2008) investigaron la actividad del licopeno en el daño al DNA inducido por H_2O_2 y N-nitrosodietilamina (N-DEA), en

células humanas de hepatoma. En este estudio, los autores también encontraron reducción en la genotoxicidad de ambos mutágenos.

Por otra parte Mure y Rossman (2001) demostraron que el licopeno actúa como antimutagénico al reducir la tasa de mutación espontánea de diferentes líneas celulares. Kong et al. (2010) evaluaron el efecto del licopeno extraído de guayaba rosa, sobre el daño producido al DNA por H₂O₂ en una línea celular de hígado humano y encontraron que la suplementación con licopeno previene significativamente la destrucción celular provocada por las ERO producidas por el H₂O₂.

Erdman et al. (2009), mediante una revisión de los diferentes efectos del licopeno, sugieren que la capacidad antioxidante de dicho compuesto no es el principal mecanismo de acción de éste *in vivo*, y que los metabolitos de este compuesto podrían ser mas bioactivos que el compuesto inicial. Breinholt et al. (2000) investigaron el efecto del licopeno en un rango de enzimas que metabolizan drogas, administrando este carotenoide a ratas, y encontraron que induce enzimas de fase I del metabolismo xenobiótico. Por otra parte Tang et al. (2007) evaluaron la modulación de un extracto de licopeno contra los efectos tóxicos y la activación metabólica de la aflatoxina AFB1 en un modelo *in vivo* con ratas, en donde los resultados mostraron que este compuesto moduló la activación de la aflatoxina, encontrando que los pre-tratamientos con tal carotenoide bloquearon el metabolismo de la Fase I de la AFB1, probablemente inhibiendo enzimas de esta fase e indujeron enzimas de fase II. Además no encontraron una reducción en los niveles de 8-OHdG, marcador del daño oxidativo al DNA.

JUSTIFICACIÓN

El realizar estudios que nos indiquen que algunos nutrientes pueden prevenir algunas enfermedades e inhibir procesos cancerosos y que indiquen las interacciones gen-nutriente es un área que se muestra prometedora como una manera de progresar en la reducción del riesgo de diversos padecimientos y del cáncer. Aunado a esto la existencia de alimentos en la dieta, como frutas y verduras con posible efecto antígenotóxico, hace que resulte de gran importancia el estudio de la actividad de cada componente ingerido. Debido a lo anterior el presente estudio pretende evaluar la actividad del licopeno, componente del jitomate y compuesto presente en la alimentación, sobre un genotóxico comprobado y un compuesto que genera daño oxidativo por la generación de radicales libres, para contribuir al conocimiento de los efectos de este carotenoide.

OBJETIVO

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de licopeno (0.45, 0.9, 1.8 μM) sobre el daño genotóxico del pro-mutágeno 4-NQO y del daño por H_2O_2 en SMART en ala de *D. melanogaster*, en la crusa de bioactivación elevada.

HIPÓTESIS

Debido a que el licopeno ha mostrado efecto antioxidante, antimutagénico, anticancerígeno y un efecto sobre las fases del metabolismo xenobiótico; se espera que reduzca la frecuencia de los clones en las alas de *D. melanogaster* provocadas por el pro-mutágeno 4-NQO y el H_2O_2 .

MATERIALES Y MÉTODOS

Químicos

Lycopeno (LYCO) (CAS 502-68-8 pureza $\geq 90\%$), 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO) (CAS No. 56-57-5, 97% de pureza), peróxido de hidrogeno (H_2O_2) (CAS 7722-84-1, pureza 32%) y acetona (CAS 67-64-1, pureza 99.9%) obtenidos de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA); hexano (CAS 110-54-3, 60-66 %, grado HPLC) de Burdick & Jackson; Entellan® de Merck (Darmstadt, Germany) y el Medio Instantáneo Carolina (DIM) de Carolina Biological Supply Co. (Burlington, North Carolina, EUA).

El LYCO (1 mg) se disolvió en 50 mL de acetona al 2% v/v agregando 200 μ L de hexano (acetona-hexano) para mejor disolución, quedando a una concentración de 20 μ g/mL (solución stock), se almacenó en alícuotas en una atmósfera de nitrógeno a $-70^\circ C$ y se manipuló en condiciones de oscuridad con lámpara de luz roja, en un cuarto frío a $2^\circ C$, para evitar su fotólisis y oxidación hasta su utilización. Las alícuotas con la solución stock de LYCO se disolvieron en acetona 2% hasta obtener las concentraciones 0.45, 0.9 y 1.8 μ M. El 4-NQO se disolvió en acetona 2% para obtener la concentración de 2 mM y el H_2O_2 en agua MiliQ para la concentración de 20 mM.

Propagación, cruce y colecta de huevos de *D. melanogaster*

Las líneas Oregon-*flare*³ [ORR(1);ORR(2);*flr*³/ *TM3*, *Bd*^f] y *multiple wing hair* (*mwh/mwh*) de *D. melanogaster* se propagaron y mantuvieron a 25 °C con 60% de humedad, en frascos de vidrio estériles de 250 mL con 5 g de hojuelas de puré de papa Magii® y 20 mL de solución conservadora (Dueñas *et al.*, 2002).

La cruce de bioactivación elevada (CBE) se realizó con hembras: Oregon-*flare*³ y machos: *multiple wing hair*. Dicha cruce tiene niveles de expresión altos de CYP450, lo que facilita la detección de pro-mutágenos. Se colectaron los huevos en frascos de vidrio con levadura activada durante 8 h, en oscuridad a 25 °C y 60% de humedad.

Posterior al tiempo de colecta los individuos se retiraron del frasco y éste se mantuvo en las mismas condiciones hasta la eclosión de larvas. Después de tres días, se recuperaron las larvas de tercer estadio (72 ± 4 h de edad) diluyendo el medio con agua a 25 °C en un colador metálico de malla fina.

Pre-tratamientos y tratamientos crónicos

Las larvas obtenidas se expusieron a pre-tratamientos de 6 h y tratamientos crónicos de 42 h (Figura 7), periodos establecidos aprovechando el ciclo vital de *D. melanogaster* (Graf *et al.*, 1984). Los pre-tratamientos fueron con LYCO (0.45, 0.9, 1.8 μ M); acetona-hexano como testigo solvente y agua (calidad miliQ) como testigo negativo (Tabla 2), que se realizaron en tubos con fondo de tela de malla fina que contenían 1 g de DIM molido, los cuales se sumergieron en vasos de precipitados con 18 mL de cada una de las soluciones (Figura 8a). Éstos se incubaron a 25 °C durante 6 h, se mantuvieron en condiciones de obscuridad manipulando bajo una lámpara de luz roja (15 W) y se forraron con papel aluminio. Después se recuperaron las larvas (78 ± 4 h de edad) y se trasvasaron, para ser expuestas a los tratamientos crónicos durante 42 h, colocándose en tubos con 0.5 g de DIM y 2 mL de las soluciones de 4-NQO (2 mM); H₂O₂ (20 mM) como testigo oxidante; acetona 2% v/v y agua como testigos negativos (Tabla 2 y Figura 8b). Se realizaron tres experimentos independientes con tres réplicas por tratamiento crónico.

Pre-tratamiento (6 h)	Tratamiento crónico (42 h)
LYCO 0.45 μ M	Acetona 2% v/v
	4-NQO 2 mM
	H ₂ O ₂ 20 mM
LYCO 0.9 μ M	Acetona 2% v/v
	4-NQO 2 mM
	H ₂ O ₂ 20 mM
LYCO 1.8 μ M	Acetona 2% v/v
	4-NQO 2 mM
	H ₂ O ₂ 20 mM
Acetona-hexano	Acetona 2% v/v
	4-NQO 2 mM
	H ₂ O ₂ 20 mM
Agua	H ₂ O ₂ 20 mM
	Agua

Tabla 2. Diseño experimental

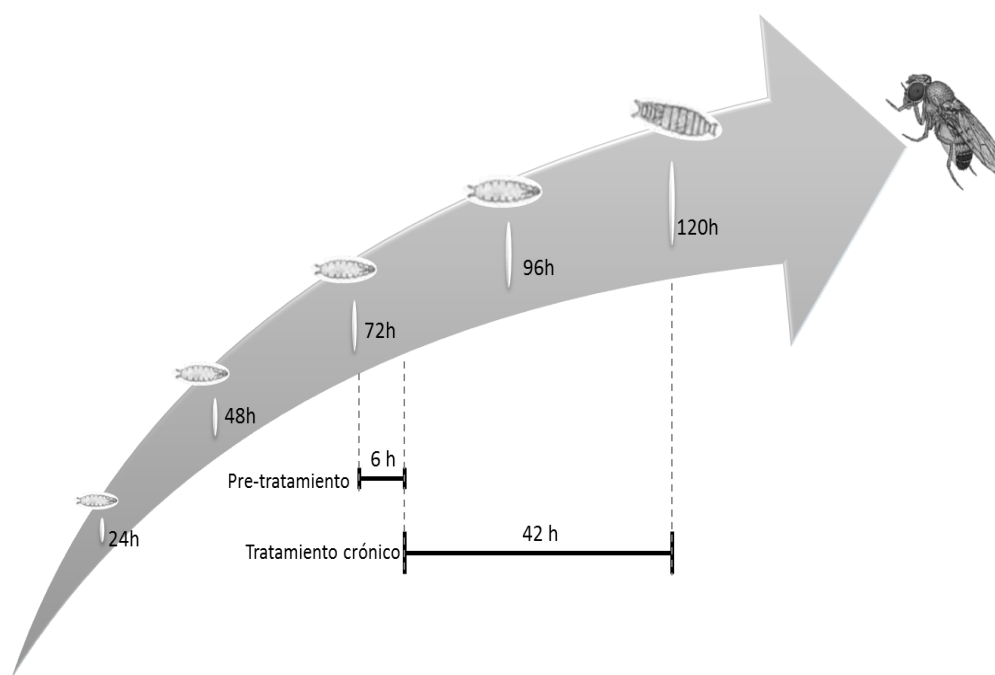


Fig. 7. Periodos de exposición para los pre-tratamientos y tratamientos crónicos de acuerdo con el ciclo vital de *D. melanogaster*.

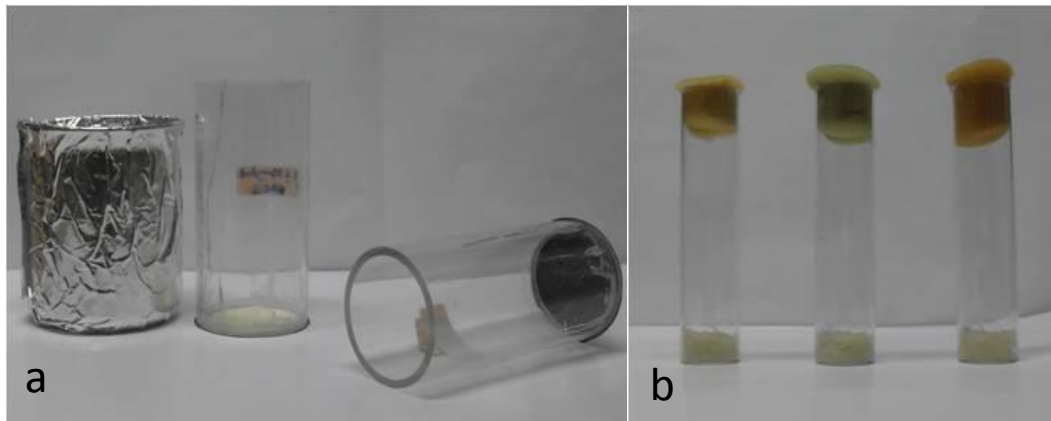


Fig. 8. a) Tubos con fondo de tela permeable y vasos de precipitados para pre-tratamientos. b) Tubos para tratamientos crónicos.

Preparaciones Permanentes y Conteo de Clones por Individuo

Se recuperaron los imagos y se conservaron en viales con alcohol al 70%. Posteriormente se seleccionaron de 56 a 62 individuos por tratamiento (Frei y Würgler, 1995) con alas de fenotipo silvestre (genotipo *mwh +/+ flr³*), cuidando que fuera la misma proporción de hembras y machos, a los cuales se les disectaron las alas y se realizaron preparaciones permanentes de éstas, utilizando Entellan® (Figura 9).

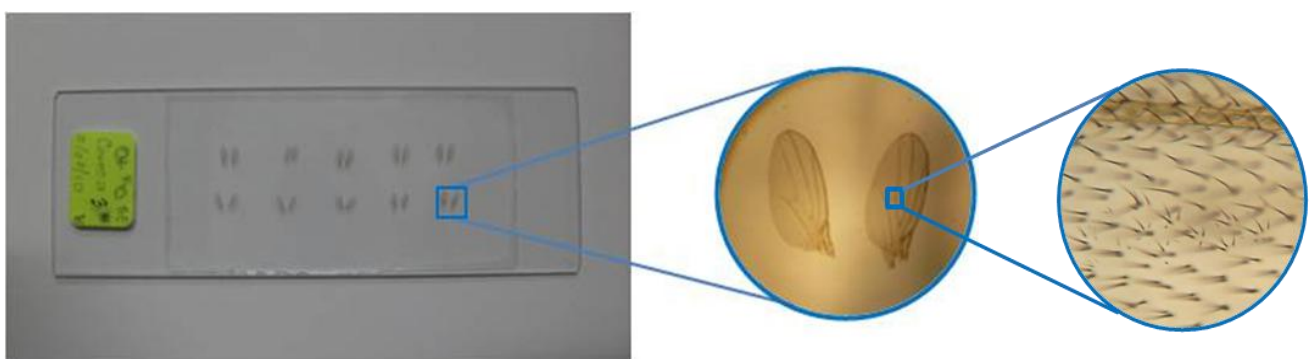


Fig. 9. Preparaciones permanentes de las alas de *D. melanogaster*.

Las preparaciones se revisaron observando las dos superficies de cada ala en el microscopio óptico (40x) y se registró el número y tipo de manchas o clones (*flr³* ó

mwh) para conocer la frecuencia y tamaño (pequeños, grandes, sencillos o gemelos) de los clones por individuo (Graf *et al.*, 1984). Esta revisión se realizó bajo un estricto control a "doble ciego" para no perjudicar el conteo de los clones.

Análisis Estadísticos

Los datos obtenidos se procesaron con el programa estadístico SMART para PC versión 2.0 (Frei y Würzler, 1988). Los resultados débiles positivos (w) e indecisos (i) fueron analizados con la prueba no paramétrica de U de Mann, Whitney y Wilcoxon, con el programa Stat graphic versión 6.0. El análisis de las distribuciones del tamaño de los clones *mwh* se realizó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

RESULTADOS

Tabla 3. Resumen de los resultados obtenidos con SMART en ala de *D. melanogaster*.

Pre-tratamiento / Tratamiento crónico	Número de individuos	Frecuencia (número de clones) diagnóstico estadístico*/**												
		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>				
A. Testigos negativos														
Agua / agua	60	0.48	(29)		0.10	(6)		0.0	(0)		0.58	(35)		35
Acetona-hexano / acetona	60	0.48	(29)	-	0.12	(7)	-	0.0	(0)	-	0.60	(36)	-	36
Acetona-hexano / agua	60	0.32	(19)	-	0.07	(4)	-	0.0	(0)	-	0.38	(23)	-	22
B. Testigo positivo														
Acetona-hexano / acetona	60	0.48	(29)		0.12	(7)		0.0	(0)		0.60	(36)		36
Acetona-hexano / 4-NQO 2 mM	56	1.04	(58)	+	1.07	(60)	+	0.0	(0)	-	2.11	(118)	+	116
B'														
Acetona-hexano / agua	60	0.32	(19)		0.07	(4)		0.0	(0)		0.38	(23)		22
Acetona-hexano / H ₂ O ₂ 20 mM	60	0.22	(13)	-	0.03	(2)	-	0.0	(0)	-	0.25	(15)	-	15
C. Testigos LYCO/acetona														
Acetona-hexano / acetona	60	0.48	(29)		0.12	(7)		0.0	(0)		0.60	(36)		36
LYCO 0.45 µM / acetona	60	0.47	(28)	-	0.08	(5)	-	0.02	(1)	i/ns	0.57	(34)	-	34
LYCO 0.9 µM / acetona	58	0.64	(37)	i/ns	0.12	(7)	-	0.0	(0)	-	0.76	(44)	-	42
LYCO 1.8 µM / acetona	60	0.38	(23)	-	0.10	(6)	-	0.0	(0)	-	0.48	(29)	-	29
D. Tratamientos LYCO / 4-NQO 2 mM														
Acetona-hexano / 4-NQO	56	1.04	(58)		1.07	(60)		0.0	(0)		2.11	(118)		116
LYCO 0.5 µM / 4-NQO	58	1.26	(73)	-	1.07	(62)	-	0.05	(3)	i/ns	2.38	(138)	-	138
LYCO 0.9 µM / 4-NQO	60	1.42	(85)	i/ns	1.23	(74)	-	0.0	(0)	-	2.65	(159)	-	158
LYCO 1.8 µM / 4-NQO	58	0.97	(56)	-	1.14	(66)	-	0.0	(0)	-	2.10	(122)	-	122
E. Testigos LYCO / Agua miliQ														
Acetona-hexano / agua	60	0.32	(19)		0.07	(4)		0.0	(0)		0.38	(23)		22
LYCO 0.5 µM / agua	60	0.28	(17)	-	0.07	(4)	-	0.0	(0)	-	0.35	(21)	-	21
LYCO 0.9 µM / agua	60	0.25	(15)	-	0.05	(3)	-	0.0	(0)	-	0.30	(18)	-	18
LYCO 1.8 µM / agua	60	0.30	(18)	-	0.08	(5)	-	0.0	(0)	-	0.38	(23)	-	23
F. Tratamientos LYCO / H₂O₂ 20 mM														
Acetona-hexano / H ₂ O ₂	60	0.22	(13)		0.03	(2)		0.0	(0)		0.25	(15)		15
LYCO 0.5 µM / H ₂ O ₂	62	0.52	(32)	+	0.10	(6)	i/ns	0.02	(1)	i/ns	0.63	(39)	+	39
LYCO 0.9 µM / H ₂ O ₂	60	0.40	(24)	+	0.07	(4)	i/ns	0.0	(0)	-	0.47	(28)	+	28
LYCO 1.8 µM / H ₂ O ₂	60	0.30	(18)	i/ns	0.12	(7)	i/ns	0.02	(1)	i/ns	0.43	(26)	i/ns	26

* Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei Würigler (1988) comparados con el testigo correspondiente: positivo= +; negativo= -; indeciso= i (α y β=0.05). ** Diagnóstico estadístico con prueba de U (Mann, Whitney y Wilcoxon de acuerdo a Frei y Würigler 1995) modificado para una cola: no significativo= ns; (P < 0.05).

En la Tabla 3 se muestra el resumen de los resultados obtenidos en la prueba SMART para los testigos positivos, negativos y para los diferentes pre-tratamientos con LYCO.

La comparación de la frecuencia de clones por individuo de los testigos acetona-hexano/acetona y acetona-hexano/agua con respecto a la del testigo agua/agua no mostró diferencias significativas, encontrando frecuencias muy similares en todos los tipos de manchas para estos testigos (Tabla 3A y Figura 10). Sin embargo la distribución del tamaño de los clones del testigo acetona-hexano/agua se mostró significativamente diferente con respecto a la distribución del testigo agua/agua, mientras que la del testigo acetona-hexano/acetona fue semejante a la del testigo agua/agua (Figura 11).

La comparación del testigo positivo acetona-hexano/4-NQO contra acetona-hexano/acetona dio el diagnóstico positivo esperado, encontrando un aumento significativo en la frecuencia de los clones pequeños, grandes y totales (Tabla 3B, Figura 12), y significativamente diferente en la distribución del tamaño de los clones (Figura 13). En el testigo acetona-hexano/H₂O₂ comparado contra el testigo acetona-hexano/agua no hubo diferencia significativa en ninguno de los tipos de clones (Tabla 3B' y Figura 12), sin embargo en la distribución del tamaño de los clones sí se encontró una diferencia significativa (Figura 13).

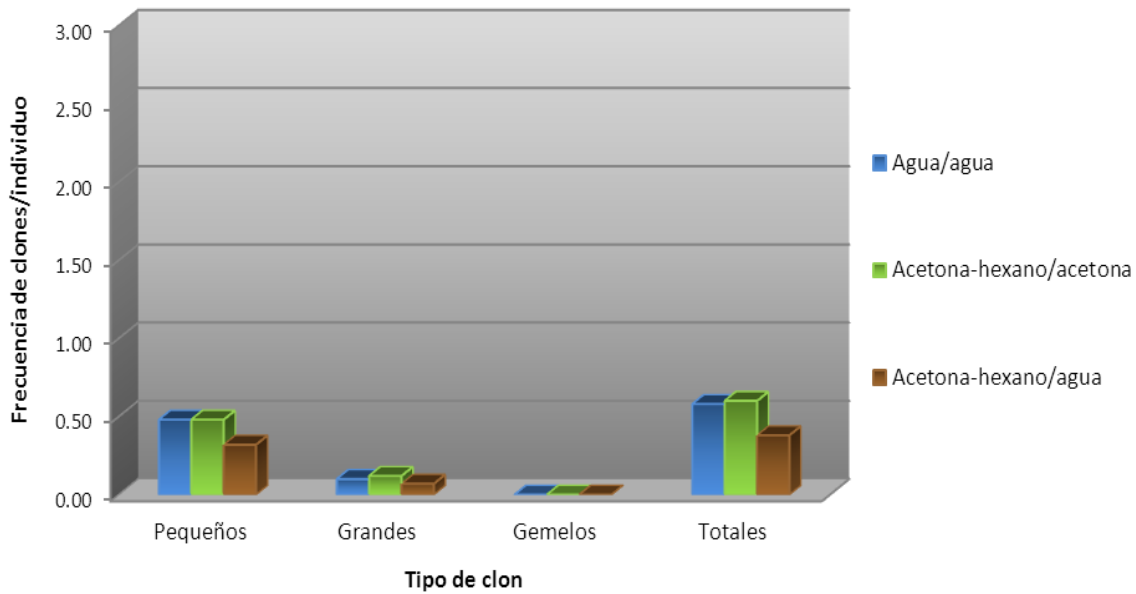


Fig. 10. Frecuencia de clones pequeños, grandes gemelos y totales por individuo de los testigos negativos. No se encontraron diferencias significativas entre estos tratamientos y el testigo.

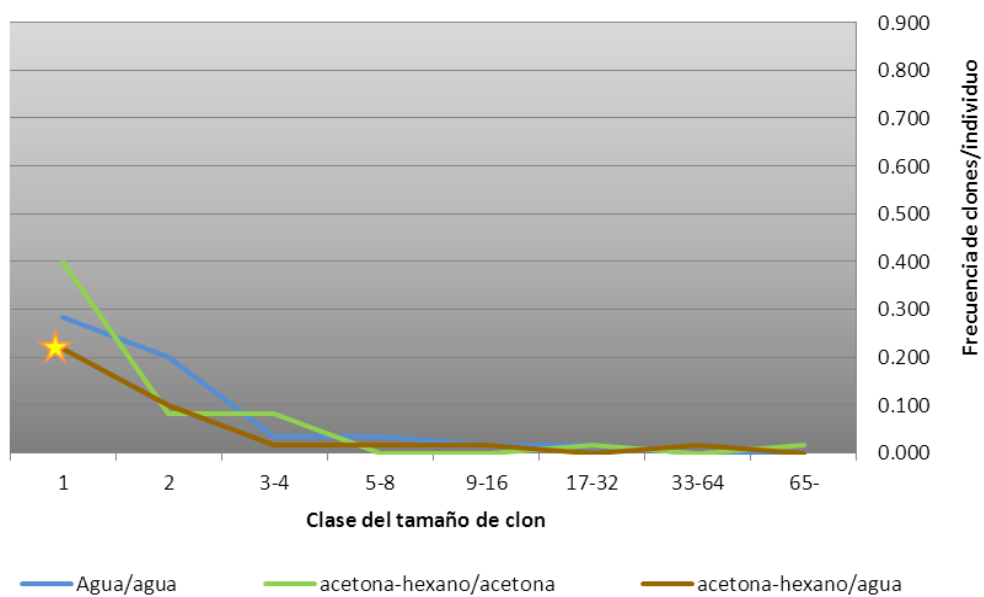



Fig. 11. Distribución del tamaño de clon de los testigos negativos. Donde  indica diferencia significativa con respecto a su testigo.

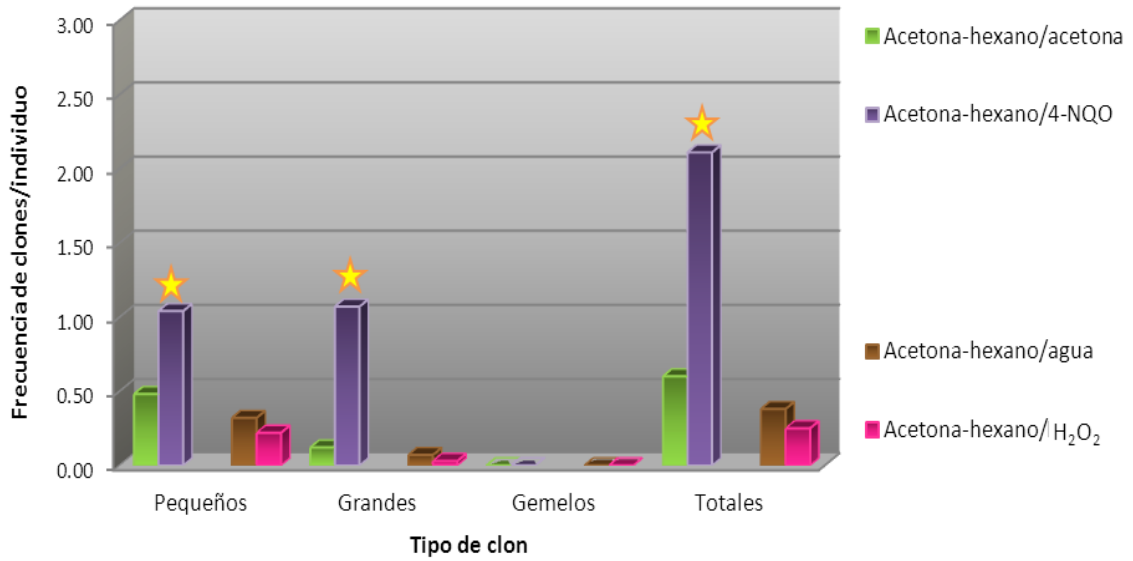


Fig. 12. Frecuencia de clones pequeños, grandes gemelos y totales por individuo de los testigos positivos de pre-tratamiento de acetona (2%) con tratamiento crónico de 4-NQO (2 mM) ó H₂O₂ (20 mM), comparados con su respectivo control. Donde ★ indica diferencia significativa con respecto a su testigo.

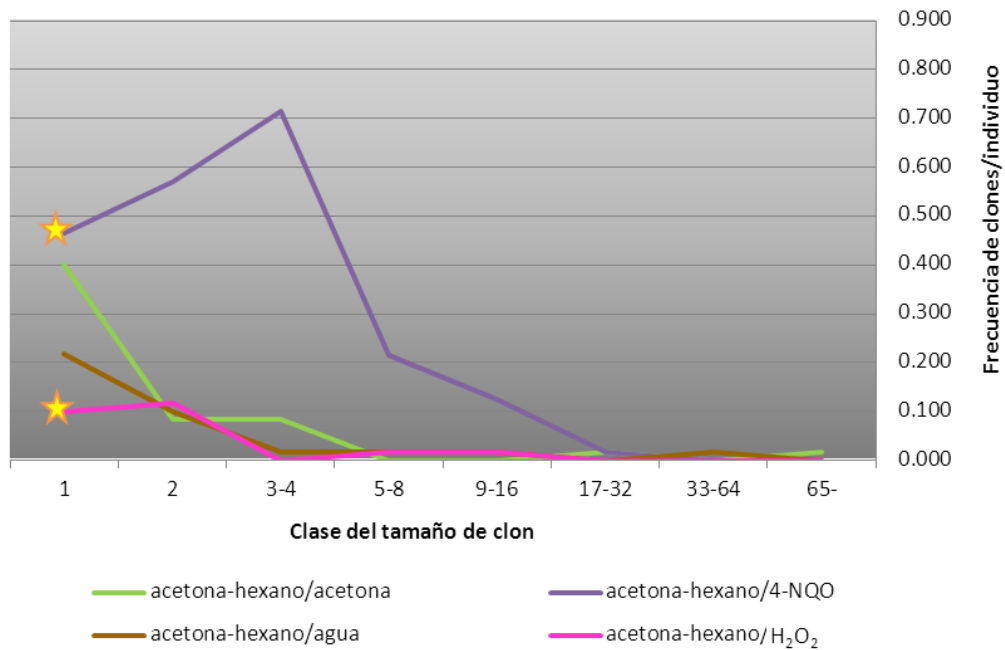


Fig. 13. Distribución del tamaño de clon de los testigos positivos de pre-tratamiento de acetona (2%) con tratamiento crónico de 4-NQO (2 mM) ó H₂O₂ (20 mM), comparados con su respectivo control.

Donde ★ indica diferencia significativa con respecto a su testigo.

Las frecuencias de clones obtenidas al utilizar LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μM)/acetona, no mostraron diferencias significativas con respecto a las obtenidas en el testigo acetona-hexano/acetona (Tabla 3C y Figura 14), sin embargo sí hubo diferencia significativa en la distribución del tamaño de los clones de estos tratamientos, mostrando que el pre-tratamiento de LYCO afectó la división celular (Figura 15). De igual forma, al comparar las frecuencias obtenidas en LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μM)/4-NQO contra las del control acetona-hexano/4-NQO, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tipos de clones (Tabla 3D y Figura 14), pero se encontraron diferencias significativas en la distribución del tamaño de los clones de LYCO (0.9 μM)/4-NQO en comparación con su testigo, indicando que el pre-tratamiento de licopeno influyó en el efecto genotóxico del 4-NQO (Figura 16).

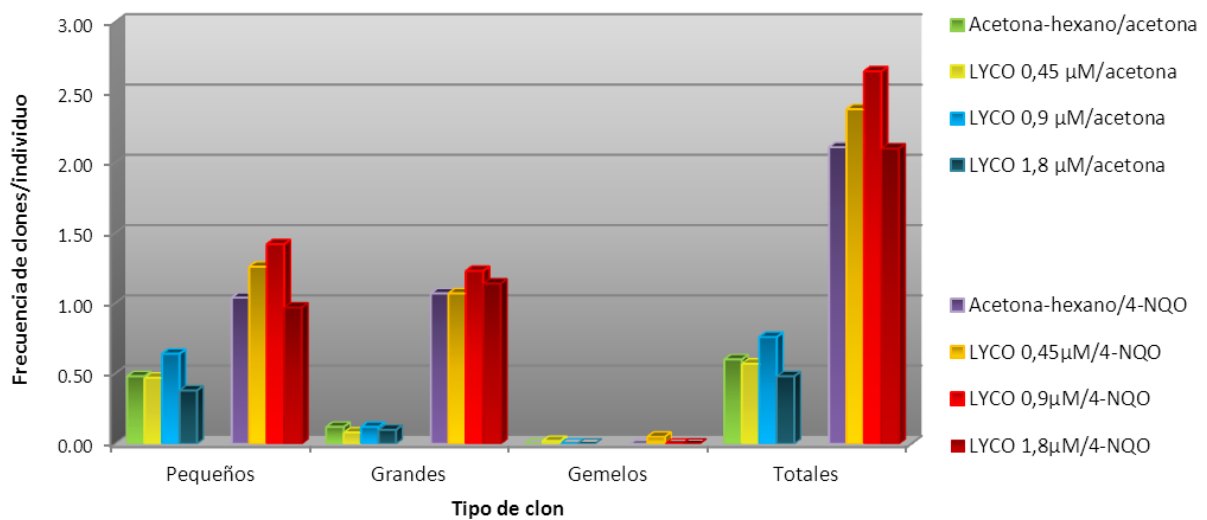


Fig. 14. Frecuencia de clones pequeños, grandes gemelos y totales por individuo, en los pre-tratamientos de LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μM) con tratamiento crónicos de acetona (2%) ó 4-NQO (2 mM), comparados con su respectivo testigo.

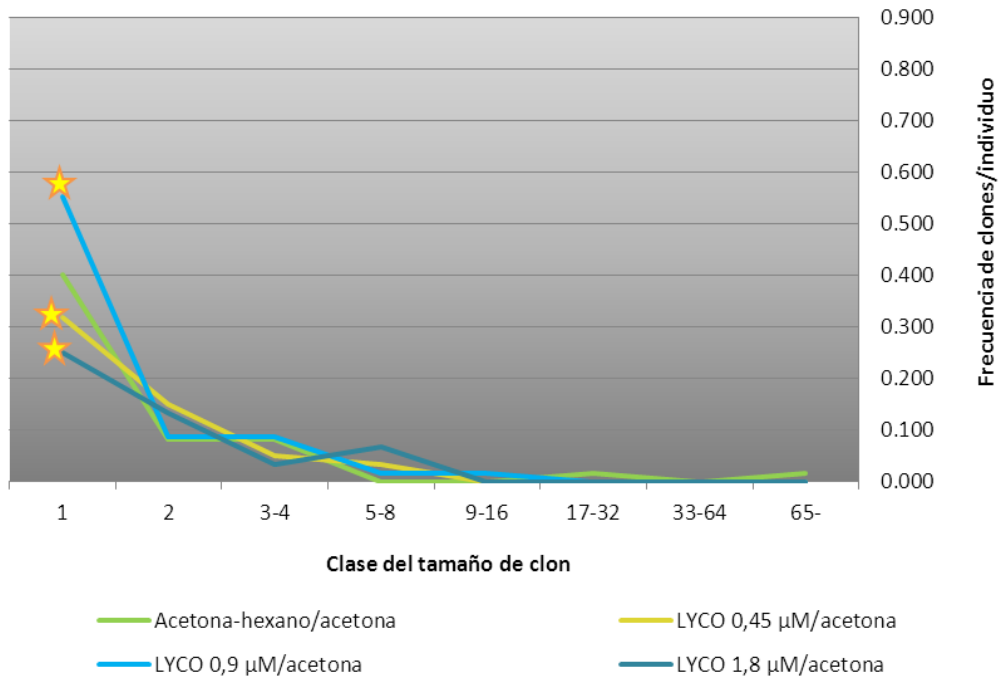


Fig. 15. Distribución del tamaño de clon de los pre-tratamientos de LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μM) con tratamiento crónico de acetona (2%). Donde \star indica diferencia significativa con respecto a su testigo.

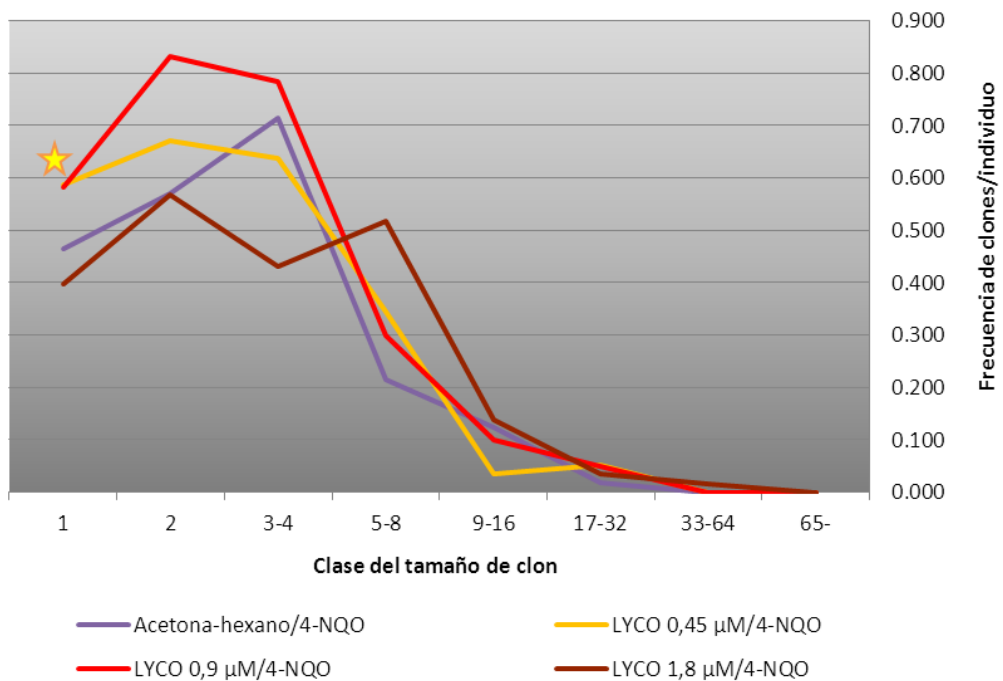


Fig. 16. Distribución del tamaño de clon de los pre-tratamientos de LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μM) con tratamiento crónico de 4-NQO (2 mM). Donde \star indica diferencia significativa con respecto a su testigo.

En la comparación de las frecuencias de clones de los tratamientos de LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μM)/ agua contra el testigo acetona-hexano/agua, no hubo diferencias significativas para ningún tipo de clon (Tabla 3E y Figura 17) y en la distribución del tamaño de clon sólo se mostró significativamente diferente LYCO (0.9 μM)/ agua (Figura 18). Para los tratamientos de LYCO (0.45 y 0.9 μM) / H_2O_2 con respecto al control acetona-hexano/ H_2O_2 , se obtuvo un aumento significativo en la frecuencia de clones pequeños y grandes, mientras que en el tratamiento LYCO(1.8 μM)/ H_2O_2 , la diferencia no fue estadísticamente significativa; observándose que a menor concentración de LYCO, mayor frecuencia de clones (Tabla 3F y Figura 17); por otra parte en la distribución del tamaño del clon, LYCO (0.45, 0.9, 1.8 μM)/ H_2O_2 sí se encontraron diferencias significativas comparadas con la distribución del testigo acetona-hexano/ H_2O_2 , indicando que LYCO influyó en la división celular (Figura 19).

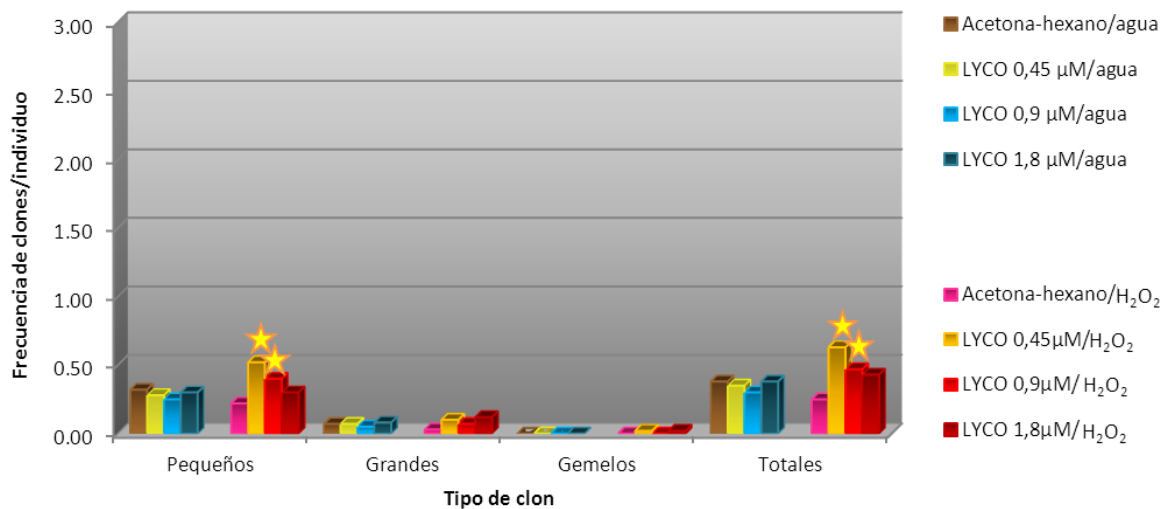


Fig. 17. Frecuencia de clones pequeños, grandes gemelos y totales por individuo de los pre-tratamientos de LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μM) con tratamiento crónico de agua ó H_2O_2 (20 mM), comparados con su respectivo control. Donde \star indica diferencia significativa con respecto a su testigo.

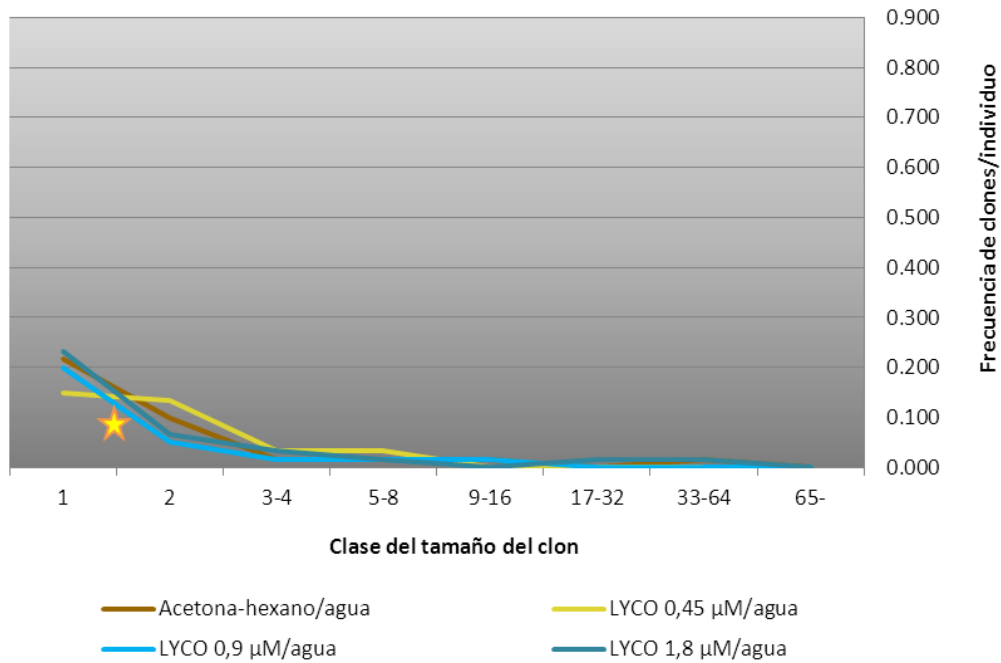


Fig. 18. Distribución del tamaño de clon de los pre-tratamientos de LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μM) con tratamiento crónico de agua. Donde \star indica diferencia significativa con respecto a su testigo.

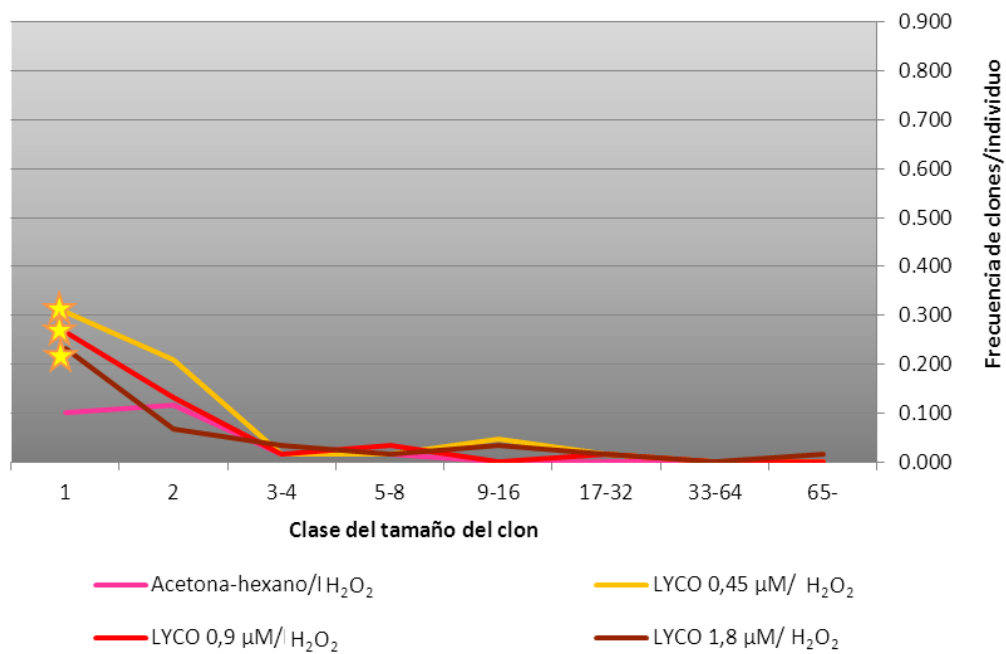


Figura 19.- Distribución del tamaño de clon de los pre-tratamientos de LYCO (0.45, 0.9 y 1.8 μM) con tratamiento crónico de H_2O_2 (20 mM). Donde \star indica diferencia significativa con respecto a su testigo.

DISCUSIÓN

Testigos

Aunque no se utilizó agua como disolvente para ninguno de los compuestos a probar, se realizó un testigo agua/agua para poder comparar la tasa de mutación espontánea con este disolvente, con los testigos negativos acetona-hexano/acetona y acetona-hexano/agua. Estos testigos negativos no mostraron diferencias significativas en la frecuencia de clones mutantes con respecto al testigo agua/agua, de manera que se asume que los resultados obtenidos con los pre-tratamientos y tratamientos crónicos fueron provocados por los compuestos a probar y no por sus disolventes. Sin embargo, si se obtuvo diferencias significativas en la distribución de clones *mwh* del testigo acetona-hexano/agua con respecto a agua/agua lo que podría significar que el pre-tratamiento de acetona-hexano está afectando a la división celular (puede ser citotóxico), no obstante este disolvente fue constante en todos los pre-tratamientos, por lo que las diferencias encontradas deben ser resultados de los diferentes tratamientos crónicos o una interacción con los disolventes.

El 4-NQO es un potente pro-mutágeno y pre-cancerígeno cuyo efecto ha sido demostrado en diferentes estudios (Wallenius and Lekholm, 1973; Galiègue-Zoutina *et al.*, 1985; Imaida *et al.*, 1989; Heres-Pulido *et al.*, 2004; Vered *et al.*, 2005; Arima *et al.*, 2006; Kanojia and Vaidya, 2006; Heres-Pulido *et al.*, 2010), debido a lo cual fue utilizado como testigo positivo en el presente trabajo. Como se esperaba el tratamiento crónico con 4-NQO produjo un aumento significativo en la frecuencia de clones y una diferencia significativa en la distribución del tamaño de los clones, con respecto a su testigo negativo, confirmándose el efecto genotóxico de este mutágeno.

En un trabajo realizado en paralelo con el presente, en el que se utilizaron los mismos tratamientos pero en la craza estándar (CE) de *D. melanogaster* (De la Cruz, 2011), se obtuvieron frecuencias de clones menores con el testigo positivo

4-NQO, lo cual coincide con lo esperado ya que 4-NQO es un pro-mutágeno activado por los CYP450, por lo que causa mayor daño en la CBE que tiene niveles altos de éstos. Estos resultados coinciden con lo obtenido en otros estudios donde también se probó la genotoxicidad de 4-NQO en SMART en ala de *D. melanogaster* en ambas cruzas (Heres-Pulido *et al.*, 2004; Arellano-Llamas 2008; Heres-Pulido *et al.*, 2010).

Interacción LYCO/4-NQO

Muchos de los trabajos sobre LYCO evalúan su efecto en distintos tipos de células cancerosas, existiendo pocos trabajos sobre la antigenotoxicidad de este compuesto *in vivo*, por lo que el presente estudio es una aportación en el área. Los resultados mostraron que el pre-tratamiento con LYCO a las concentraciones utilizadas (0.45, 0.9 y 1.8 μM) no afectaron a la tasa de mutación del testigo negativo correspondiente, por consiguiente, se puede decir que el LYCO por sí solo, no afectó la tasa de mutación espontánea de *D. melanogaster* en esta cruz.

El LYCO es un carotenoide ampliamente estudiado como agente antioxidante, diversos estudios demuestran que este compuesto tiene gran afinidad por los radicales libres y efecto sobre el estrés oxidativo (Sahin, 2006; Yeh and Hu, 2000; Di Mascio *et al.*, 1989; Woodall *et al.*, 1997), por lo cual en sistemas complejos podría reducir la disponibilidad de estos radicales para reaccionar con otras moléculas y por tanto reducir el daño causado (Woodall *et al.*, 1997). Por otra parte el 4-NQO, como ya se ha mencionado, es un potente pro-mutágeno y pre-cancerígeno comprobado, que tiene como uno de sus mecanismos de acción, el causar daño al DNA y ser promotor de cáncer por la inducción de estrés oxidativo por la producción ERO (Arima *et al.*, 2006; Nunoshiba and Demple, 1993). Debido a la naturaleza de estos dos compuestos se creyó que al utilizarlos en la prueba SMART se obtendría efecto antigenotóxico del LYCO sobre el efecto genotóxico ya conocido del 4-NQO, sin embargo el LYCO no modificó el daño producido por el 4-NQO, en la CBE de esta prueba.

Contrario a lo ocurrido en el presente trabajo, en un estudio de antigenotoxicidad *in vitro* en el que también se probó el efecto del LYCO sobre 4-NQO, utilizando ensayos cometa y micronúcleos en células de ovario de criceto chino, se encontró que el LYCO, ya sea administrado antes o simultáneamente con la exposición al mutágeno, fue efectivo contra las lesiones inducidas por 4-NQO, teniendo un efecto antigenotóxico (Scolastici *et al.*, 2007). Los contrastes entre estos dos trabajos se pueden deber a diversas razones:

- I) En primera instancia hay que considerar que las concentraciones de LYCO utilizadas en ambos trabajos no son las mismas, en el presente estudio se utilizaron concentraciones menores, las cuales se eligieron de acuerdo a concentraciones encontradas en plasma humano (Stahl y Sies, 1996).
- II) En ensayos *in vitro* no se consideran situaciones complejas que ocurren *in vivo*. Lo que sugiere que en el presente estudio el LYCO podría estar interactuando con otras moléculas y vías metabólicas que modifiquen su efecto y por tal motivo no se observó antigenotoxicidad. Un factor que influye en la acción como antioxidante de los carotenoides *in vivo* es su estructura, en especial el sistema de dobles enlaces conjugados, que si bien es lo que le otorga la actividad de antioxidante, también afecta el modo en que son incorporadas a las membranas biológicas cambiando su estructura y siendo diferente su comportamiento *in vivo* que en solución (Konigsberg, 2008). De la misma manera al entrar en un sistema *in vivo* con diferente estructura, el LYCO podría ser metabolizado, cambiando su comportamiento y efecto en el sistema *in vitro* al observado *in vivo*.
- III) La craza de *D. melanogaster* utilizada para este estudio presenta niveles de CYP450 altos, esta condición pudo intervenir en el metabolismo del LYCO, de manera tal que éste fue más fácil y rápidamente metabolizado que en condiciones inducibles, inhibiendo de manera eficiente cualquier efecto que hubiese podido tener sobre el daño por 4-NQO. Del metabolismo del LYCO existen muy pocos trabajos y aún éste no está claro, sin embargo ésta propuesta se apoya en el trabajo realizado en paralelo a éste (De la Cruz, 2011)

en donde la cruza utilizada tiene niveles de expresión normales de los CYP450 y sus resultados sí mostraron efecto del LYCO.

Si bien el daño producido por el 4-NQO no es sólo por la producción de ERO, sí es parte de su mecanismo de acción, por lo que se esperaría que el LYCO como antioxidante produjera una disminución de la frecuencia de clones, incluso mínima; el no encontrar tal disminución lleva a sugerir que la capacidad antioxidante no es el principal mecanismo de acción del LYCO en sistemas *in vivo*, tal como han concluido algunos autores (Erdman *et al.*, 2009). Ellos afirman que hay sustento experimental limitado para la hipótesis del papel antioxidante como principal mecanismo quimiopreventivo del licopeno en sistemas *in vivo*. Existen diversos estudios que no relacionan el efecto benéfico del LYCO con su actividad antioxidante, sino con otros mecanismos de acción que pudiera tener este carotenoide, como participación en la modulación de la comunicación intercelular, modulación de enzimas en el metabolismo xenobiótico e incluso inducción de apoptosis (Astorg *et al.*, 1997; Breinholt *et al.*, 2000; Aust *et al.*, 2003; D' Agostini *et al.*, 2005; Fornelli *et al.*, 2007; Scolastici *et al.* 2008).

En estudios en donde se probó el efecto del LYCO sobre N-nitrosodietilamina (N-DEA), en células humanas de hepatoma, que contienen varias enzimas responsables de activación de xenobióticos presentes en sistemas *in vivo* (Scolastici *et al.* 2008) y en un sistema *in vivo* con inducción de neoplasia (Astorg *et al.*, 1997) el LYCO inhibió el daño producido por el mutágeno y los autores sugieren que parece estar actuando por medio de un efecto modulador de la ruta metabólica de mutágenos indirectos, en especial del CYP450 que activa el N-DEA, inhibiendo la activación del mutágeno. Tal efecto del LYCO tampoco se observó en el presente estudio, ya que la administración previa de LYCO no afectó el daño producido por 4-NQO, que es biotransformado por CYP450, no viéndose afectada su activación. La diferencia se podría atribuir principalmente a que, como ya se sabe, existe una gran variedad de isoformas de CYP450, cada isoforma es responsable de metabolizar o activar diferentes sustancias (Orellana y Guajardo, 2003; Plant, 2003) y los CYP450 que activan al N-DEA no son los mismos que activan al 4-NQO (Plant, 2003).

Mientras que en algunos artículos, como los ya mencionados, se apunta a que el LYCO puede inhibir los CYP450 y de esta manera evitar el daño producido por pro-mutágenos, en otro estudio donde se probó el efecto del LYCO en enzimas antioxidantes y enzimas que metabolizan drogas (Breinholt *et al.*, 2000) los resultados mostraron un patrón de inducción de enzimas de fase I, y los autores sugieren cierta especificidad enzimática del LYCO hacia ciertos tipos de CYP450. En el presente estudio no se observó tal inducción, posiblemente por la variedad de isoformas de CYP450 ya mencionada. Tal consideración también podría ser apoyada por los resultados de un estudio en el que se utilizaron los mismos tratamientos en la misma cruce del presente estudio (Hernández, 2012) con la diferencia del pro-mutágeno uretano, en dicha investigación el licopeno sí tuvo efecto sobre la activación del mutágeno.

Por otro lado, hay que recordar que la CBE tiene niveles altos de CYP450, y tal condición llevaría a pensar que no se podría observar efecto modulador de los CYP450 por el LYCO en la cruce utilizada, sin embargo, aunque desde el uso de esta cruce se ha considerado que los niveles de CYP450 son constitutivos, en un estudio de expresión genética se demostró que si bien en general la CBE sí tiene niveles altos de éstos, la expresión de cada subtipo actúa de manera independiente y sí pueden ser modulados por ciertas sustancias (Vázquez-Gómez *et al.*, 2010). Lo que provee evidencia de que en esta cruce sí es posible observar modulación de los CYP450 y que al no ser observada ni inducción, ni inhibición, es probable que el LYCO no afecte el subtipo de CYP450 que activa al pro-mutágeno 4-NQO, ya que el LYCO debe actuar de manera diferente con los distintos CYP450.

Aunque las concentraciones utilizadas de LYCO no modificaron la frecuencia de clones mutantes, sí hubo diferencias significativas en la distribución del tamaño de los clones en LYCO (0.45, 0.9, 1.8 μM)/acetona, con respecto a la distribución del tamaño de los clones del testigo correspondiente. Además, el tratamiento de LYCO 0.9 μM /4-NQO también mostró diferencias en dicha distribución con respecto a la provocada por el 4-NQO. Esto podría indicar que el LYCO puede estar actuando

por efecto apoptótico del LYCO, aunque no tenga un efecto genotóxico detectable con SMART en ala. Dicho efecto apoptótico de licopeno ha sido observado en un estudio en donde se aislaron productos de oxidación del licopeno y evaluaron su actividad en la inducción de apoptosis en una línea celular (Zhang *et al.*, 2003), indicando que los productos de oxidación de LYCO inhiben el crecimiento e inducen apoptosis.

Interacción LYCO/H₂O₂

En el presente trabajo se propuso utilizar al H₂O₂ (20 mM) como testigo del daño por estrés oxidativo, sin embargo las frecuencias obtenidas con el testigo acetona-hexano/H₂O₂ fueron muy bajas, no encontrando diferencia significativa con respecto al testigo negativo acetona-hexano/agua, indicando que el H₂O₂ a la concentración utilizada no está causando daño genotóxico. No obstante la distribución de clones sí fue diferente entre estos dos testigos, apuntando que el H₂O₂ sí provocó modificación en la división celular. Estos resultados coinciden con un estudio en donde se evaluó el daño oxidativo por H₂O₂ sobre *D. melanogaster* en donde los resultados mostraron que aunque la concentración de radicales libres aumentó con el H₂O₂, pudiendo provocar daño oxidativo, la actividad mutagénica y dañina al DNA resultó negativa, atribuyendo esto a que el DNA fue protegido por las catalasas, otros antioxidantes y por sistemas de reparación (Kawai y Furukawa, 1995).

Por otra parte, existen otros estudios, en donde se expusieron diferentes tipos de células a diversas concentraciones de H₂O₂ en los que se demostró que este compuesto induce muerte celular (Palomba *et al.*, 1996; Gardner *et al.*, 1997; Hampton *et al.*, 1997; Antunes *et al.*, 2001; Barbouti *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2010). Gardner *et al.*, (1997) estudiaron la regulación de la muerte celular en dos tipos de células expuestas a varias concentraciones de H₂O₂ y encontraron tres tipos de muerte celular producidas por el H₂O₂, que dependieron de la concentración, señalando que en concentraciones menores a 10 mM hubo citotoxicidad con evidencia de apoptosis. En otro estudio similar, los síntomas de

apoptosis fueron evidentes con exposición de 10-100 μM (Burdon *et al.*, 1995). Aunque la activación de muerte celular por ERO ha sido caracterizada mayormente *in vitro*, pruebas correlativas en condiciones patológicas sugieren que dichas especies pueden producir muerte celular *in vivo* (Hernández-García *et al.*, 2010), basándose en estudios con ratones, en los que se demuestra una fuerte relación entre el estrés oxidativo y la pérdida de células neuronales (Andersen, 2004). Debido a todo lo mencionado anteriormente, se propone que la baja frecuencia de clones encontrada con el testigo acetona-hexano/ H_2O_2 no se debe a protección o sistemas de reparación, si no a un daño irreparable en las células que las llevó a muerte celular, lo que conllevó a que dichas células dañadas no permanecieran en el individuo y a no poder observar el daño como clones. La realización de pruebas con diferentes concentraciones de H_2O_2 en la prueba SMART en ala de *D. melanogaster* podrían aclarar estos resultados.

En los pre-tratamientos de LYCO con tratamiento crónico de H_2O_2 se observó un aumento significativo en el número de clones a las concentraciones de LYCO 0.45, y 0.9 μM lo que sugiere que este carotenoide aumentó el daño producido por el H_2O_2 . Sin embargo, si la baja frecuencia de manchas del testigo H_2O_2 está indicando muerte celular, el LYCO podría estar previniendo el daño celular producida por H_2O_2 existiendo mayor número de células con daño en las que podemos contabilizar clones. De esta manera los resultados coinciden con los encontrados en un estudio en donde se evaluó el efecto de LYCO, obtenido de guayaba rosa, sobre el daño celular producido por H_2O_2 en una línea celular de hígado humano (Kong *et al.*, 2010), en donde la suplementación con LYCO previno la destrucción celular y el daño al DNA producido por H_2O_2 . También con estudios *in vitro* en diferentes tipos de células en los que la suplementación con LYCO reduce significativamente la genotoxicidad inducida por H_2O_2 (Scolastici *et al.*, 2007; Scolastici *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

- Se comprobó nuevamente la genotoxicidad del 4-NQO en CBE de *D. melanogaster* y se demostró que es un pro-mutágeno activado por CYP450.
- El LYCO no afectó la tasa de mutación espontánea de la CBE de *D. melanogaster*, pero mostró un efecto en la división celular.
- El LYCO no modificó el daño producido por el pro-mutágeno 4-NQO en la CBE de *D. melanogaster* no encontrándose el efecto protector esperado.
- El LYCO no moduló a los CYP450 encargados de la activación del 4-NQO.
- El H₂O₂ no mostró el daño genotóxico esperado en la CBE de *D. melanogaster*, sin embargo provocó cambios en la división celular.
- El LYCO pudo haber reducido el efecto en la división celular provocada por el H₂O₂ haciendo evidente el daño genotóxico de éste al observarse incremento en la frecuencia de manchas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M., Celniker, S., Holt, R., Evans, C., Gocayce, J., Amanatides, P., Sherer, S., Li, P., Hoskins, R., Galle, R., George, R., Lewis, S., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S., Sutton, G., Wortman, J., Yandell, M., Zhang, Q., Chen, L., Brandon, R., Rogers, Y., Blazej, R., Champe, M., Pfeiffer, B., Wan, K., Doyle, C., Baxter, E., Helt, G., Nelson, C., Miklos, G., Abril, J., Agbayani, A. An, H., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E., Beeson, K., Benos, P., Berman, B., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K., Busam, D., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A., Dew, I., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B., Dunn, P., Durbin, K., Evangelista, C., Ferraz, C., Ferriera, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A., Garg, N., Gelbart, W., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N., Harvey, D., Heiman, T., Hernandez, J., Houck, J., Hostin, D., Houston, K., Howland, T., Wei, M., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karpen, G., Ke, Z., Kennison, J., Ketchum, K., Kimmel, B., Kodira, C., Kraft, C., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitsky, A., Li, J., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., McIntosh, T., McLeod, M., McPherson, D., Merkulov, G., Milshina, N., Mobarri, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, S., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, D., Nelson, D., Nelson, D., Nelson, K., Nixon, K., Nusskern, D., Pacleb, J., Palazzolo, M., Pittman, G., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, M., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B., Sidén-Kiamos, I., Simpson, M., Skupski, M., Smith, T., Spier, E., Spradling, A., Stapleton, M., Strong, R., Sun, E., Svirskas, R., Tector, C., Turner, R., Venter, E., Wang, A., Wang, X., Wang, Z., Wassarman, D., Weinstock, G., Weissenbach, J., Williams, S., Woodage, T., Worley, K., Wu, D., Yang, S., Yao, A., Ye, J., Yeh, R., Zaveri, J., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X., Zhong, F., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S., Zhu, X., Smith, H., Gibbs, R.,

- Myers, E., Rubin, G. y C. Venter. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 287: 2185-2195.
- Agarwal S., Rao V.A. 2000. Tomato lycopene and this role in human health and chronic diseases. *Canadian Medical Association J.* 163: 739-744.
 - Almendro V. y Gascón P. 2007. *Nutrigenómica y Cancer*. Barcelona España.139-152.
 - Andersen J. K. 2004. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature reviews*. Nature Publishing 518-525.
 - Antunes F., Cadenas E. and Brunk U. T. 2001. Apoptosis induced by exposure to a low steady-state concentration of H₂O₂ is a consequence of lysosomal rupture. *Biochemical Journal* 356: 549-555.
 - Arellano L. M. 2008. Modulación del daño producido por el 4NQO por parte de la Vit./FeSO₄ en función de los niveles de CYP450 en *Drosophila melanogaster*. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 85 p.
 - Arima Y., Nishigori C., Takeuchi T., Oka S., Morimoto K., Utani A., and Miyachi Y. 2006. 4-Nitroquinoline 1-Oxide Forms 8-Hydroxydeoxyguanosine in Human Fibroblasts through Reactive Oxygen Species. *Toxicological Sciences* 91(2): 382-392.
 - Astorg P., Gradelet S., Bergès R. and Suschetet M. 1997. Dietary lycopene decreases the initiation of liver preneoplastic foci by diethylnitrosamine in the rat. *Nutrition and cancer* 29(1): 60-68.
 - Austa, N. O. Ale-Aghaa, Zhanga L., Wollersenb H., Siesa H. and Stahl W. 2003. Lycopene oxidation product enhances gap junctional communication. *Food and Chemical Toxicology* 41: 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.

- Bhuvaneswari V. and Nagini S. 2005. Lycopene: a review of its potential as an anticancer agent. *Current Medicinal Chemistry* 5(6): 627-635.
- Bramley P. M. 2002. Is lycopene beneficial to human health?. *Phytochemistry* 54: 233-236.
- Breinholt V., Lauridsen S. T., 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. H. 1995. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radical Biology & Medicine* 18(4): 775-794.
- Castañeda P. L., M.E. Heres y I.E. Dueñas. 2008. *Drosophila melanogaster* un modelo experimental. FES Iztacala. México. 86 p.
- Clinton S. K. 1998. Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutrition Reviews*. 56(2): 35-51.
- D'Agostini F., Izzotti A., Balansky R.M., Bennicelli C. and De Flora S. 2005. Modulation of apoptosis by cancer chemopreventive agents. *Mutation Research* 591: 173-186.
- De la Cruz N. J. 2011. Incremento del daño genotóxico del 4-NQO inducido por pretratamientos con licopeno en SMART en ala de *Drosophila melanogaster* (Cruza estándar). Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 69p.
- Denison S. and Whitlock P. 1995. Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. *Journal of biological chemistry* 270(31): 18175-18178.
- Di Mascio P., Raiser S. and Sies H. 1989. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 274 (2): 532-538.
- Dueñas, I.E., Heres, M.E., Castañeda, P.L., Graf, U., 2002. Easy rising of *Drosophila melanogaster* consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. Technique note. *Drosophila Information Service* 84: 166.

- Dueñas-García, I. E. 2002. Efecto mutagénico y recombinogénico de la p-fenilendiamina y la o-fenilendiamina, mediante la prueba de mutación somática en alas de *Drosophila melanogaster* cruza E y AB. Tesis Maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 79 p.
- Dueñas-García, I.E., V. Vega-Contreras, J.C. Gómez-Luna, L.F. Santos-Cruz, L. Castañeda-Partida, A. Durán-Díaz, and M.E. Heres-Pulido. 2005. Toxicity parameters of 4-nitroquinoline-1-oxide, urethane and methyl methanesulfonate in the *flare* and Oregon-*flare* strains of *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Information Service* 88: 83-89.
- Erdman J. W. Jr. Ford N. A. and Lindshield B. L. 2009. Are the health attributes of lycopene related to its antioxidant function?. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 483: 229-235.
- Fernandez-Ruiz V., Cámara M. y Quintanella J. C. 2007. Ingredientes bioactivos del tomate: el licopeno. Fichas de revisión. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria* 3(27): 166-170.
- FlyBase. En línea <http://www.flybase.bio.idiana.edu>.
- Fornelli F., Leone A., Verdesca I., Minervini F. and Zacheo G. 2007. The influence of lycopene on the proliferation of human breast cell line (MCF-7). *Toxicology in Vitro* 21: 217-223.
- Franklin M. and Yost 2000. Biotransformation: A Balance between Bioactivation and Detoxification Cap 3. In: Phillip L. Williams, Robert C. James, Stephen M. Roberts (Eds). *Principles of toxicology. Environmental and Industrial Applications. Second Edition.* John Wiley & Sons, Inc. 57-86 p.
- Frei, H. 1982. Genetic damage induced by X-rays or neutrons in spermatozoa of *Drosophila melanogaster*, differential processing in the oocytes of females carrying the DNA-repair-deficient mutants *mei-9^a* and *mus-101^{D1}*. *Mutation Research* 94: 63-78.
- Frei H. and Würigler 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 tests (SMART) in *Drosophila*. Mutation Research 334: 247-258.
- Galiègue-Zouitina S., Bailleul B. and Loucheux-Lefebvre M. 1985. Adducts from *in vivo* action of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide in rats and from *in vitro* reaction of 4-acetoxyaminoquinoline 1-Oxide with DMA and polynucleotides. Cancer Research 45: 520-525.
- Galli E. y Feijoo L. 2002. Citocromo P-450 y su importancia clínica revisión actualizada. Revista de Neuro-Psiquiatría 65: 187-201.
- 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(Nos. 1-2): 73–83.
- Gärtner C., Stahl W. and Sies H. 1997. Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. American Journal of Clinical Nutrition 66: 116-122.
- 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., 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 and Molecular Mutagenesis 6: 153-188.
- Graf U., Abraham S., Guzmán-Rincón J. y F. Würgler. 1998. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. Mutation Research 402: 203-209.
- Graf U., Heo O. y O. Ramirez. 1992a. The genotoxicity of chromium (VI) oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is over 90% due to mitotic recombination. Mutatation Research 266: 197-203.
- Graf U., Vogel E., Biber U. y F. Würgler. 1979. A new allele at the *mei-9* locus on the X-chromosome. Mutatation Research 59: 129-133.
- Greenwald P., Clifford C. K. and Milner J. A. 2001. Dieta y prevención del cancer. European Journal of Cancer 37: 984-965.

- Guengerich F. 2006. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *The AAPS Journal*. 8(12): 101-111.
- Halliwell B. and Aruoma O. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters* 281(1,2): 9-19.
- Hampton M. B. and Orrenius S. 1997. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Letters* 414: 552-556.
- Held L. 2002. *Imaginal Discs. The Genetic and Cellular Logic of Pattern Formation*. Cambridge University Press. EUA. 460 p.
- Heres-Pulido M. E., Dueñas-García I., Castañeda-Partida L., Sánchez-García A., Contreras-Sousa M., Durán-Díaz A. and Graf U. 2004. Genotoxicity of tamoxifen citrate and 4-nitroquinoline-1-oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis* 19(3): 187-193.
- Heres-Pulido M. E., Dueñas-García I., Castañeda-Partida L., Santos-Cruz L. F., Vega-Contreras V., Rebollar-Vega R., Gómez-Luna J.C., Durán-Díaz 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.
- Hernández G. A. 2012. Efecto del licopeno ante el uretano y el peróxido de hidrógeno en SMART en ala de *Drosophila melanogaster* (CBE). Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 50p.
- Hernández-García D., Wood C.D., Castro-Obregón S. and Covarrubias L. 2010. Reactive oxygen species: A radical role in development? *Free Radical Biology & Medicine* 49: 130–143.
- Imaida K, Sato H, Okamiya H, Takahashi M, Hayashi Y. 1989. Enhancing effect of high fat diet on 4-nitroquinoline-1-oxide-induced pulmonary tumorigenesis in ICR male mice. *Journal of Cancer Research* 80(6): 499-502.

- Imlay J. A., Chin S. M. and Linn S. 1988. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. Science Reports 240: 640-642.
- Kanojia D., and Vaidya M.. 2006. 4-Nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogénesis. Oral Oncology 42: 655-667.
- Kawai K. and H. Furukawa. 1995. Oxidative damage of *Drosophila melanogaster* fed with hydrogen peroxide. JEMS Abstracts/Mutation Research 334: 385-427.
- Kong K., Rajab N. F., Prasad K. N., Ismail A., Markom M., Tan C. 2010. Lycopene-rich fractions derived from pink guava by-product and their potential activity towards hydrogen peroxide-induced cellular and DNA damage. Food Chemistry 123: 1142-1148.
- Konigsberg F. M. 2008. Radicales libres y estrés oxidativo: Aplicaciones médicas. Edit. El Manual Moderno. México. 277p.
- Li J., Li W., Sua J., Liu W., Altura B. T. and Altura B. M. 2003. Hydrogen peroxide induces apoptosis in cerebral vascular smooth muscle cells: possible relation to neurodegenerative diseases and strokes. Brain Research Bulletin 62: 101-106.
- Luo X., Chenc B., Zhengc R., Lina P., Li J. and Chena H. 2010. Hydrogen peroxide induces apoptosis through the mitochondrial pathway in rat Schwann cells. Neuroscience Letters 485: 60-64.
- Meneghini R. 1997. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. Free Radical Biology & Medicine 23(5): 783-792.
- Miller N. J., Sampson J., Cadeias L. P., Bramley P. M. and Riceevans C. A. 1996. Antioxidants activities of carotenes and xantophylls. FEBS Letters 384: 240-242.
- Mure K. and Rossman T. G. 2001. Reduction of spontaneous mutagenesis in mismatch repair-deficient and proficient cells by dietary antioxidants. Mutation Research 480: 85-95.
- Nunoshiba T. and Demple B. 1993. Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4-nitroquinoline-N-oxide. Cancer Research 53:3250-3252.

- Oinonen T. and Lindros K. 1988. Zonation of hepatic cytochrome P-450 expression and regulation. *Biochemical Journal* 329: 17-35.
- Omoni A. O. and Aluko R. E. 2005. The anticarcinogenic and anti atherogenic effects of lycopene: a review. *Trend in Food Science & Technology* 16: 344-350.
- Orellana B., Guajardo T. 2004. Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Revista Médica de Chile* 132: 85-94.
- Palomba L., Brambilla L., Brandi G., Sestili P., Cattabeni F. and Cantoni O. 1996. Low levels of hydrogen peroxide and L-histidine induce DNA double-strand breakage and apoptosis. *European Journal of Pharmacology* 318: 167-173.
- Pastori M., Pfander H., Boscoboinik D. and Azzi A. 1998. Lycopene in Association with α -Tocopherol Inhibits at Physiological Concentrations Proliferation of Prostate Carcinoma Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 250: 582-585.
- Periago M. J., Martínez-Valverde I., Gaspar R., Martínez C. y López G. 2001. Propiedades químicas, biológicas y valor nutritivo del licopeno. *Anales de Veterinaria de Murcia* 17: 51-66.
- Pierce B. A. 2005. *Genética: un enfoque conceptual*. Segunda edición Editorial Medica Panamericana. Madrid España. 850 p.
- Plant N. *Molecular Toxicology*. Edt. Advanced Text. 2003. 149 p.
- Rao A. V. and Agarwal S. 1999. Role of lycopene as antioxidant carotenoide in the prevention of chronic diseases: a review. *Nutrition research* 19(2): 305-323.
- Ratnam D. V., Ankola D.D., Bhardwaj V., Sahana D.K., Ravi Kumar M.N.V. 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release* 113: 189–207.
- Rodriguez A. R. 2004. *Metabolismo de las toxinas ambientales*. Fondo Nacional de Cultura Económica. México. 120 p.
- Royet, J. 1998. Organisation spatial des disques imaginaires et des bourgeons de membre. *Médecine Sciences* 14: 1167-1175.

- Sahin K., Onderci M., Sahin N., Gursu M. F., Khachik F. and Kucuk O. 2006. Effects of lycopene supplementation on antioxidant status, oxidative stress, performance and carcass characteristics in heat-stressed Japanese quail. *Journal of Thermal Biology* 31: 307-312.
- Santiago C., Bandrés F. y Gómez-Gallego F. 2002. Polimorfismos de citocromo P450: Papel como marcador biológico. *Medicina del Trabajo* 11(3): 130-140.
- Satoh T. and Yamamoto N. 1972. Repair mechanism in sendai virus carrying HeLa cells after damage by 4-Hydroxyaminoquinoline 1-Oxide¹. *Cancer Research* 32: 440-443.
- Schoop R. A., Noteborn M. H., Baatenburg J., Robert J. 2009. A mouse model for oral squamous cell carcinoma. *Journal of Molecular Histology*. 3(40): 177-181.
- Scolastici C., Alves de Lima R.O., Barbisan L.F., Ferreira A.L.A., Ribeiro D.A., Salvadori D.M.F. 2007. Lycopene activity against chemically induced DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Toxicology in Vitro* 21: 840-845.
- Scolastici C., Alves de Lima R.O., Barbisan L.F., Ferreira A.L.A., Ribeiro D.A., 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.
- Shain K., Onderci M., Shain N., Gursu M. F., Khachik F. and Kucuk O. 2006. Effects of lycopene supplementation on antioxidant status, oxidative stress, performance and carcass characteristics in heast-stressed Japanese quail. *Journal of Thermal Biology* 31: 307-312.
- Spanó, M., Frei, H., Würigler, E. y U. Graf. 2001. Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis* 16: 385-394.
- 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.

- Stanley, J. y A. Benson. 1988. The conjugation of 4-nitroquinoline 1-oxide, a potent carcinogen, by mammalian glutathione transferases 4-Nitroquinoline 1-oxide conjugation by human, rat and mouse liver cytosols, extrahepatic organs of mice and purified mouse glutathione transferase isoenzymes. *Biochemical Journal* 256: 303-306.
- Tang L., Guan H., Ding X and Wang J. 2007. *Toxicology and Applied Pharmacology* 219(1): 10-17.
- Varnes, M. y J. Biaglow. 1979. Interactions on the Carcinogen 4-Nitroquinoline 1-oxide with the Non-Protein Thiols of Mammalian Cells. *Cancer Research* 39: 2960-2965.
- Vázquez-Gómez G., Sánchez-Santos A., Vázquez-Medrano J., Monsalvo-Reyes A.C., Piedra-Ibarra E., Dueñas-García I.E., Castañeda-Partida L., Quintanar-Zúñiga R., Graf U., Heres-Pulido M.E. 2010. Sulforaphane modulates the expression of Cyp6a2 and Cyp6g1 in larvae of the ST and HB crosses of the *Drosophila* wing spot test and is genotoxic in the ST cross. *Food and Chemical Toxicology* 48: 3333–3339.
- Venereo G. J. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar* 1(2): 126-33.
- Vered M, Yarom N, Dayan D. 2005. 4NQO oral carcinogenesis: animal models, molecular markers and future expectations. *Oral Oncology* 41(4): 337-9.
- Vitale A.A., E. Bernatene, A. Pomilio. 2010. Carotenoides en quimioprevención: Licopeno. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 44(2): 195-238.
- Vogel, E., Graf, U., Frei, H. y M. Nivard. 1999. The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. In: The use of short- and medium tests for carcinogens and data on genetic effects in carcinogenic hazard evaluation. Editado por D. B. McGregor, J. M. Rice, y S. Venit. IARC Scientific Publications 146: 427-470.
- Waliszewski K. N. y Blasco G. 2010. Propiedades nutraceuticas del licopeno. *Salud Pública de México*. 52(3): 254-265.

- Wallenius K, Lekholm U. 1973. Oral cancer in rats induced by the water-soluble carcinogen 4-nitroquinoline-N-oxide. *Odontol Revy* 24(1): 39-48.
- Wilhelm Hansberg Torres. 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico XXVI*: 19-54.
- Woodall A., Lee S., Weesie R. J., Jackson M. J. and Britton G. 1997. Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1336: 33-42.
- Yeh S. L. and Hu M. L. 2000. Antioxidant and pro-oxidant effects of lycopene in comparison with β -carotene on oxidant-induced damage in Hs68 cells. *Journal of Nutrition and Biochemistry* 11: 548-554.
- Zhang H., Kotake N. E., Ono H., Nagao A. 2003. A novel cleavage product formed by autoxidation of lycopene induces apoptosis in HL-60 cells. *Free Radical Biology and Medicine* 35(12): 1653-1663.

APÉNDICE I

Drosophila melanogaster

Drosophila melanogaster (Figura 20) es uno de los organismos más intensamente estudiados en biología y sirve como un sistema modelo para la investigación de muchos procesos de desarrollo y celulares comunes en eucariotas superiores, incluyendo a los seres humanos (Adams *et al.*, 2000). El nombre *Drosophila* proviene del griego "amor al rocío" y melanogaster "barriga oscura" que se presenta en el macho. Este organismo es conocido como la mosca de la fruta o del vinagre y se encuentra generalmente en fruta o restos vegetales en descomposición ya que se alimenta de las bacterias y levaduras que crecen en estos (Castañeda *et al.*, 2008).



Fig. 20. *Drosophila melanogaster*, hembra y macho.

Este organismo ha sido utilizado desde hace ya más de un siglo por Tomas Hunt Morgan (1866-1945), quien la introdujo por primera vez en 1909 como modelo biológico y junto con sus estudiantes estableció su genética y la linearidad de los genes, las duplicaciones, inversiones, translocaciones, alelos múltiples, herencia poligénica entre otras características. Se ha utilizado desde entonces en la investigación científica de disciplinas como: genética, biología del desarrollo, ecología, etología, evolución, estadística, toxicología, genética toxicología y neurobiología (Pierce, 2005; Castañeda *et al.*, 2008).

Dentro de la genética toxicológica *D. melanogaster* ha sido utilizada en pruebas de corto plazo de identificación de agentes genotóxicos, siendo modelo biológico en el estudio de mecanismos mutagénicos inducidos física y químicamente (Graf *et al.*, 1979; Frej, 1982).

D. melanogaster es un organismo holometábolo cuyo ciclo de vida inicia con la ovoposición, la hembra ovoposita de entre 600 a 800 huevos en sus 40-60 días de vida. Del huevo eclosiona la larva que pasa por tres estadios: larva de primer estadio desarrollada a las 24 h, de segundo estadio a las 48 h y de tercer estadio a las 72 h; durante esta fase larvaria la ingesta de alimento es continua, llegando a consumir de 3 a 5 veces su peso. A las 96 h inicia la transformación de larva de tercer estadio a pupa, hasta completar 120 h. Hasta este momento han pasado los primeros 5 días del ciclo (Figura 21).

Una vez formada la pupa, inicia la metamorfosis durante la cual el linaje celular indiferenciado presente en los discos imaginales forma los tejidos y las estructuras presentes en el adulto. Cinco días más tarde emerge el imago, una mosca ya con apariencia del adulto pero que debe madurar sexualmente en unas horas para convertirse completamente en una mosca adulta (Figura 21). El tiempo del ciclo puede variar de acuerdo a las condiciones, puede durar desde 10 días a 25 ± 2 °C y 65% de humedad relativa, hasta 2 semanas a 21 °C. (Castañeda *et al.*, 2008).

Las estructuras y tejidos presentes en las moscas adultas se derivan de células indiferenciadas que se encuentran conformadas en paquetes en forma discoidal (sacos) conocidos como discos imaginales. Inicialmente estos discos tienen de 20 a 50 células las cuales aumentan por mitosis durante la fase larval. Durante la metamorfosis estas células darán lugar a las diferentes estructuras: ojos, apéndices alas etc. (Figura 22) (Royet, 1998; Held, 2002; Castañeda *et al.*, 2008).

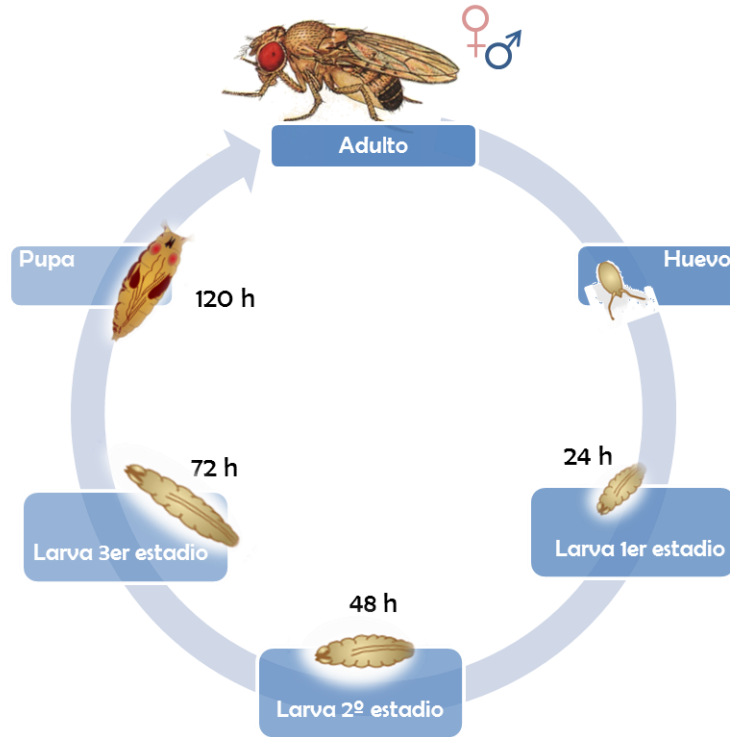


Fig. 21. Ciclo de vida de *D. melanogaster*.

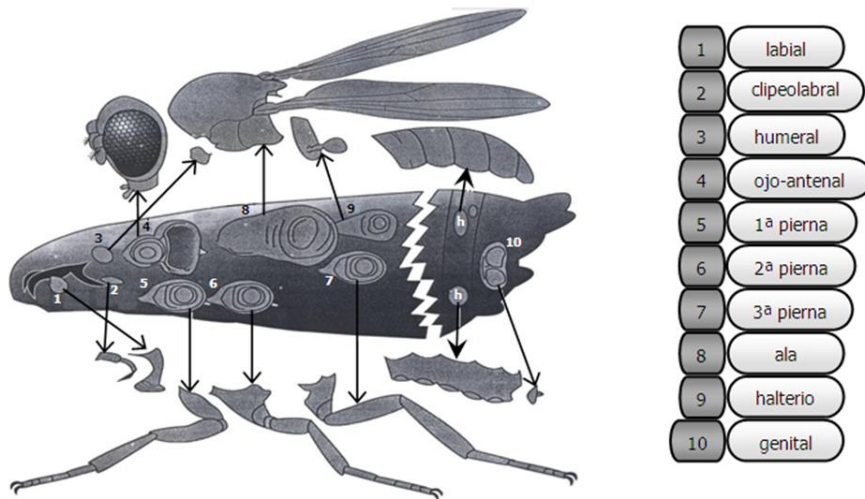


Fig. 22. Estructuras originadas a partir de los discos imaginales en *D. melanogaster* (Held 2002).

Existen cientos de mutantes con múltiples alelos que han sido caracterizados, secuenciados y se mantienen en ceparios. De esta manera se tienen cepas de moscas con diferente color de ojos, distinta forma y tamaño de alas, diferente color de cuerpo y con modificación en los tricomas de las alas, por mencionar algunas (Castañeda *et al.*, 2008).

La mosca de la fruta tiene ciertas características que la convierten en un buen organismo para las investigaciones científicas: posee un tiempo de generación relativamente corto de modo que pueden estudiarse varias generaciones en algunas semanas; producen gran cantidad de descendientes, por tanto se puede obtener gran número de progenie en un único cruzamiento genético y son fáciles de cultivar y mantener en laboratorio (Pierce, 2005). Además, hay un alto nivel de semejanza genética entre *D. melanogaster* y los seres humanos que no se presenta solamente en dominios individuales y proteínas, sino también en vías metabólicas completas de diversas complejidades y fases, tales como los sistemas celulares de metabolización xenobiótica (Graf *et al.*, 1992a; Adams *et al.*, 2000). Su genoma ha sido completamente secuenciado y el 60% de los 289 genes de las enfermedades humanas son similares en *D. melanogaster*. También este insecto comparte dos familias de CYPs450 similares a las de vertebrados (CYP4 y CYP6) (Adams *et al.*, 2000; FlyBase, 2011).

APENDICE 2

Prueba de Kolmogorov-Smirnov

Para el análisis de la distribución del tamaño de los clones *mwh* se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los resultados de esta prueba se presentan en las tablas 4-19, en las cuales la distribución de un tratamiento es significativamente diferente con respecto al testigo correspondiente cuando $p < 0.05000$.

Kolmogorov-Smirnov Test (Spreadsheet 110)									
By variable Var 1									
Marked tests are significant at $p < .05000$									
variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean c2	Mean e7	Std. Dev. c2	Std. Dev. e7	Valid N c2	Valid N e7
Var 2	-0.250000	0.00	p> .10	31.12500	32.62500	6.104741	4.068608	8	8

Tabla 4. Comparación del tratamiento agua/agua contra acetona-hexano/acetona. En negritas se marca el resultado de la comparación el cual resultó ser No significativo (NS)

Kolmogorov-Smirnov Test (Spreadsheet 110)									
By variable Var 1									
Marked tests are significant at $p < .05000$									
variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean c2	Mean e8	Std. Dev. c2	Std. Dev. e8	Valid N c2	Valid N e8
Var 2	0.00	0.875000	p> .005	31.12500	20.37500	6.104741	3.292307	8	8

Tabla 5. Comparación del tratamiento agua/agua contra acetona-hexano/agua. En negritas se marca el resultado de la comparación el cual resultó ser significativo (S).

Kolmogorov-Smirnov Test (Spreadsheet 110)									
By variable Var 1									
Marked tests are significant at p< .05000									
variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean c3	Mean e9	Std. Dev. c3	Std. Dev. e9	Valid N c3	Valid N e9
Var 2	-0.875000	0,00	p> .005	32.62500	95.37500	4.068608	34.7109	8	8

Tabla 6. Comparación del tratamiento acetona-hexano/acetona contra acetona-hexano/4-NQO. En negritas se marca el resultado de la comparación el cual resultó ser S.

Kolmogorov-Smirnov Test (Spreadsheet 110)									
By variable Var 1									
Marked tests are significant at p< .05000									
variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean C	Mean e9	Std. Dev. C	Std. Dev. e9	Valid N C	Valid N e9
Var 2	0.00	0.875000	p> .005	20.37500	13.25000	3.292307	3.058945	8	8

Tabla 7. Comparación del tratamiento acetona-hexano/agua contra acetona-hexano/H₂O₂. En negritas se marca el resultado de la comparación el cual resultó ser S.

Kolmogorov-Smirnov Test (Spreadsheet 110)									
By variable Var 1									
Marked tests are significant at p< .05000									
variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean C1	Mean E4	Std. Dev. C1	Std. Dev. E4	Valid N C1	Valid N E4
Var 2	0.00	0.750000	p> .025	32.62500	30.37500	4.068608	4.926242	8	8

Tabla 8. Comparación del tratamiento acetona-hexano/acetona contra LYCO 0.45 μM/acetona. En negritas se marca el resultado de la comparación el cual resultó ser S.

Kolmogorov-Smirnov Test (Spreadsheet 110)									
By variable Var 1									
Marked tests are significant at p< .05000									
variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean C1	Mean e5	Std. Dev. C1	Std. Dev. e5	Valid N C1	Valid N e5
Var 2	-4.875000	0.00	p> .005	32.62500	41.25000	4.068608	4.432006	8	8

Tabla 9. Comparación del tratamiento acetona-hexano/acetona contra LYCO 0.9 μ M/acetona. En negritas se marca el resultado de la comparación el cual resultó ser S.

Kolmogorov-Smirnov Test (Spreadsheet 110)									
By variable Var 1									
Marked tests are significant at p< .05000									
variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean C1	Mean e6	Std. Dev. C1	Std. Dev. e6	Valid N C1	Valid N e6
Var 2	0.00	0.750000	p> .025	32.62500	26.00000	4.068608	5.014265	8	8

Tabla 10. Comparación del tratamiento acetona-hexano/acetona contra LYCO 1.8 μ M/acetona. En negritas se marca el resultado de la comparación el cual resultó ser S.

Kolmogorov-Smirnov Test (Spreadsheet 110)									
By variable Var 1									
Marked tests are significant at p< .05000									
variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean C	Mean e	Std. Dev. C	Std. Dev. e	Valid N C	Valid N e
Var 2	-0.625000	0.00	p> .10	95.37500	110.5000	34.71079	37.61079	8	8

Tabla 11. Comparación del tratamiento acetona-hexano/4-NQO contra LYCO 0.45 μ M/4-NQO. En negritas se marca el resultado de la comparación el cual resultó ser NS.

Kolmogorov-Smirnov Test (Spreadsheet 110)									
By variable Var 1									
Marked tests are significant at $p < .05000$									
variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean C	Mean E2	Std. Dev. C	Std. Dev. E2	Valid N C	Valid N E2
Var 2	-0.750000	0.00	$p > .025$	95.37500	128.8750	34.71079	45.3886	8	8

Tabla 12. Comparación del tratamiento acetona-hexano/4-NQO contra LYCO 0.9 μM /4-NQO. En negritas se marca el resultado de la comparación el cual resultó ser S.

Kolmogorov-Smirnov Test (Spreadsheet 110)									
By variable Var 1									
Marked tests are significant at $p < .05000$									
variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean C	Mean E3	Std. Dev. C	Std. Dev. E3	Valid N C	Valid N E3
Var 2	-0.500000	0.125000	$p > .10$	95.37500	94.3750	34.71079	37.53831	8	8

Tabla 13. Comparación del tratamiento acetona-hexano/4-NQO contra LYCO 1.8 μM /4-NQO. En negritas se marca el resultado de la comparación el cual resultó ser NS.

Kolmogorov-Smirnov Test (Spreadsheet 110)									
By variable Var 1									
Marked tests are significant at $p < .05000$									
variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean c	Mean E2	Std. Dev. c	Std. Dev. E2	Valid N c	Valid N E2
Var 2	0.00	0.500000	$p > .10$	20.37500	18.7500	3.292307	4.20034	8	8

Tabla 14. Comparación del tratamiento acetona-hexano/agua contra LYCO 0.45 μM /agua. En negritas se marca el resultado de la comparación el cual resultó ser NS.

Kolmogorov-Smirnov Test (Spreadsheet 110)									
By variable Var 1									
Marked tests are significant at p< .05000									
variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean C	Mean E3	Std. Dev. C	Std. Dev. E3	Valid N C	Valid N E3
Var 2	0.00	0.875000	p> .005	20.37500	16.50000	3.292307	2.13809	8	8

Tabla 15. Comparación del tratamiento acetona-hexano/agua contra LYCO 0.9 µM/agua. En negritas se marca el resultado de la comparación el cual resultó ser S.

Kolmogorov-Smirnov Test (Spreadsheet 110)									
By variable Var 1									
Marked tests are significant at p< .05000									
variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean C	Mean E4	Std. Dev. C	Std. Dev. E4	Valid N C	Valid N E4
Var 2	-0.125000	0.125000	p> .10	20.37500	20.25000	3.292307	3.011881	8	8

Tabla 16. Comparación del tratamiento acetona-hexano/agua contra LYCO 1.8 µM/agua. En negritas se marca el resultado de la comparación el cual resultó ser NS.

Kolmogorov-Smirnov Test (Spreadsheet 110)									
By variable Var 1									
Marked tests are significant at p< .05000									
variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean e9	Mean e10	Std. Dev. e9	Std. Dev. e10	Valid N e9	Valid N e10
Var 2	-1.000000	0.00	p> .001	13.25000	33.62500	3.058945	6.390562	8	8

Tabla 17. Comparación del tratamiento acetona-hexano/ H₂O₂ contra LYCO 0.45 µM/ H₂O₂. En negritas se marca el resultado de la comparación el cual resultó ser S.

Kolmogorov-Smirnov Test (Spreadsheet 110)									
By variable Var 1									
Marked tests are significant at p< .05000									
variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean e9	Mean e11	Std. Dev. e9	Std. Dev. e11	Valid N e9	Valid N e11
Var 2	-1.000000	0.00	p> .001	13.25000	25.37500	3.058945	4.068608	8	8

Tabla 18. Comparación del tratamiento acetona-hexano/ H₂O₂ contra LYCO 0.9 µM/ H₂O₂. En negritas se marca el resultado de la comparación el cual resultó ser S.

Kolmogorov-Smirnov Test (Spreadsheet 110)									
By variable Var 1									
Marked tests are significant at p< .05000									
variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean e9	Mean e12	Std. Dev. e9	Std. Dev. e12	Valid N e9	Valid N e12
Var 2	-0.875000	0.00	p> .005	13.25000	21.125000	21.12500	3.720119	8	8

Tabla 19. Comparación del tratamiento acetona-hexano/ H₂O₂2 contra LYCO 1.8 µM/ H₂O₂. En negritas se marca el resultado de la comparación el cual resultó ser S.