



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

---

---

**Efecto modulador del Resveratrol contra el  
promutágeno Uretano con SMART en ala de  
*Drosophila melanogaster*, cruce estándar (CE).**

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A  
JACQUELINE SILVA CALZADA

DIRECTOR DE TESIS

BIOLOGO: LUIS FELIPE SANTOS CRUZ

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉX.

2013





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



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.

La vida está llena de sueños, que nos permiten estar despiertos,  
Escucha las voces, confía en cada paso que das que cada derrota  
será el comienzo para llegar a la gloria.

Arriesgarte produce ansiedad pero no hacerlo significa perderse a  
uno mismo.

## AGRADECIMIENTOS

---

---

**A Dios:** Por darme la oportunidad de crecer, de realizarme, y por la gran satisfacción que tengo por estar rodeada de personas que han cambiado mi vida, por la gran felicidad que siento hoy al terminar un proyecto más, y por los que vienen.

**Al profesor Luis Felipe Santos:** Por apoyarme, escucharme y por estar en esta etapa tan importante en mi vida y alentarme a seguir adelante, pero sobre todo por confiar en mí. Gracias

**A la maestra Irma Dueñas:** Por apoyarme, enseñarme, y por hacer más agradable mi estancia en el Laboratorio de Toxicología Genética.

**A la maestra María Eugenia Heres:** Por sus lecciones y por alentarme a estudiar la Maestría y el Doctorado, y día con día seguir enriqueciendo mi formación profesional. Me ha enseñado que en esta vida uno debe arriesgarse.

**A la Dra. Anita Bores:** Por su aportación en este trabajo de tesis y por las correcciones. Gracias

**A la Universidad Nacional Autónoma de México:** Por permitirme estudiar la mejor carrera; Biología y por ser mi segunda hogar.

**A mis abuelitos Ricardo Silva+, Elvira Polanco+, Soledad Mata+ y Antonio Calzada** por todo el amor y las lecciones de vida que me dieron y me siguen dando. Los quiero

**A mis maravillosos Padres Ángeles y Luis:** Por darme la vida, por permitirme formar parte de esta grandiosa familia, por el gran amor que me tienen y yo les tengo, por estar siempre en los mejores momentos de mi vida y los peores, por alentarme día a día a ser una mejor persona, nunca terminaría de agradecerles lo que han hecho por mi, gracias por ser mi ejemplo a seguir y demostrarme que siempre se puede, solo es cuestión que uno luche día a día por alcanzar sus sueños "LOS AMO".

**A mis hermanitas: Cyndi y Vero:** Gracias por escucharme, por decirme la verdad cuando más la necesite, por indicarme mis errores y fortalecer mis virtudes, por todas las risas y aventuras que hemos pasado juntas "LAS QUIERO MUCHO".

**A mi tía Martha** por todo su apoyo incondicional y cuidado que me ha brindado a lo largo de mi vida, y a todos mis tíos, tías y primos por su apoyo.

**A mi tío Ricardo Silva** le agradezco por su apoyo que me ha dado desde pequeña y alentarme a luchar en esta vida, y a todos mis tíos

**A Oscar:** Por ser parte de mi vida, por todos los bellos momentos que pasamos juntos como pareja y como amigos, por brindarme tu apoyo incondicional, por escucharme, por estar cuando más te necesite y por creer en mí, por alentarme a mejorar como persona, gracias por todo "TE AMO".

**A mis amigos de Laboratorio Sofy, Lalo, Sandy, Ángel, Lucero, Zaira, Manuel y Lorena:** por hacer más amena mi estancia en el laboratorio, por las grandes charlas que teníamos, por las aventuras, por sus consejos y por brindarme su amistad. Gracias

**A mis amigos de 1ºEtapa: Víctor, Lucero, Abraham, Diego y Didier:** por su amistad, por todas las experiencias que pasamos a diario, por las grandes charlas, las fiestas, por todos los días que soñábamos, (¿Te acuerdas Didier? De aquellos proyectos de investigación que solíamos inventar sobre el DNA y serian la panacea de la humanidad, por fin lo logre, te quiero amigo), gracias a todos por dejarme ser parte de este club.

**A mis amigos de la 2ºEtapa: Abraham, Ana, Yair, Sol, Tere y Andy:** gracias por las grandes charlas, las aventuras, por hacer más amenas las prácticas de campo, por sus consejos, y sobre todo por su gran amistad

**A Roció, Mon amie y Andy:** Gracias a dios por ponerlos en mi camino, por ser aquellos amigos que te dicen la verdad cuando más la necesitas, por estar siempre presentes en los momentos difíciles y alegres de mi vida, por apoyarme, por escucharme decir siempre lo mismo, por regañarme cuando más lo necesito, por sus consejos, por su gran ayuda en este camino y sobre todo por ser parte de mi vida. "Los quiero mucho"

## CONTENIDO

---

---

Contenido.....	- 5-
Índice de figuras.....	- 7-
Lista de abreviaturas.....	-9-
Resumen.....	-10-
Introducción.....	-11-
--Resveratrol.....	-13-
--Uretano.....	-16-
----Metabolismo del uretano.....	-18-
--Antecedentes.....	-20-
--Justificación.....	-25-
Objetivo General.....	-25
Objetivo Particular.....	-25-
Materiales y Métodos.....	-26-
--Químicos.....	-26-
--Biológicos.....	-27-
--Tratamientos.....	-29-
--Análisis Estadístico.....	-30-
Resultados.....	-32-
Discusión.....	-44-
--Testigos Negativos (disolventes).....	-44-
--Testigos Positivos (mutágeno + disolvente).....	-45-
--Testigos Resveratrol.....	-46-
--Co-tratamiento RES/URE.....	-47-

Conclusiones.....	-50-
Recomendaciones.....	-50-
Referencias.....	-51-
Anexo 1.....	-63-
--Metabolismo Xenóbiotico.....	-63-
--Citocromos P450.....	-64-
Anexo 2.....	-67-
-- <i>Drosophila melanogaster</i> .....	-67-
---- Ciclo de vida.....	-69-
Anexo 3.....	-70-
--Prueba de mutación y recombinación somática.....	-70-

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

---

Figura 1. Interacción del xenobiotico con el material genético.....	-12-
Figura 2. Principales fuentes de resveratrol (Res).....	-14-
Figura 3. Estructura <i>cis</i> y <i>trans</i> de Res.....	-14-
Figura 4. Estructura química del uretano (URE).....	-16-
Figura 5. Metabolismo xenóbiotico del URE.....	-19-
Figura 6. Propagación y mantenimiento de las líneas mutantes de <i>D. melanogaster</i> .....	-27-
Figura 7. Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo de los testigos negativos.....	-32-
Figura 8. Distribución de tamaño de clones <i>mwh</i> de los testigos negativos..	-33-
Figura 9. Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo del testigo EtOH 1% y los testigos positivos.....	-37-
Figura 10. Distribución de tamaño de clones <i>mwh</i> del testigo EtOH 1% y los testigos positivos.....	-37-
Figura 11. Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo del testigo EtOH 1% y los testigos RES.....	-38-
Figura 12. Distribución de tamaño de clones <i>mwh</i> del testigo EtOH 1% y los testigos RES.....	-39-
Figura 13. Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo del testigo EtOH 1% y los co-tratamientos RES-URE.....	-40-
Figura 14. Distribución de tamaño de clones <i>mwh</i> del testigo EtOH 1% y los co-tratamientos RES-URE.....	-41-

Figura 15. Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo del testigo positivo URE/EtOH 1% y los co-tratamientos RES-URE.....	-42-
Figura 16. Distribución del tamaño de clones <i>mwh</i> de los co-tratamientos RES-URE.....	-43-
Figura 17. Biotransformación de xenóbioticos.....	-64-
Figura 18. Cromosomas de <i>D. melanogaster</i> .....	-68-
Figura 19. Dimorfismo sexual en <i>D. melanogaster</i> .....	-68-
Figura 20. Ciclo de vida de <i>D. melanogaster</i> .....	-69-
Figura 21a. Eventos genéticos que ocasionan la pérdida de heterocigosis, para los marcadores <i>flr<sup>3</sup></i> y <i>mwh</i> , y la formación de manchas en SMART en ala.....	-72-
Figura 21b. Continuación de Eventos genéticos que ocasionan la pérdida de heterocigosis, para los marcadores <i>flr<sup>3</sup></i> y <i>mwh</i> , y la formación de manchas en SMART en ala.....	-73-
Tabla 1. Tratamientos crónicos evaluados en larvas de <i>D. melanogaster</i> , cruza estándar (CE).....	-29-
Tabla 2. Resultados obtenidos de la prueba SMART en ala de <i>D. melanogaster</i> para la progenie trans-heterocigota cruza estándar (CE).....	-34-

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

---

**+** Resultado positivo para el estadístico SMART con una  $p < 0.05$ .

**-** Resultado negativo para el estadístico SMART con una  $p < 0.05$ .

**↓** Disminución en la frecuencia espontánea de manchas para el estadístico SMART con una  $p < 0.05$

**CE:** Cruza estándar

**HR:** humedad relativa

**mwh:** marcador genético *multiple wing hai*

**flr<sup>3</sup>:** marcador genético *flare*

**MX:** Metabolismo xenobiótico

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**RNA:** ácido ribonucleico

**CYP450s:** Citocromos P450

**URE:** Uretano o carbamato de etilo

**VC:** Vinil carbamato

**VCO:** Vinil carbamato epóxido

**RES:** Resveratrol

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrógeno

**ROS:** Especies Reactivas de Oxígeno (siglas en inglés)

**EtOH:** etanol

**mM:** mili molar

**Ppb:** parte por billón

**SMART:** Prueba de mutación y recombinación somáticas, “*Somatic Mutation and Recombination Test*”

**AC:** Aberraciones cromosómicas, CA (*Chromosome Aberrations*)

**MN:** Micronúcleos

**ICH:** Intercambio de cromátidas hermanas, SCE (*Sister Chromatid Exchange*)

## RESUMEN

---

A lo largo de su vida un ser humano está expuesto a una gran cantidad de xenobióticos, estos pueden llegar a generar enfermedades crónicas degenerativas. Por ende se han investigado compuestos que ayuden a prevenir, controlar y abatir dichas enfermedades. El Resveratrol (RES) es una fitoalexina producida en las plantas ante el estrés ambiental y el ataque patogénico. Las uvas, arándanos, cacahuates y vino tinto son las principales fuentes de RES en la dieta humana. Este compuesto ha demostrado tener diversas propiedades tanto benéficas como perjudiciales para la salud. Por lo anterior, se evaluó los efecto del RES sobre el daño producido por el promutágeno Uretano (URE) en la cruza estándar (CE) de la prueba SMART en ala de *D. melanogaster*, exponiendo larvas de tercer estadio a los tratamientos y co-tratamientos crónicos siguientes: agua miliQ, EtOH 1%, URE 20 mM, RES (0.010, 0.043 y 0.172 mM), y RES-URE. Todos los tratamientos y co-tratamientos se realizaron por triplicado y en tres experimentos independientes. Se revisaron las alas de fenotipo silvestre a 40x y los resultados se analizaron con: SMART PC-versión 2.1, la prueba U de Mann-Whitney y Wilcoxon y la prueba Kolmogorov-Smirnov. Los resultados indicaron que el RES a la concentración 0.010 mM causó daño genotóxico; en co-tratamiento la concentración 0.043 mM mostró posible efecto quimiopreventivo al disminuir significativamente el daño causado por URE, y a la concentración 0.172 mM aumentó significativamente el daño provocado por el URE, lo cual puede atribuirse a un posible efecto pro-oxidante por parte del RES que se hubiera sumado al efecto genotóxico del URE. Por último, todos los tratamientos y co-tratamientos con RES provocaron alteración de la división celular en las células de los discos imaginales del ala, lo cual podría indicar modulación en el ciclo celular, quizás como resultado de un efecto citotóxico u apoptótico. Por lo anterior, se concluye que el RES es genotóxico y modula la genotoxicidad del URE.

Palabras Claves: Uretano, *D. melanogaster*, resveratrol, quimiopreención y SMART en ala.

## INTRODUCCIÓN

---

El ser humano se encuentra en constante exposición a factores físicos, químicos y biológicos(xenobióticos) los cuales pueden ingresar al organismo y provocar lesiones en el material genético (Brusick, 1988).

Los efectos tóxicos de los xenobióticos sobre el material genético (DNA) son estudiados por la Toxicología Genética, ciencia multidisciplinaria, que identifica y analiza la acción directa (mutágenos) o indirecta (promutágenos) de agentes que modifican los componentes hereditarios de los sistemas vivos (Brusick, 1988).

La toxicología genética tiene como principal función evaluar el daño al DNA en sus dos estirpes celulares: somáticas y germinales. Por ende desarrollan pruebas y métodos para definir el impacto de los xenobióticos en la integridad de del DNA (Vogel, 1991).

El término xenobiótico, es usado para describir aquellas sustancias ajenas al cuerpo, por ejemplo: compuestos vegetales, medicamentos, pesticidas, cosméticos, fragancias, aditivos alimentarios, productos químicos industriales y contaminantes ambientales, que tienen la capacidad de ingresar al cuerpo por absorción, inhalación o ingestión (Xu *et al.*, 2005). Los xenobióticos no pueden ser utilizados como nutrientes en las diferentes vías metabólicas, por lo que una vez dentro del organismo gran parte de estos compuestos están sujetos al metabolismo xenobiótico para ser eliminados del cuerpo; sin embargo, algunos por su naturaleza pueden atacar centros nucleofílicos tales como en el DNA y ejercer un efecto genotóxico (de acción directa), o bien puede ser biotransformados a genotoxinas por enzimas metabólicas, tales como los Citocromos P450 (CYP450s) en cuyo caso son de acción indirecta y se llaman promutágenos. La lesión que pueda llegar a producir un xenobiótico en el DNA puede ser reparada eficiente o ineficientemente, de tal manera que el daño genético inicial se eliminará, se fijará o aumentará expresándose en las diferentes celulares, tal como se muestra en la Figura 1 (Brusick, 1988).

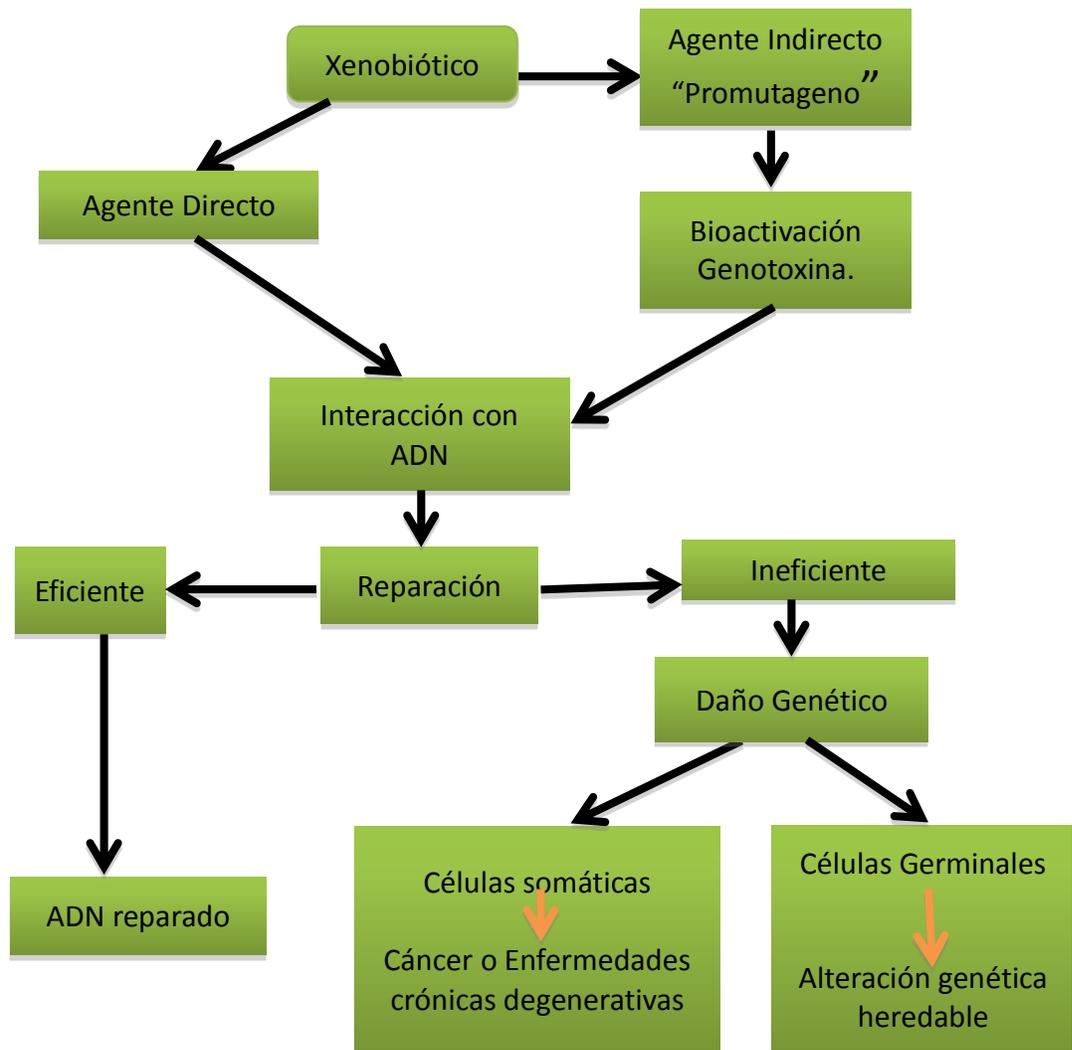


Figura 1. Interacción del xenobiótico con el material genético

Existen algunos xenobióticos de origen natural que han sido objeto de estudio debido a que provén al organismo un efecto quimiopreventivo , al disminuir el daño causado por agentes genotóxicos, citotóxicos etcétera (Xu *et al.*, 2005).

La quimiopreención consiste en el empleo de determinadas sustancias químicas, naturales o sintéticas que impidan o reviertan el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas. (Martínez, 2000). Los productos más empleados en la quimiopreención son aquellos que han demostrado actividades antimutagénica, antiproliferativa y/o antioxidante en mayor o menor grado (Peñalver, 2000).

## RESVERATROL (RES)

---

---

RES es una fitoalexina que se produce en las plantas durante los momentos de estrés ambiental y ataque patogénico. Es insoluble en agua, pero se disuelve en etanol(EtOH) y dimetilsulfóxido (Aggarwal *et al.*, 2004).

El RES se detectó por primera vez en 1949 en las raíces del Eléboro Blanco (*Veratrum grandiflorum*) (Langcake y Price, 1977), más tarde en 1963 fue aislado de las raíces de *Polygonum cuspidatum*, una planta utilizada en la medicina tradicional china (Silva *et al.*, 2008). Actualmente, se ha encontrado en por lo menos 72 especies de plantas, algunas de las cuales son componentes de la dieta humana, tales como el cacahuate, arándano, maní, uvas, entre otras (Figura 2) (Dercks y Creasy, 1989). Se ha estimado, que el RES en la piel de uva contiene aproximadamente 50-100 µg por gramo. En vinos tinto, las concentraciones se encuentra entre 1.5-3 mg (Chun-Fu *et al.*, 2013)

El RES presenta dos estructuras isoméricas: *cis* y *trans* (Figura 3). La forma *trans* (*trans*-3,4',5-trihidroxiestilbeno) es la más común y posee mayor actividad biológica (Robert *et al.*, 2006). Sin embargo, a partir de estudios en animales y en humanos, se sabe que el isómero predominante que se ingiere por vía oral en los alimentos es el *trans*-RES- glucósido (piceído), que se transforma biológicamente y se elimina rápidamente. Por lo tanto, las formas conjugadas de RES son las que llegan a los tejidos y en los que ejercen su efecto biológico (Lucas *et al.*, 2004).

El RES posee diversas propiedades benéficas para la salud, tales como: efecto antiinflamatorio, antitumoral, antiosteoporótico, antimicrobiano, antioxidante, anticancerígeno y quimiopreventivo (Millan *et al.*, 2008). También se ha demostrado que extiende el periodo de vida de diversos organismos como levadura, moscas (Howitz ,2003) y vertebrados (Valenzano, 2006).

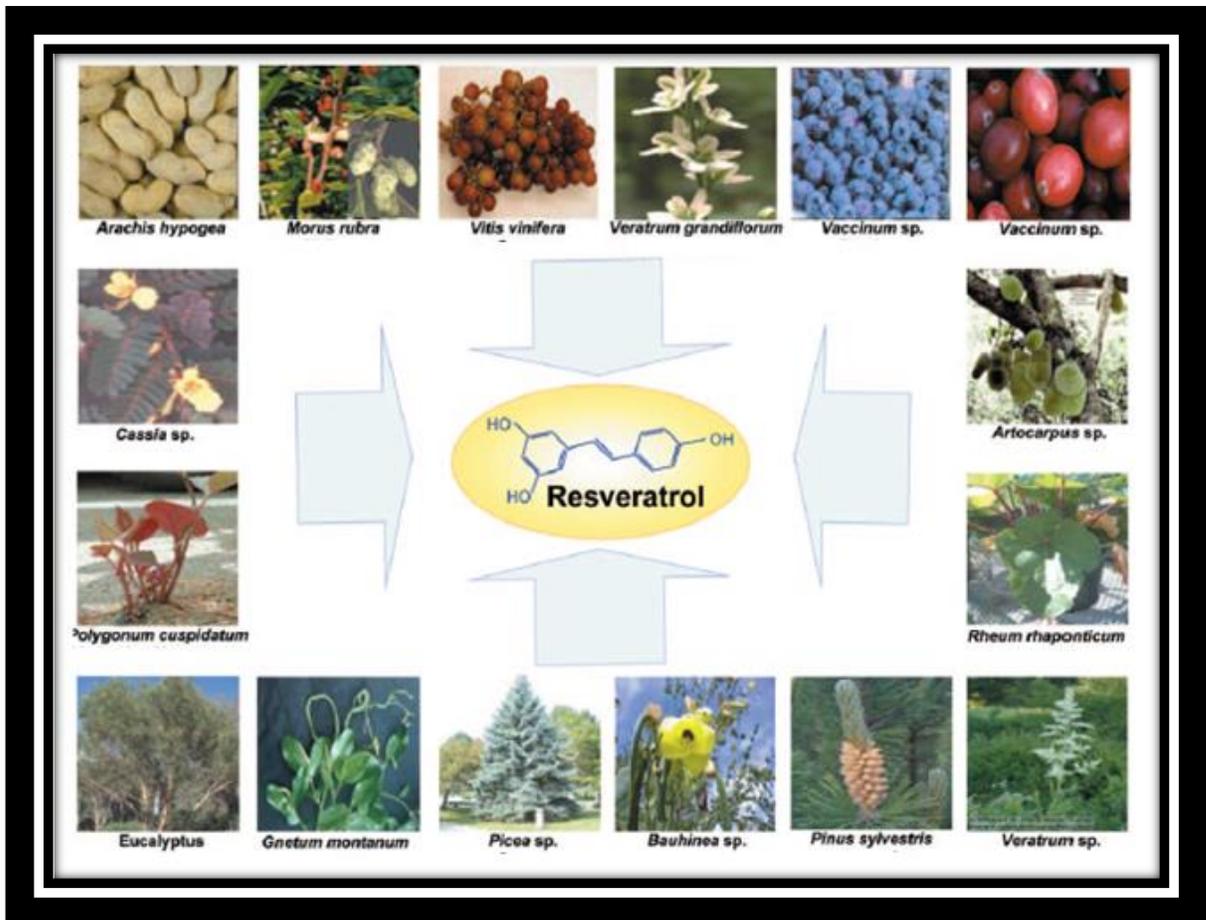


Figura 2. Principales fuente de RES.

(Tomado de: Aggarwal *et al.*, 2004)

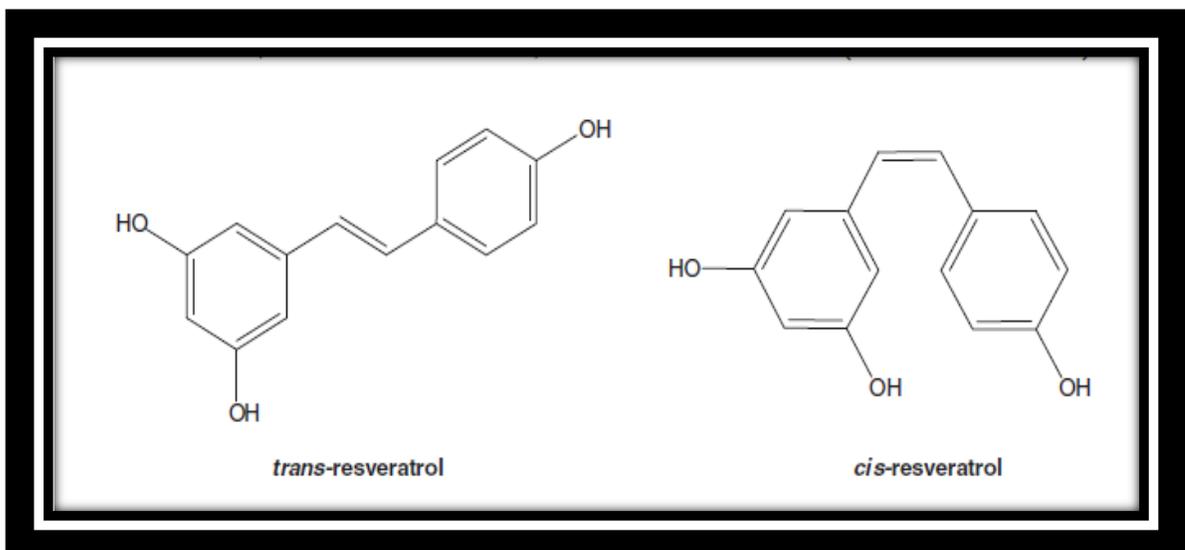


Figura 3. Estructura química de RES *trans* y *cis* (Tomado de Viña *et al.*, 2013.)

El efecto quimiopreventivo que presenta el RES puede ser debido a:

- (i) La detención del ciclo celular y activación de apoptosis, suprimiendo la proliferación de una amplia variedad de células cancerígenas como linfoides, mieloides, mama, colon, páncreas, estómago, próstata, cabeza, cuello, ovario, hígado, y pulmón. Aggarwal *et al.* (2004) demostraron que el RES a las concentraciones (0.010 y 0.100 mM) activó apoptosis en células SW480 de cáncer de colon en humano. Wolter *et al.* (2001) reportaron que el RES inhibe el crecimiento y proliferación de células Caco-2 a través de la apoptosis, encontrando aumento de la actividad de la caspasa-3 y la expresión de ciclinas E y A, disminuyendo los niveles de ciclina D1 y quinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4), lo que ocasionó la detención del ciclo celular en las fases S y G<sub>2</sub>.
  
- (ii) La inhibición de las enzimas de Fase-I del metabolismo xenobiótico, tales como los CYP450s, que constituyen una superfamilia de isoenzimas hemoproteínas de gran importancia en la oxidación de compuestos endógenos, fármacos, contaminantes ambientales, productos químicos y activación de pro-cancerígenos (Guengerich *et al.*, 2003). El RES ha demostrado ser un potente inhibidor de CYP1A1, CYP1B1, CYP3A4, CYP3A5 y CYP2E1 este último activa compuestos pro-cancerígenos (Lucas *et al.*, 2004). Revel *et al.* (2003) demostraron que el RES reduce la inhibición de la bioactivación del promutágeno benzopireno, suprimiendo los efectos perjudiciales de éste en el tejido pulmonar *in vitro*.

## URETANO (URE)

---

---

Carbamato de etilo también conocido como uretano ( $\text{NH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ) (Figura 4) se forma por la reacción de pH ácido de EtOH con diversos compuestos que poseen un grupo carbamílico, como la urea producida por las levaduras, o la citrulina producida por bacterias lácticas a partir de arginina (Bordons *et al.*, 2004). El URE se encuentra en alimentos fermentados tales como pan y yogurt, en bebidas alcohólicas tales como cerveza y vino (Uthurry *et al.*, 2004) y en las hojas y el humo del tabaco (Sakano *et al.*, 2002).

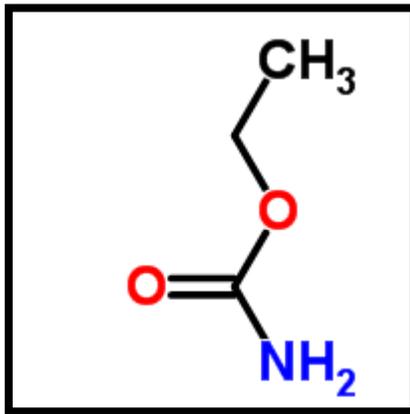


Figura 4. Estructura química del Uretano

La principal fuente de exposición del URE para el ser humano es por consumo de bebidas alcohólicas. Se ha encontrado que la cantidad de URE en promedio es de 1,073 ppb en la mayoría de cervezas y aguardiente de frutas, 50 a 200 ppb en whiskies y 7-12 ppb en vinos de mesa (BATF, 1987;BATF 1988).

En la actualidad se sabe que el URE puede ocasionar problemas para la salud ya que ha provocado linfomas, hepatomas, melanomas y tumores de pulmón en animales de laboratorio (Hübner *et al.*,1997; Sakano *et al.*, 2002). Por estas razones la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) ha clasificado al URE dentro del grupo 2B, que corresponde a los compuestos con

suficiente información sobre su potencial cancerígeno en animales de experimentación, pero insuficiente en el hombre (IARC, 1987).

El URE es utilizado como genotóxico en muchos ensayos de toxicología genética *in vivo* e *in vitro* (Bateman, 1976; Allen *et al.*, 1982). Frölich y Würigler (1990) reportaron que el URE a la concentración de 20 mM fue genotóxico en la cruce estándar de SMART en ala de *D. melanogaster*. Anderson y Styles (1978) demostraron que el URE es mutagénico en la prueba de Ames. y se ha demostrado que el CYP4502E1 es el responsable de su metabolismo en mamíferos del URE (Yamamoto *et al.*, 1990; Forket y Lee 1997; Lee *et al.*, 1998) Wild (1991) determinó que dos metabolitos del URE (N-hidroxiuretano y vinil carbamato) inducen micronúcleos en eritrocitos de médula ósea de ratón.

## METABOLISMO XENOBIÓTICO DEL URE

---

El URE es un promutágeno, es decir requiere activación por metabolismo xenobiótico (MX) para convertirse en una genotoxina y ocasionar daño al material genético (Miller y Miller, 1983).

El MX de URE puede llevarse a cabo por tres vías. En la vía principal 90 % del URE administrado es hidrolizado por enzimas esterasas a etanol, amonio y dióxido de carbono, estos compuestos son hidrosolubles, por lo que son excretados sin causar daño (Woo Cha *et al.*, 2000). En la segunda 0.1 % es convertido por los CYP450s a *N*-Hidroxiuretano el cual es oxidado a un radical nitroso o puede ser convertido por esterasas a hidroxilamina lo cual puede causar daño al DNA. En la tercera 0.5 % es transformado por los CYP450s (CYP2E1 para mamíferos) a vinil carbamato (VC) y éste a su vez a vinil carbamato epóxido (VCO) (Sakano *et al.*, 2002; Woo Cha *et al.*, 2000), el cual puede unirse covalentemente a proteínas, RNA y DNA formando aductos (Ribovich *et al.*, 1982; Miller y Miller, 1983; Fossa *et al.*, 1985. Frölich y Würigler 1990). Sakano y colaboradores en el 2002 reportaron que la hidroxilamina puede llegar a producir óxido nítrico *in vivo* causando daños por oxidación y depurinación del DNA en presencia de cobre, el cual puede ser obtenido de las regiones heterocromáticas de la cromatina. Mientras que Scherer y colaboradores en 1986 demostraron que el URE forma aductos 7-(2' oxoetil) guanina en el DNA de células hepáticas de rata.

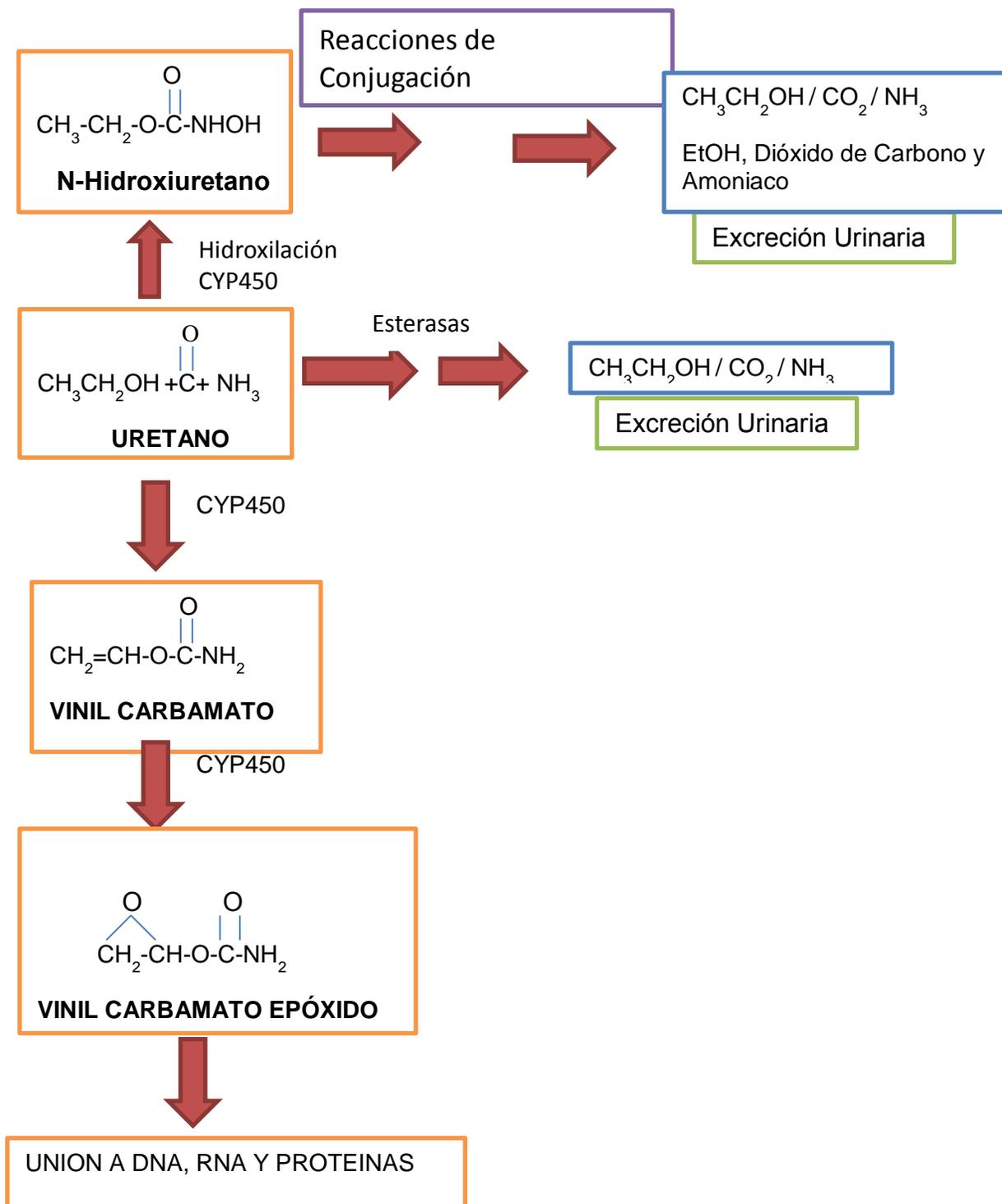


Figura 5. Metabolismo xenobiótico de URE tomado de Hoffler *et al.*, 2005.

## ANTECEDENTES

---

---

### Efecto genotóxico de RES

Autor y año	Prueba	Resultados
Gómez, 2013.	SMART en ala de <i>D. melanogaster</i>	La concentración 0.010 mM de RES fue genotóxica en la craza estándar.
Schmitt <i>et al.</i> , 2002.	MN	RES a concentraciones (200 mM) induce micronúcleos en células de linfoma de ratón L5178 y en células V79 de hámster chino.
Matsuoka <i>et al.</i> , 2001.	Prueba de Ames <i>Salmonella typhimurium</i> y <i>Escherichia coli</i>	Las concentraciones 0.02 y 5000 µg de RES fueron negativas en todas las cepas.
Mitrut <i>et al.</i> , 2009	Paper	RES induce micronúcleos en células de adenocarcinoma gástrico a las concentraciones 0.005mM, 0.010mM y 0.043mM La mayor incidencia de micronúcleos fue a la concentración 0.043mM de RES
Matsuoka <i>et al.</i> , 2001.	Intercambio de cromátidas hermanas (ICH)	El RES induce ICH de manera dosis - dependiente en concentraciones por arriba de 0.044 mM e Inhibió la proliferación celular a 0.099 mM.
Matsuoka <i>et al.</i> , 2001.	MN	El RES indujo micronúcleos a concentraciones 0.011, 0.022, 0.044 y 0.099 mM.

## Efecto citotóxico de RES

Autor y año	Prueba	Resultados
Matsuoka <i>et al.</i> , 2001.	Evaluación de la actividad citotóxica	Citotoxicidad de RES a la concentración de 0.099 mM. En células pulmonares de hámster chino (CHL)
Scott 2002	<i>Review</i>	Los isómeros de RES ( <i>cis</i> y <i>trans</i> ) a concentración (0.050 mM) disminuyeron el crecimiento de células MCF-7 por citotoxicidad
Schmitt <i>et al.</i> , 2002	Ensayo de micronúcleos	RES a concentraciones altas (200 mM) presenta efecto citotóxico en células de linfoma de ratón L5178 y V79 de hámster chino
Osman <i>et al.</i> , 2012	Evaluación de la actividad citotóxica	RES a la concentración 0.063 mM aumento la citotoxicidad de DOX (fármaco empleado en cáncer) en células de cáncer de mama

## Efecto de RES sobre ciclo celular y apoptosis

Autor y año	Prueba	Resultados
Aggarwal <i>et al.</i> , 2004.	<i>Review</i>	RES a concentraciones de 0.010 a 0.100 mM activa diversas caspasas y apoptosis en células de cáncer de colon de humano SW480.
Wolter <i>et al.</i> , 2001.	Análisis del ciclo celular. Ensayo de apoptosis.	RES inhibe el crecimiento y proliferación de células Caco-2 a través de la apoptosis, deteniendo el ciclo celular en las fases S y G <sub>2</sub> .
Toloi <i>et al.</i> , 2012.	<i>Review</i>	RES a concentraciones > 0.020 mM induce muerte celular en células de carcinoma de vejiga urinaria ECV304
Yun Lin <i>et al.</i> , 2011	<i>Review</i>	RES activa <i>p53</i> , induciendo de esta forma la detención del ciclo celular (arresto) o apoptosis.

## Efecto quimiopreventivo de RES

Autor y año	Prueba	Resultados
Gescher y Steward, 2003.	<i>Review</i>	RES induce efecto quimiopreventivo <i>in vivo</i> a dosis (0.2-2 mg / Kg) e <i>in vitro</i> a concentraciones >0.005 a 0.100 mM.
Lucas <i>et al.</i> , 2004.	Activación de Monooxygenasa.  Estudios de inhibición	RES es un potente inhibidor de los CYP450s (CYP1B1, CYP3A4, CYP3A5 y CYP2E1).
Revel <i>et al.</i> , 2003.	Inmunohistoquímica.  Ensayo de apoptosis.	RES es capaz de reducir significativamente la genotoxicidad del benzopireno en tejido pulmonar <i>in vitro</i> mediante la inhibición del CYP1A1 que metaboliza a este último
Quincozes <i>et al.</i> , 2010	MN	RES inhibe la frecuencia de micronúcleos inducida por El H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en células astrogiales
Yan <i>et al.</i> , 2011	Actividad de radicales hidroxilo por Walling	RES protege al DNA del daño oxidativo provocado por EtOH en linfocitos perifericos humanos

## Efecto pro-oxidante de Res

---

---

Autor y año	Prueba	Resultados
Ahmad <i>et al.</i> , 2004.	Determinación de la viabilidad celular y la fragmentación del DNA.  Determinación de la actividad de la caspasa-3 y -9.	Las concentraciones de RES (0.004-0.008 mM) en células de leucemia humana inhiben la activación de las caspasas y la fragmentación del DNA inducida por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  A estas concentraciones de RES (0.004-0.008 mM) presenta un efecto pro-oxidante incrementando el O <sub>2</sub> intracelular.
Leo <i>et al.</i> , 2013	Análisis de Estrés Oxidativo	Revelaron que el tratamiento durante 24 h a dosis entre 0.215 y 1 mM de RES provocó un efecto pro-oxidante
Fukuhara y Miyata (1998)	Ensayo de escisión del DNA	La actividad pro-oxidante de RES fue en presencia de iones de metales de transición tales como el cobre; la degradación del DNA por el RES fue mayor en presencia de cobre (10-100 mM) y menor en su ausencia (200 mM de RES).

## JUSTIFICACIÓN

---

---

El ser humano se encuentra expuesto de manera constante e inevitable a factores externos o xenobióticos los cuales pueden actuar de manera individual o en conjunto para iniciar o promover enfermedades terminales y degenerativas. Por ello en la actualidad diversos estudios se han enfocado al uso de compuestos de origen natural que pudieran ayudar a prevenir, combatir y evitar este tipo de enfermedades, uno de ellos es el RES, llamado “elixir juventud”, el cual ha demostrado tener propiedades antioxidantes, anticancerígenas y quimiopreventivas.

### Hipótesis:

---

---

Debido a las diversas propiedades benéficas que se le atribuyen al RES, se espera que en co-tratamiento con el promutágeno URE reduzca el efecto genotóxico de este último en la prueba SMART en ala de *D. melanogaster*.

### Objetivo general:

---

---

Efecto modulador del RES contra el promutágeno URE con SMART en ala de *D. melanogaster*, cruza estándar (CE).

### Objetivos Particulares:

---

---

- ✓ Determinar el efecto de tres concentraciones de RES en SMART en ala de *D. melanogaster*.
- ✓ Evaluar el efecto del RES en co-tratamiento con URE en la prueba SMART en ala de *D. melanogaster*.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

---

---

### QUÍMICOS

- ✓ URETANO (CARBAMATO DE ETILO)  $\text{NH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$ . CAS. 51-79-6, 99% de pureza, peso molecular 89.09, obtenido de (Fluka 94300) CAS. 51-79-6.
- ✓ RESVERATROL (RES) 3,4',5-*trans*-trihidroxiestilbeno, aislado de la *Yucca periculosa* por la Dra. Ana María García Bores del Laboratorio de Fitoquímica (UBIPRO) de la FES-Iztacala, UNAM.
- ✓ ETANOL  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ . CAS. 64-17-5, 99% de pureza y el ENTELLAN. CAS. 1.07961 fueron obtenidos de ©Merck ,Darmstadt, Alemania.
- ✓ Medio instantáneo Carolina (MIC) obtenido de Carolina Biological Supply Company Burlington, N.C. USA.
- ✓ Solución conservadora (5 mL de Tegosept 12% (EtOH), 5 mL de ácido propiónico: ácido ortofosfórico (1:10) aforados a 1 L de agua) (Dueñas *et al.*, 2002).
- ✓ Nipagin metilparabeno (Tegosept)  $\text{CH}_3\text{OOC}_6\text{C}_4\text{OH}$ . CAS. 99-76-3, obtenido de Farmacia París, México.

## BIOLÓGICOS.

---

---

- ✓ Líneas mutantes de *D. melanogaster* flare<sup>3</sup> (*flr*<sup>3</sup>/TM3 Bd<sup>s</sup>) y multiple wing hair (*mhw/mhw*) del Laboratorio de Genética Toxicológica de la Fes-Iztacala, UNAM. Donadas originalmente por el Dr. U. Graf del Instituto de Toxicología (Swiss Federal Institute of Technology) y de la Universidad de Zurich, Schwerzenbach, Suiza.
- ✓ Puré de papa Maggie® como medio de cultivo estándar.
- ✓ Levadura fresca La Florida®.

### PROPAGACIÓN DE LÍNEAS MUTANTES DE *Drosophila melanogaster*.

---

---

Las líneas multiple wing hair y flare se propagaron en frascos de vidrio de 250 mL (Figura 6) con un medio de cultivo de hojuelas de papa deshidratada y 20 mL de la solución conservadora A (5mL de ácido propiónico + 5 mL de Tegosept al 12 % (OH) aforados a 1L de agua corriente), con el fin de evitar el crecimiento de bacterias y hongos. Se incubaron a 25° C, 65% de humedad relativa (HR) y obscuridad total (Dueñas *et al.*, 2001).



Figura 6. Frascos lecheros donde se realiza la propagación y mantenimiento de las diferentes líneas.

## CRUZA ESTÁNDAR (CE)

---

---

Las hembras vírgenes de la línea flare y machos multiple wing hair se aislaron y se cruzaron con en proporción 3:1. Se colocaron en frascos con medio de puré de papa y solución conservadora “A” durante tres días a una temperatura de 25° C, 65% HR y obscuridad total.

## COLECTA DE HUEVOS

---

---

El medio de levadura fresca se colocó en frascos de 250 mL dejándolo reposar durante 24 h. Pasado este tiempo se colocaron en los frascos moscas adultas procedentes de la cruce CE y se incubaron durante 8 horas. Finalmente se retiraron las moscas adultas y los frascos con la colecta de huevos se regresaron a la incubadora. Después de  $72 \pm 4$  h se recuperaron larvas de 3er estadio, diluyendo rápidamente la levadura con agua corriente y haciéndola pasar por una coladera de acero inoxidable de malla fina.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

---

---

Tres experimentos independientes se realizaron con tres réplicas por tratamiento agregando aproximadamente la misma cantidad de larvas de  $72 \pm 4$  h en tubos de ensayo con 0.5 g de DIM y 2 mL de las diferentes soluciones. Los tratamientos evaluados se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Tratamientos crónicos evaluados a larvas de la cruz estándar.

Tratamientos			
Controles negativos	Controles Positivos	Tratamientos RES	Co- tratamientos
Agua MiliQ	URE 20 mM+agua	RES 0.010 mM	RES 0.010 mM / URE 20mM
EtOH 1%	URE 20 mM+EtOH	RES 0.043 mM	RES 0.043 mM/ URE 20 mM
		RES 0.172 mM	RES 0.172 mM/ URE 20 mM

*De acuerdo con Cottart et al. (2010) la concentración de RES descrita en plasma humano es de 0.043 mM en este trabajo también se probó dicha concentración, una arriba del nivel (0.172 mM) y otra por debajo (0.010 mM).*

Las larvas tratadas permanecieron en la incubadora a 25 °C y 65 % de humedad relativa hasta que emergieron como imagos.

## DISECCIÓN DE ALAS, MONTAJE Y ANÁLISIS EN MICROSCÓPIO

Los imagos se fijaron y almacenaron en frascos con EtOH al 70%, después se disectaron las alas de las moscas con fenotipo silvestre (trans-heterocigotas), se montaron en preparaciones permanentes con la resina Entellan® dejándolas secar por un día para aplicar el cubreobjetos. Finalmente, se analizaron las superficies dorsal y ventral de las alas con un microscopio a 400x para detectar las manchas pequeñas, grandes y gemelas (Graf *et al.*, 1984). La lectura se realizó a doble ciego para evitar prejuicios.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

---

---

El tamaño de muestra óptimo para la prueba es de 55 individuos por tratamiento porque de esa manera se minimiza la posibilidad de que compuestos ligeramente genotóxicos den falsos positivos o negativos (Frei y Würzler, 1995) con el programa estadístico SMART-PC versión 2.1, que analiza estadísticamente los resultados, basándose en la prueba paramétrica de  $\chi^2$  para proporciones (de una cola), con un grado de libertad y una probabilidad de  $p < 0.05$  (Frei y Würzler, 1988). Esta prueba asume *a priori* que un tratamiento dado aumenta la frecuencia de daño genético por un cierto múltiplo de la frecuencia en el testigo negativo, permitiendo decidir si la frecuencia de manchas inducidas en los tratamientos muestran resultados positivos, débiles positivos, negativos o indecisos, basándose en las siguientes hipótesis:

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

Debido a que las manchas pequeñas (1-2 células) son más comunes, su frecuencia será mayor a la de manchas grandes (más de 3 células) y manchas gemelas (expresión de los marcadores *mwh* y *flr<sup>3</sup>*), así que el software analiza por separado todos los tipos de manchas para evitar una sobreestimación de la inducción de las manchas menos comunes. De esta manera, para considerar un

incremento significativo en la frecuencia de manchas pequeñas y totales (suma de todas las manchas) se utiliza  $m = 2$ , basado en el doblaje de las frecuencias lo que es común en estudios con radiaciones, mientras que para las manchas grandes y gemelas  $m = 5$  (Frei y Würigler, 1988, 1995).

Cada hipótesis fue probada al 5% de significancia. Con base en estas hipótesis pueden ser posibles las siguientes decisiones:

- ❖ Aceptar  $H_0$  y rechazar  $H_a$ : negativo
  - ❖ Rechazar  $H_0$  y rechazar  $H_a$ : indeciso
  - ❖ Aceptar  $H_0$  y aceptar  $H_a$ : débil positivo
  - ❖ Rechazar  $H_0$  y aceptar  $H_a$ : positivo
- (Graf *et al.*, 1984; Frei y Würigler, 1988).

Los resultados débiles positivos (w) e indecisos (i) obtenidos por SMART fueron analizados con la prueba no Paramétrica U de Mann-Whitney y Wilcoxon ( $\alpha = \beta = 0.05$ ), la cual considera la variabilidad entre los individuos y no requiere una distribución normal de los datos. Es una prueba que usa STAT-Graphics versión 6.0 (Frei y Würigler, 1995).

Para el análisis de las distribuciones del tamaño de los clones *mwh*, se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (K-S), prueba no paramétrica que permite medir el grado de concordancia entre dos distribuciones, comparando las frecuencias acumuladas de una distribución con las de otra. Cuando el valor de  $p < 0.05$  los resultados indican que hay diferencias significativas entre ambas distribuciones y por lo tanto una distribución es diferente de la otra.

## RESULTADOS

---

---

### TESTIGOS NEGATIVOS (DISOLVENTES)

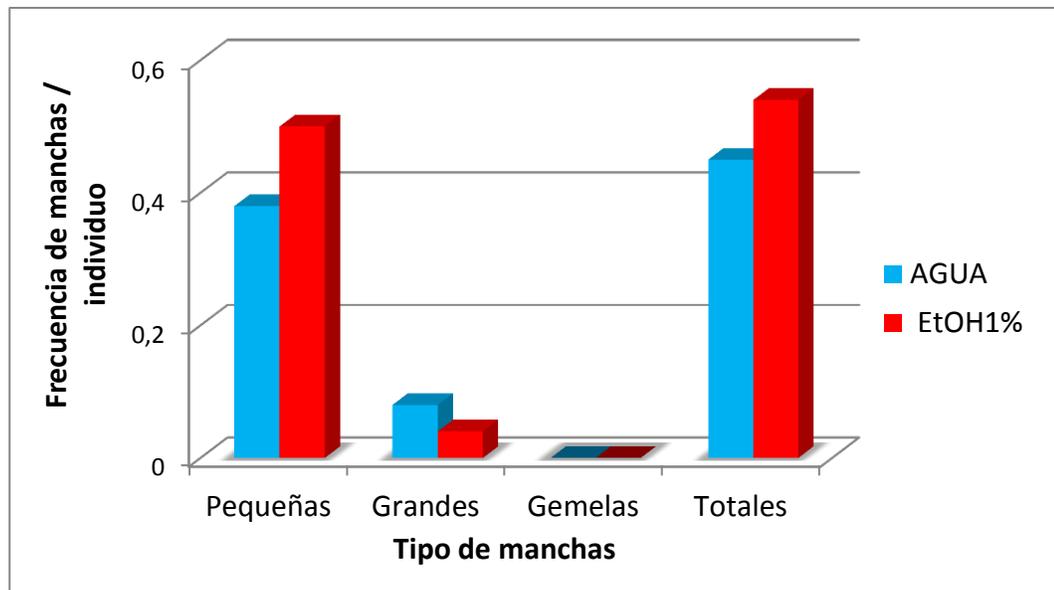
---

---

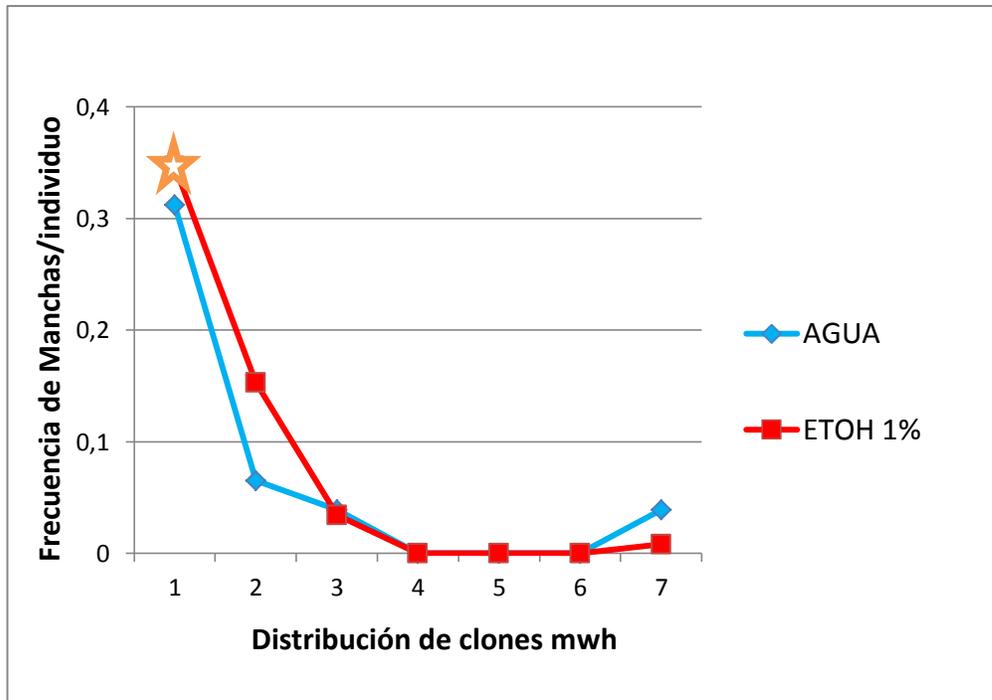
Las frecuencias y el tipo de manchas por individuo se compararon para cada testigo, tratamiento y co-tratamiento. Se muestran los resultados del estadístico  $\chi^2$  de la prueba SMART para PC (Frei y Würgler, 1988)

En la Tabla 2A y la Figura 7 se compara el testigo negativo Agua contra el testigo disolvente EtOH 1% (EtOH). Los resultados indican que no existen diferencias estadísticamente significativas en ningún tipo de manchas entre estos testigos.

En la Figura 8 se muestran los resultados del análisis de distribución de clones *mwh* de acuerdo con la prueba (K-S) y muestran diferencias estadísticamente significativas entre estos testigos.



**Figura 7. Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo de los testigos negativos ( $p < 0.05$ ).**



**Figura 8. Distribución de tamaño de clones mwh de los testigos negativos ( $p < 0.05$ ). El tamaño de clones indica los eventos de división celular de los discos imaginales de las alas de *D. melanogaster* [1(1), 2(2), 3(3-4), 4(5-8), 5(9-16), 6(17-32) 7(33 <) células].  Diferencia estadísticamente significativa.**

**Tabla II.** Resumen de los resultados obtenidos con SMART en ala de *D. melanogaster* para la progenie trans-heterocigota de la Cruza CE, después del tratamiento crónico en larvas ( $72 \pm 4$  h) con RES (0.010, 0.043 y 0.172 mM), solo y en Co-tratamiento con URE (20 mM). Como testigos negativos se usaron EtOH 1% y agua miliQ y como Testigo Positivo URE/EtOH y URE.

Tratamiento (Concentración)	Número De Individuos	Proporción del número de manchas/individuo y el 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>

**Cruza Estándar (CE)**

**2A)**

Agua	77	0.38	(029)		0.08	(006)		0.00	(00)		0.45	(035)		0.45 (035)
EtOH	118	0.50	(059)	-	0.04	(005)	-	0.00	(00)	-	0.54	(064)	-	0.54 (064)
<b>2B)</b>														
EtOH	118	0.50	(059)	-	0.04	(005)	-	0.00	(00)	-	0.54	(064)	-	0.54 (064)
URE/Agua	60	3.40	(204)	+	0.37	(022)	+	0.00	(00)	-	3.77	(226)	+	3.77 (226)
URE/EtOH	60	0.22	(013)		0.03	(002)		0.00	(00)		0.25	(015)		0.25 (015)

**2C)**

EtOH	118	0.50	(059)	-	0.04	(005)	-	0.00	(00)	-	0.54	(064)	-	0.54 (064)
------	-----	------	-------	---	------	-------	---	------	------	---	------	-------	---	------------

RES 0.010 mM	59	0.69	(041)	-	0.25	(015)	+	0.00	(00)	-	0.95	(056)	+	0.95 (056)
RES 0.043	58	0.50	(029)	-	0.09	(005)	-	0.00	(00)	-	0.59	(034)	-	0.59 (034)
RES 0.172	60	0.45	(027)	-	0.10	(006)	-	0.00	(00)	-	0.55	(033)	-	0.55 (034)

**2D)**

EtOH	118	0.50	(059)	-	0.04	(005)	-	0.00	(00)	-	0.54	(064)	-	0.54(064)
RES 0.010/URE	55	2.65	(146)	+	0.27	(015)	+	0.02	(01)	-	2.95	(162)	+	2.95 (162)
RES 0.043/URE	34	1.85	(063)	+	0.21	(007)	+	0.00	(00)	-	2.06	(070)	+	2.06 (070)
RES 0.172/URE	49	3.67	(180)	+	1.10	(054)	+	0.00	(00)	-	4.78	(234)	+	4.78 (234)

**2E)**

URE/EtOH	60	0.22	(013)		0.03	(002)		0.00	(00)		0.25	(015)		0.25 (015)
RES 0.010/URE	55	2.65	(146)	-	0.27	(015)	-	0.02	(01)	-	2.95	(162)	-	2.95 (162)
RES 0.043/URE	34	1.85	(063)	↓	0.21	(007)	-	0.00	(00)	-	2.06	(070)	↓	2.06 (070)
RES 0.172/URE	49	3.67	(180)	-	1.10	(054)	+	0.00	(00)	-	4.78	(234)	+	4.78 (234)

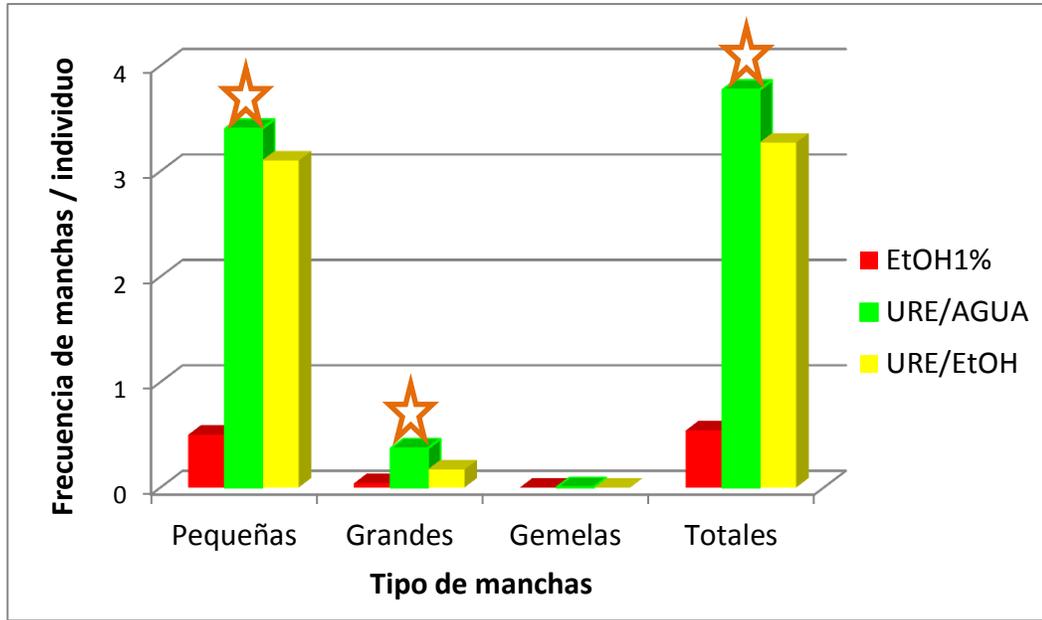
\* Diagnostico estadístico de acuerdo a Frei and Würzler (1988, 1995). Prueba estadística de una cola. m = factor de multiplicación del riesgo mínimo para evaluar resultados negativos. Resultados: -, negativo; +, positivo; ↓, reducción significativa ( $p < 0.05$ ).

## TESTIGOS POSITIVOS

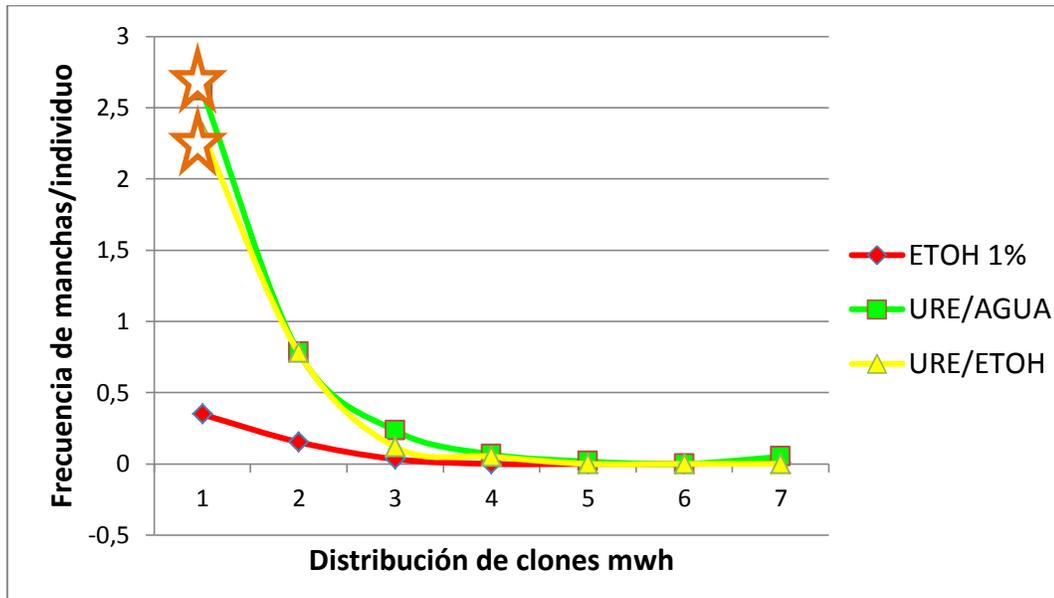
---

En la Tabla 2B y la Figura 9 se muestra la comparación del testigo disolvente EtOH contra los testigos positivos URE 20 mM/agua (URE) y URE 20 mM/EtOH 1 % (URE/EtOH). Como se esperaba, los resultados indican que los dos testigos positivos incrementaron estadísticamente la frecuencia de manchas pequeñas, grandes y totales contra el testigo disolvente EtOH. Por otro lado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún tipo de manchas entre los testigos positivos URE y URE /EtOH.

En la Figura 10 se muestran los resultados del análisis de distribución de clones *mwh* y de acuerdo con la prueba K-S muestra diferencias estadísticamente significativas entre los testigos positivos URE y URE/EtOH con respecto al testigo EtOH; mientras que no se encontraron diferencias estadísticas entre los dos testigos positivos.



**Figura 9. Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo del testigo EtOH 1 % y los testigos positivos ( $p < 0.05$ ).★ Diferencia estadísticamente significativa.**

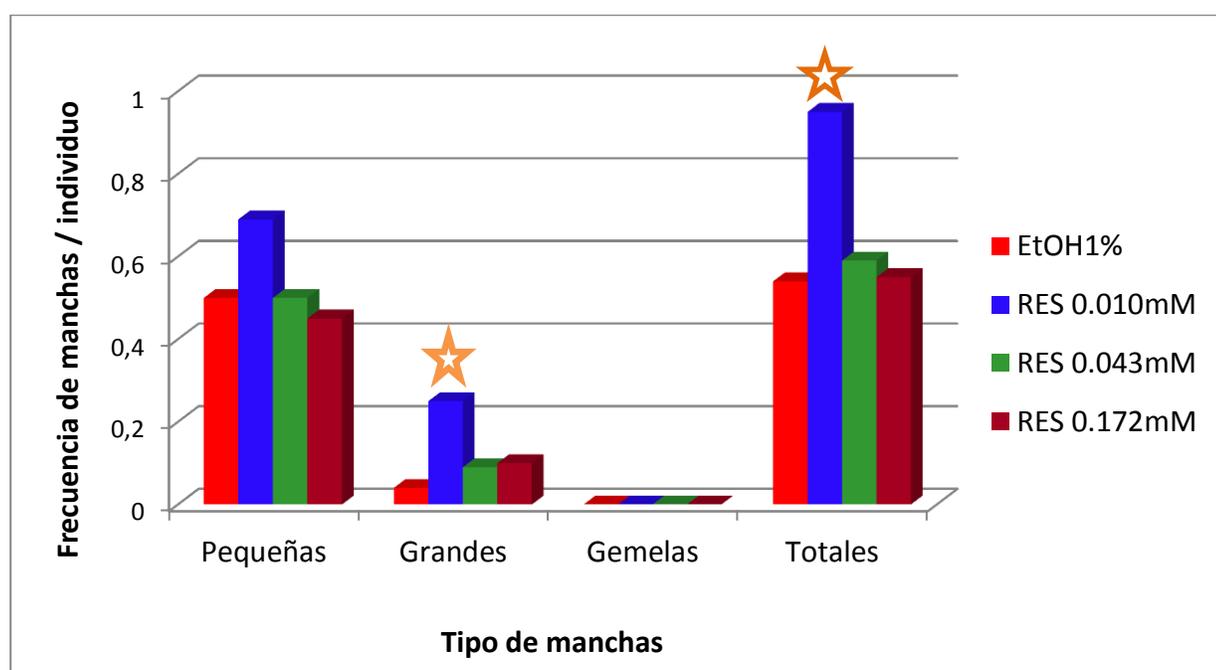


**Figura 10. Distribución de tamaño de clones mwh del testigo EtOH 1 % y los testigos positivos ( $p < 0.05$ ). El tamaño de clones indica los eventos de división celular de los discos imaginales de las alas de *D. melanogaster* [1(1), 2(2), 3(3-4), 4(5-8), 5(9-16), 6(17-32) 7(33 <) células].★ Diferencia estadísticamente significativa.**

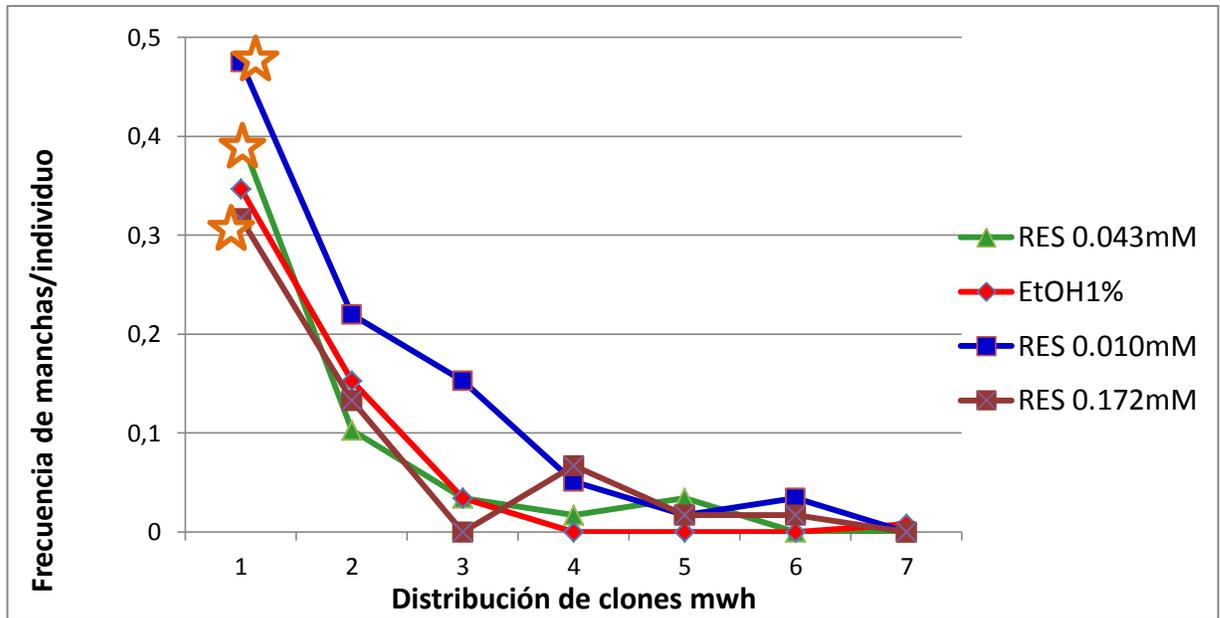
## TESTIGOS RESVERATROL (RES)

En la Tabla 2C y la Figura 11 se compara el testigo disolvente EtOH contra los testigos RES 0.010 mM , RES 0.043 mM y RES 0.172 mM Los resultados indican aumento estadísticamente significativo para manchas grandes y totales sólo para el testigo RES 0.010 con respecto al testigo EtOH.

En la Figura 12 se muestran los resultados del análisis de distribución de clones *mwh* y de acuerdo con la prueba K-S hay diferencias estadísticamente significativas entre todos los testigos RES con respecto al testigo EtOH.



**Figura 11. Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo del testigo EtOH 1 % y los testigos RES ( $p < 0.05$ ). ★ Diferencia estadísticamente significativa.**

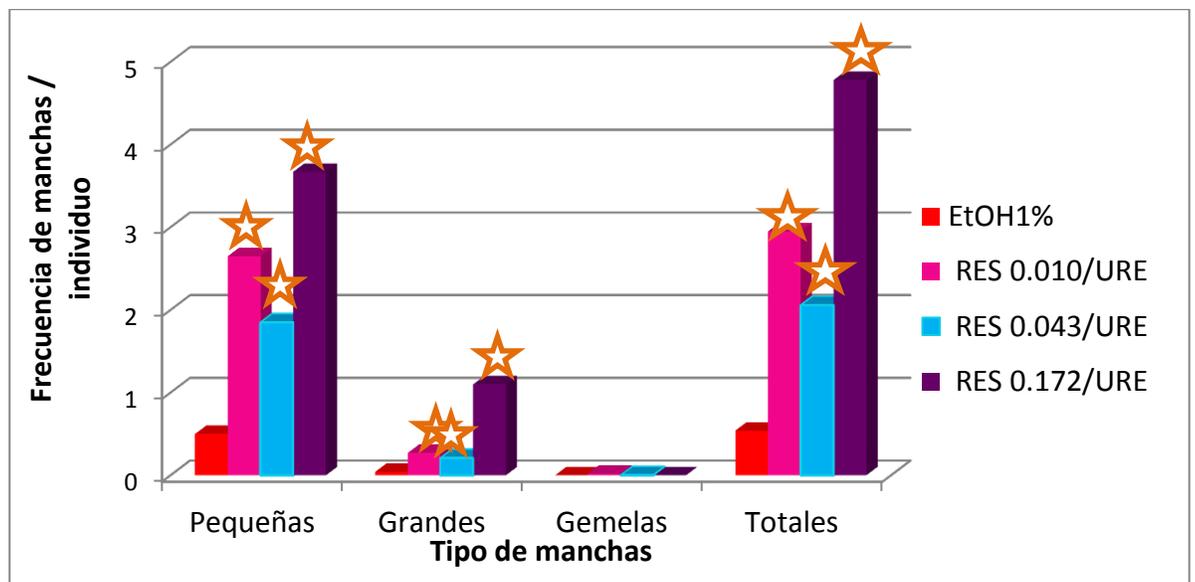


**Figura 12. Distribución de tamaño de clones mwh del testigo EtOH 1 % y los testigos RES ( $p < 0.05$ ). El tamaño de clones indica los eventos de división celular de los discos imaginales de las alas de *D. melanogaster* [1(1), 2(2), 3(3-4), 4(5-8), 5(9-16), 6(17-32) 7(33 <) células].  Diferencia estadísticamente significativa.**

## CO-TRATAMIENTOS RES-URE

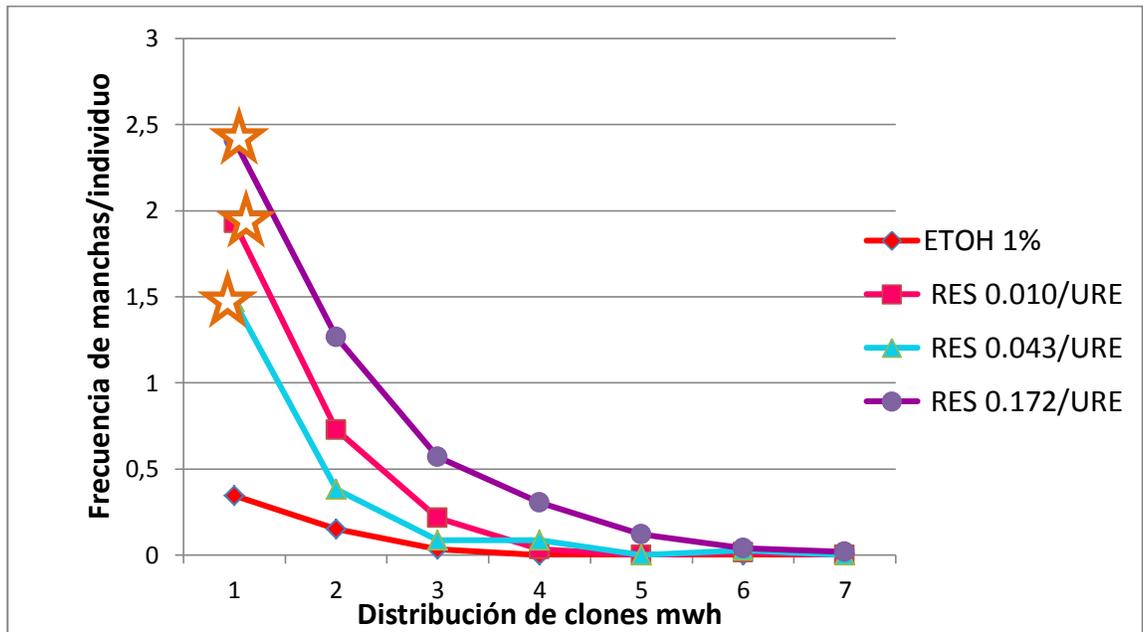
En la Tabla 2D y Figura 13 se muestra la comparación del testigo solvente EtOH contra los co-tratamientos RES 0.010 mM + URE/EtOH, RES 0.043 mM + URE/EtOH y RES 0.172 mM + URE/EtOH. Los resultados indican que todos los co-tratamientos incrementaron estadísticamente la frecuencia de manchas pequeñas, grandes y totales con respecto al testigo EtOH.

En la Figura 14 la distribución de clones *mwh* mostró que RES 0.010 mM + URE/EtOH, RES 0.043 mM + URE/EtOH y RES 0.172 mM + URE/EtOH contra EtOH presentan diferencias estadísticamente significativamente de acuerdo con los resultados de la prueba K-S.



**Figura 13. Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo del testigo EtOH 1 % y los co-tratamientos RES-URE ( $p < 0.05$ ).**

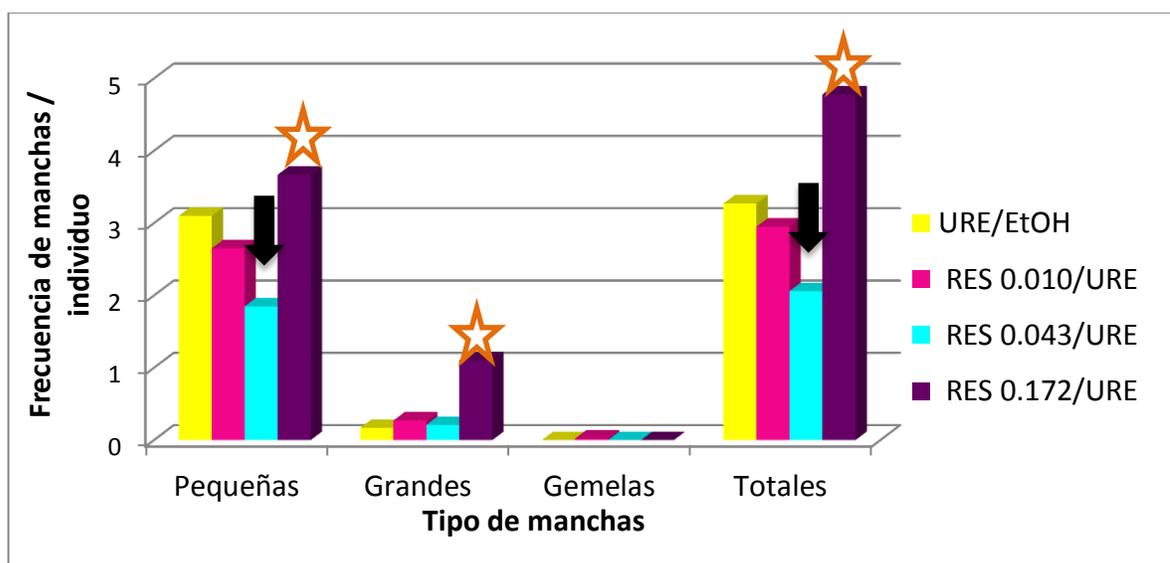
 **Diferencia estadísticamente significativa.**



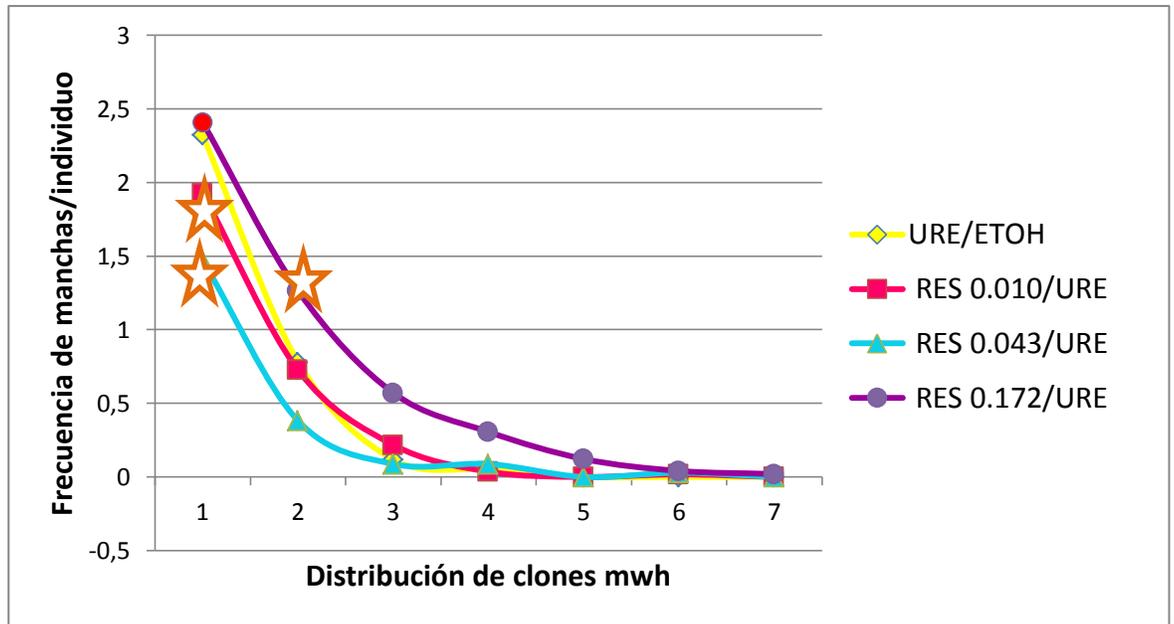
**Figura 14. Distribución de tamaño de clones mwh del testigo EtOH 1 % y los co-tratamientos RES-URE ( $p < 0.05$ ). El tamaño de clones indica los eventos de división celular de los discos imaginales de las alas de *D. melanogaster* [1(1), 2(2), 3(3-4), 4(5-8), 5(9-16), 6(17-32) 7(33 <)] células. ★ Diferencia estadísticamente significativa.**

En la Tabla 2E y Figura 15 se comparó el testigo positivo URE /EtOH contra los co-tratamientos RES 0.010 mM + URE/EtOH, RES 0.043 mM + URE/EtOH y RES 0.172 mM + URE/EtOH. Los resultados de SMART indican que el co-tratamiento RES 0.172 mM + URE/EtOH incrementó estadísticamente la frecuencia de manchas grandes y fue débil positivo (w) para manchas totales con respecto al testigo URE/EtOH. La prueba U de Mann-Whitney y Wilcoxon indicó que no existe diferencia estadísticamente significativa en manchas totales. Por otra parte, SMART mostró que el co-tratamiento RES 0.043/URE redujo débilmente (w) la frecuencia de manchas pequeñas y totales con respecto a URE/EtOH, reducción que fue confirmada con la prueba U.

Con la Prueba K-S, todos los co-tratamientos mostraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de clones *mwh* con respecto al testigo URE/EtOH.



**Figura 15. Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo del testigo positivo URE/EtOH 1 % y los co-tratamientos RES-URE ( $p < 0.05$ ). ★ Diferencia estadísticamente significativa.**



**Figura 16. Distribución de tamaño de clones mwh de los co-tratamientos RES-URE ( $p < 0.05$ ) Cruza Estándar. Los tamaño de los clones indican los eventos de división celular de los discos imaginales de las alas de *D. melanogaster* [1(1), 2(2), 3(3-4), 4(5-8), 5(9-16), 6(17-32) 7(33 <) células].★ Diferencia estadísticamente significativa.**

## DISCUSIÓN

### TESTIGOS NEGATIVOS

---

---

La frecuencia de manchas del testigo disolvente EtOH 1 % no presentó diferencias significativas con respecto al testigo Agua, por lo que en esta prueba y bajo estas condiciones el EtOH 1 % no produjo daño genotóxico como era de esperarse. Se ha reportado que las larvas son capaces de tolerar concentraciones de hasta 3 % de EtOH en condiciones de laboratorio (McKenzie y McKechnie, 1979). Estos hallazgos no concuerdan con el trabajo de Ribeiro y Gaivao (2010), quienes demostraron incremento significativo del daño al DNA en neuroblastos de *D. melanogaster* a las concentraciones de EtOH (1.25, 2.5 y 5 %), utilizando el Ensayo Cometa; concluyen que estos resultados fueron debidos a que el EtOH incrementó la producción de ROS y éstas a su vez generaron estrés oxidativo y rompimientos en la cadena del DNA. La discrepancia con respecto a los trabajos con SMART en ala podría deberse al tipo de ensayo utilizado, ya que SMART es un bioensayo *in vivo* en donde están implicados el metabolismo y los sistemas de reparación, entre otros (Rothfussa *et al.*, 2011). La desventaja más frecuente de las pruebas de genotoxicidad *in vitro* es que en la mayoría de los casos no son capaces de imitar las condiciones metabólicas y la biodisponibilidad que se presentan en los organismos vivos. Por ende, es necesario que un resultado positivo de genotoxicidad en sistemas *in vitro* sea comprobado en un sistema *in vivo* (Kluwe, 1995), como es SMART en ala.

Por otra parte, se encontró que el testigo EtOH 1 % modificó la división celular de las células imaginales del ala; esto podría concordar con el trabajo de Hoffman y Parsons (1983) quienes reportaron que la exposición a concentraciones de EtOH (0.1 - 1.5 %) presenta efectos benéficos en la tasa de supervivencia y descendencia de *D. melanogaster*. Asimismo, David *et al.*, (1976) y Geer *et al.*, (1988) reportaron que *D. melanogaster* es un modelo biológico tolerante al efecto tóxico del EtOH y más aún, es capaz de utilizarlo como fuente de energía. Dado

que *Drosophila* es un organismo que vive en lugares donde ocurre la fermentación alcohólica y se cuenta con los reportes mencionados arriba, no se esperaba que el EtOH 1% modificara la división de las células de los discos imaginales del ala. Sin embargo, el análisis estadístico con la prueba K-S de la distribución de los clones *mwh* no permite determinar si el cambio fue positivo o negativo para el desarrollo de las alas, solamente puede afirmarse que la dinámica de la división celular se alteró por efecto del EtOH 1 %.

## TESTIGOS POSITIVOS

---

Los testigos positivos (URE y URE/EtOH) fueron genotóxicos a la concentración 20 mM; esto era de esperarse ya que Frölich y Würgler, en 1990, reportaron el efecto genotóxico del URE a esta concentración en la craza CE de SMART en ala de *D. melanogaster*. El URE es un compuesto promutágeno cancerígeno que al ser metabolizado genera epóxidos los cuales pueden ocasionar daño al material genético. En la prueba de Ames, el URE ha demostrado ser promutagénico dado que requiere activación de los P450 (Anderson y Styles, 1978); y se ha demostrado que el CYP4502E1 es el responsable de su metabolismo en mamíferos (Yamamoto *et al.*, 1990; Forket y Lee 1997; Lee *et al.*, 1998)

Nomura *et al.* (1979) encontraron que el URE es capaz de inducir una alta frecuencia de mutaciones letales recesivas en *D. melanogaster*. Como se esperaba, los mayores incrementos significativos encontrados en el presente trabajo corresponden a la frecuencia de manchas pequeñas; de esta manera se reconoce que el efecto genotóxico producido por el URE debe haber ocurrido en el desarrollo tardío de la larva, tal como se observa para los compuestos promutágenos.

## URE vs URE/EtOH

La explicación del por qué no se encontraron efectos positivos con el EtOH 1% en la prueba SMART, y en la distribución de clones *mwh* entre los testigos positivos URE/Agua y URE/EtOH, quizá se deba a que la concentración del EtOH que utilizamos fue muy baja (1 %) para modificar la respuesta al URE.

## TESTIGOS RESVERATROL (RES)

---

En el presente trabajo se encontró que el RES a la concentración 0.010 mM produjo incremento estadísticamente significativo en la frecuencia de manchas grandes y totales, y las concentraciones 0.043 y 0.172 mM fueron negativas con respecto al testigo EtOH 1%; esto indica que en esta prueba el RES 0.010 mM fue genotóxico para *Drosophila*, resultado que concuerda con el trabajo de Gómez, quien recientemente, en el 2013, demostró que la concentración 0.010 mM fue genotóxica en la cruza E de SMART en ala. Gómez (2013), obtuvo genotoxicidad con la concentración de 0.043 mM y ausencia de daño con 0.172 mM y este último concuerda con este trabajo. Se ha reportado la genotoxicidad y la citotoxicidad del RES en trabajos *in vitro*; Schmitt *et al.* (2002) demostraron que el RES exhibe un potencial genotóxico a concentraciones mayores de 0.043 mM induciendo micronúcleos y desplazamiento metafásico de cromosomas en células L5178Y de linfoma de ratón. Además, Matsuoka *et al.* (2001) demostraron la genotoxicidad del RES a las concentraciones 0.011, 0.022, 0.044 y 0.099 mM en células pulmonares de hámster chino (CHL), en la prueba de Aberraciones Cromosómicas (CA) y la prueba de micronúcleos (MN).

Con la prueba K-S se determinó que las tres concentraciones de RES probadas alteraron la división celular con respecto al testigo EtOH 1%; esto concuerda con Scott (2002) quien determinó que los isómeros de RES (*cis* y *trans*) a la concentración 0.050 mM disminuyeron el crecimiento de células MCF-7 por citotoxicidad y con Schmitt *et al.* (2002) quienes demostraron que el RES a la

concentración 200 mM presenta efecto tóxico en células de linfoma de ratón L5178 y V79 de hámster chino. Por lo anterior, se infiere un efecto citotóxico del RES en las células imaginales que dieron origen a las alas de las moscas tratadas.

## CO-TRATAMIENTOS RES-URE

---

---

Los resultados obtenidos con SMART indicaron que el RES a la concentración 0.043 mM redujo significativamente la frecuencia de manchas pequeñas y totales con respecto al testigo URE/EtOH lo cual podría indicar un efecto quimiopreventivo por parte del RES al disminuir el daño genotóxico provocado por el URE. Como sabemos, la célula presenta varios mecanismos de protección contra agentes genotóxicos, citotóxicos, clastogénicos, etcétera, y uno de los mecanismos más importantes es la apoptosis que se encarga de eliminar las células dañadas, evitando una descontrolada división celular inducida por cualquier agente genotóxico. Yun Lin y colaboradores (2011) determinaron la capacidad del RES de activar a *p53*, induciendo de esta forma la detención del ciclo celular (arresto) o la apoptosis. *p53* es una proteína supresora de tumores que está presente en niveles bajos en células normales, la activación de *p53* es el resultado del daño al DNA y también está implicado en varios aspectos como la detención del ciclo celular, la muerte por apoptosis, la integridad del genoma y la reparación del DNA. Zigang (2003) reportó que el RES induce apoptosis en diversas líneas celulares de cáncer de colon, mama, próstata, leucemia y en células JB6I epidérmicas de ratón, a concentraciones de 0.013 a 0.172 mM induce la apoptosis. Gescher y Steward (2003) reportan que el RES induce efecto quimiopreventivo en ratón a dosis (0.2-2 mg / Kg) e *in vitro* el RES presentó efecto quimiopreventivo en concentraciones de 0.005 a 0.100 mM.

De acuerdo con la literatura revisada otra posible causa del efecto quimiopreventivo del RES podría deberse a la inhibición de ciertos CYP450s. Lucas *et al.* (2004) mencionaron que el RES es un potente inhibidor de cuatro CYP450s: CYP1B1, CYP3A4, CYP3A5 y CYP2E1.este ultimo activan compuestos pro-cancerígenos como el URE También Revel *et al.* (2003) demostraron que el RES es capaz de reducir significativamente la genotoxicidad del benzopireno en tejido pulmonar *in vitro* mediante la inhibición del CYP1A1 que metaboliza a este último.

Por otro lado, los resultados obtenidos con SMART determinaron que el co-tratamiento con RES a la concentración 0.172 mM causó daño genotóxico en *D. melanogaster*. Se propone que este resultado sea a un posible efecto pro-oxidante del RES en las células de los discos imaginales de las alas que aunado a la genotoxicidad del URE y la sobreproducción de ROS, como lo mencionan Chun *et al.*, 2013 quienes demostraron que el URE provoca una sobreproducción de ROS en células de leucemia de ratón

RES es bien conocido por sus propiedades antioxidantes, sin embargo, presenta efectos citotóxicos y pro-oxidantes en función de su concentración y el tiempo de exposición. (Leo *et al.*, 2013). En efecto, RES induce detención del ciclo celular generando ROS que son activadas por vía mitocondrial y esto conduce a la apoptosis. Cada antioxidante es de hecho un agente redox (reducción-oxidación) por lo tanto podría ser un pro-oxidante para acelerar la lipoperoxidación y/o inducir el daño en el DNA en condiciones especiales (Lastra y Villegas 2007). En apoyo de lo anterior, se han revelado efectos pro-oxidantes de antioxidantes como vitaminas y varias clases de polifenoles de origen vegetal, tales como los flavonoides taninos (Rahman *et al.*, 1990)

Estas afirmaciones concuerdan con Leo *et al.* (2013) quienes revelaron que el tratamiento durante 24 h a dosis entre 0.215 y 1 mM de el RES provocó un efecto pro-oxidante. Ahmad *et al.* (2004) demostraron que las concentraciones de el RES 0.004 0.008 mM aplicadas a células de leucemia humana tuvieron efectos pro-

oxidantes en co-tratamiento con el oxidante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aumentando los radicales superóxido. Fukuhara y Miyata (1998) informaron por primera vez la actividad prooxidante del RES en un ensayo de escisión del DNA de un plásmido, basado en la presencia de iones de metales de transición tal como el cobre; la degradación del DNA por el RES fue mayor en presencia de cobre (10-100 mM) y menor en su ausencia (200 mM de RES).

En resumen, se puede afirmar que los efectos que provoca el RES se deben a: 1) Provoca genotoxicidad y citotoxicidad 2); Induce la apoptosis 3) La producción de ROS; 4) A que es un agente redox; 5) La Inhibición de algunos CYP450S

Por lo anterior, los co-tratamientos de RES con el URE pudieron haber generado cualquiera de los eventos descritos para RES, sumados a la genotoxicidad y la sobreproducción de ROS por el URE Chun *et al.*, 2013, lo cual incrementó significativamente la frecuencia de clones mutantes con la concentración de 0.172 mM.

Nuestros resultados indicaron que el RES no actúa dosis –respuesta debido a que la concentración (0.043 mM) encontramos un efecto quimiopreventivo y a otra (0.172 mM) un efecto genotóxico mayor

Con la prueba K-S se obtuvo que las tres concentraciones de RES utilizadas en los cotratamientos alteraron la división celular con respecto al testigo URE/EtOH; esto concuerda con los resultados de dos trabajos en los que dependiendo de la dosis, se altera la división celular de manera diferente: Tolo *et al.* (2012) reportaron que el RES a concentraciones > 0.020 mM induce muerte celular en células de carcinoma de vejiga urinaria ECV304, mientras que a concentraciones < 0.020 mM es capaz de promover la proliferación (Shakibaei *et al.*, 2009).

Por todo lo anterior, los resultados obtenidos en este trabajo refuerzan la idea de Berardi *et al.* (2009) de que los efectos “benéficos” del RES se muestran más bien como consecuencia de un daño severo provocado por esta fitoalexina.

## CONCLUSIONES

---

Se concluye que el RES es genotóxico y que modula la genotoxicidad del URE dado que:

- ✓ Se confirmó que el RES 0.010 mM tuvo el efecto genotóxico reportado por Gómez-López en el 2013.
- ✓ La concentración 0.043 mM del RES disminuye significativamente el daño causado por el promutágeno URE lo que cumple con la definición de un efecto quimiopreventivo.
- ✓ La concentración 0.172 mM del RES mostró incremento significativo del daño provocado por el URE, lo cual puede atribuirse a un posible efecto pro-oxidante por parte del RES, que se sumó al efecto genotóxico de URE.
- ✓ Ni las concentraciones 0.043,0.172 mM del RES fueron genotóxicas, ni la concentración 0.010 mM modificó la genotoxicidad del URE.
- ✓ Los tratamientos y co-tratamientos con RES siempre modificaron la división celular con respecto a su testigo.

## RECOMENDACIONES:

---

- ✓ Ampliar el rango de concentraciones intermedias para los co-tratamientos RES-URE.
- ✓ Reconocer el efecto de los CYP450s sobre el RES mediante el uso de la cruza bioactivación elevada de la prueba SMART.
- ✓ Identificar los CYP450s que pudieran metabolizar el RES mediante técnicas de biología molecular.
- ✓ Medir el efecto apoptótico del RES usando marcadores apoptoticos.

## BIBLIOGRAFIA

---

- ✓ Aggarwal B., Bhardwaj A., Aggarwal S., Seeram P., Shishodia S. and Takada Y. (2004). Review role of Resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Research*. **24**: 3-48.
- ✓ Ahmad KA., Clement MV., Hanif IM. and Pervaiz S. (2004). Resveratrol inhibits drug-induced apoptosis in human leukemia cells by creating an intracellular milieu non permissive for death execution. *Cancer Research*. **64**: 1452-1459,
- ✓ Allen JW., Sharief Y. and Langenbach, RJ. (1982). An overview of ethyl carbamate (urethane) and its genotoxic activity, Schaich, *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Plenum Press, New York, pp. 443-460.
- ✓ Amorós G. (2001). Estudio de mutantes del cromosoma III de *Drosophila melanogaster*, el gen *ash-2* como regulador de diferenciación celular. Departamento de Genética de la Facultad de Biología, Universidad de Barcelona. pp. 165.
- ✓ Anderson D. and Styles JA. (1978). An evaluation of 6 short-term tests for detecting organic chemical carcinogens, Appendix 2, the bacterial mutation test, *Br. Journal of Cancer*. **37**: 924–930.
- ✓ Bateman AJ. (1976). The mutagenic action of urethane. *Mutation Research*. **39**: 75-96.
- ✓ BATF (Bureau of Alcohol, Tobacco and Firearms). (1987). Final cumulative information 1986-1987, Ethyl carbamate testing by all ATF laboratories. Cumulative as of 9/1/87.

- ✓ BATF (Bureau of Alcohol, Tobacco and Firearms). (1988). Final cumulative information 1988, Ethyl carbamate testing by all ATF laboratories. Cumulative as of 9/16/88.
  
- ✓ Berardi, V., Ricci, F., Castelli, M., Galati, G. y Risuleo, G., (2009). Resveratrol exhibits a strong cytotoxic activity in cultured cells and has an antiviral action against polyomavirus: potential clinical use. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. Vol. 28, 96.
  
- ✓ Bordons A., Gil J., Araque I., Carreté R. and Reguant C. (2004). Estudios para minimizar la producción de aminas biógenas y de carbamato de etilo por parte de las bacterias lácticas (En línea) fecha de acceso 5 de enero del 2013, disponible en [http://www.haro.org/pdf/resumen\\_bordons\\_haro2004.pdf](http://www.haro.org/pdf/resumen_bordons_haro2004.pdf).
  
- ✓ Brusick D. (1988). Principles of genetic toxicology. 2ª. Ed. Plenum Press, Nueva York , E.U. 284 pp.
- ✓ Castañeda P., Heres P. y Dueñas G. (2008). *Drosophila melanogaster*, un modelo experimental. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México, D. F. 86 pp
  
- ✓ Castell JV. (2005). Metabolismo de fármacos y hepatotoxicidad. *Revista Toxicology* **13**: 1007-1024.
  
- ✓ Celniker SE. and Rubin GM. (2003). The *Drosophila melanogaster* genome. *Annu. Revista. Genomics Human. Geneict.* **4**: 89-117.
  
- ✓ Chun H S., Young N., Chaekyun K.,(2013) Urethane increases reactive oxygen species and activates extracellular signal-regulated kinase in RAW 264.7 macrophages and A549 lung epithelial cells. *Archives of Pharmacal Research.* 36:775–782

- ✓ Cottart CH., Antoine VN., Morizot CL. and Beaudeau JL. (2010). Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. *Molecular Nutrition Food Research*. **54**: 7-16.
  
- ✓ David JR., Bocquet C., Arens MF. and Fouillet P. (1976). Biological role of alcohol dehydrogenase in the tolerance of *Drosophila melanogaster* to aliphatic alcohols: utilization of an ADH-null mutant. *Biochemical Genetics*. **14**: 989-997.
  
- ✓ Dercks W. and Creasy LL. (1989). The significance of stilbene phytoalexins in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **34** 189–202.
  
- ✓ Donato MT. (2009). Qué es el Citocromo P-450 y cómo funciona. Instituto de España, Real Academia Nacional de Farmacia, Realigraf Madrid, Spain. Fecha de acceso: 30-09-2013. Obtenido de: <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/515/533>.
  
- ✓ Dueñas G. I. E., Heres P. M. E., Castañeda L. and U. Graf. (2002). Easy raising of *Drosophila melanogaster* on a medium consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. *Drosophila Information Service*. **84**: 166 p.
  
- ✓ Dueñas GIE., Heres P, ME., Castañeda L. and Graf U. (2001). Easy raising of *Drosophila melanogaster* on a medium consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. *Drosophila Information Service*. **84**: 166-170
  
- ✓ Forkert PG., y Lee RP. (1997) Metabolism of ethyl carbamate by pulmonary cytochrome P450 and carboxylesterase isozymes: involvement of CYP2E1 and hydrolase A. *Toxicology and Applied Pharmacology* **146**:245–254.

- ✓ Fossa AA., Baird WM. and Carlson GP. (1985). Distribution of urethane and its binding to DNA, RNA, and protein in SENCAR and BALB/c mice following oral and dermal administration. *Journal of toxicology and environmental health.* **15**: 635-54.
  
- ✓ Frei H. and Würgler F. (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. (1995). Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Research.* **334**: 247-258.
  
- Frölich A. and Würgler FE. (1990). Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing spot test: dependence on genotype-controlled metabolic capacity. *Mutation Research.* **244**: 201-208.
  
- ✓ Fukuhara K., y Naoki M.(1998) Resveratrol as a new type of dna-cleaving agent. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 8 : 3187-3192
  
- ✓ Geer W., Stephen W., McKechnie F., Bentleyj M., Oakeshott G. and Langevin, J. (1988). Induction of alcohol dehydrogenase by ethanol in *Drosophila melanogaster*. *Nutrition and Gene Expression.***118**: 398 – 407.
  
- ✓ Gescher AJ. and Steward WP. (2003). Relationship between mechanisms, bioavailability, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: a conundrum. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* **12**: 953–957.

- ✓ Gómez S. (2013) “Evaluación del efecto genotóxico del resveratrol en la prueba de mutación y recombinación somáticas en ala de *Drosophila melanogaster* cruza estándar (CE). Tesis de licenciatura FES Iztacala Universidad Nacional Autónoma de México., UNAM.
  
- ✓ Graf U., Abraham SK., Guzmán JR. and Würgler FE. (1998). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*. **402**: 203–209.
  
- ✓ Graf U., Wurgler F., Katz A., Frei H., Juon H., Hall C. and Kale P. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **6**: 153–188.
  
- ✓ Guengerich P., Chun F., Kim J. and Gillam D. (2003). Cytochrome P450 1B1: a target for inhibition in anticarcinogenesis strategies. *Mutation Research*. **523**: 173-182.
  
- ✓ Guzmán RJ. and Graf U. (1995). *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change: a Handbook. Edited by Butterworth, F. M., Corkum, L.D., and Guzmán-Rincón, J. (Eds) Plenum Publishing Corp. pp. 169 - 181.
  
- ✓ Heres P, ME., Dueñas G, IE., Castañeda P, L., Santos C, LF., Vega C, V., Rebollar V, R., Gómez L, JC. and Durán D, A. (2010). Genotoxicity studies of organically grown broccoli (*Brassica oleracea* var. italica) and its interactions with urethane, methyl methanesulfonate and 4-nitroquinoline-1-oxide genotoxicity in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology*. **48** (1): 120-128.

- ✓ Hoffler U., Dixon D., Peddada S., and Ghanayema B. I. (2005). Inhibition of urethane-induced genotoxicity and cell proliferation in CYP2E1-null mice. *Mutation Research*. **24**: 57258–57272.
  
- ✓ Hoffmann, A. A., Parsons, P. A. (1983). Olfactory response and resource utilization in *Drosophila*: interspecific comparisons. *Biological Journal of the Linnean Sociey* 22: 43-53.
  
- ✓ Howitz KT. (2003). The first evidence that resveratrol is an activator of sirtuin deacetylases and extends the lifespan of *S. cerevisiae*. *Nature*. **425**: 191–196.
  
- ✓ Hubner P., Groux PM., Weibel B., Sengstag C., Horlbeck J., Leong-Morgenthaler PM. and Luthy J. (1997). Genotoxicity of ethyl carbamate urethane/ in Salmonella, yeast and human lymphoblastoid cells. *Mutation Research*. **46**: 11–19.
  
- ✓ International Agency for Research on Cancer. (1987). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs Volumes 1 a 42. Lyons, Francia.
  
- ✓ Kluwe WM. (1995). The complementary roles of *in vitro* and *in vivo* tests in genetic toxicology assessment regulatory toxicology and pharmacology. *Regulatory toxicology and pharmacology*. **22**: 268–272.
  
- ✓ Langcake P. and Pryce R. (1977). A new class of phytoalexins from grapevines. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **33**: 151-152.

- ✓ Lastra AC., Villegas I. 2007. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society Transactions*. 35: 1156-1160
  
- ✓ Lee RP., Parkinson A., y Forkert PG., (1998) Isozyme-selective metabolism of ethyl carbamate by cytochrome P450 (CYP2E1) and carboxylesterase (hydrolase A) enzymes in murine liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*. 26:60–65.
  
- ✓ Leo A. Meira M., • Baárbara P., Guilherme B., Pettenuzzo Souza J., Claudio F., Moreira Radovan B., Carmem G., Rodrigues G. (2013) Resveratrol Induces Pro-oxidant Effects and Time-Dependent Resistance to Cytotoxicity in Activated Hepatic Stellate Cells. *Cell Biochem Biophys*. DOI 10.1007/s12013-013-9703-8
  
- ✓ Lucas D., Piver B., Berthou F., and Dreano Y. (2004). Inhibition of CYP3A, CYP1A and CYP2E1 activities by resveratrol and other non-volatile red wine components. *Toxicology Letters*. **125**: 83–91.
  
- ✓ Martínez PI. (2000). Quimiopreención del cáncer. *Revista Cubana de Oncología*. **16**: 67-71.
  
- ✓ Matsuoka A., Furata A., Ozaki M., Fukuhara K. and Miyata N. (2001). Resveratrol, a natural occurring polyphenol, induces sister chromatid exchanges in a Chinese hamster lung (CHL) cell line. *Mutation Research*. **494**: 107–113.
  
- ✓ McKenzie JA. and McKechnie SW. (1979). A comparative study of resource utilization in natural populations of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Oecologia*. **40**: 299-309.

- ✓ Millán, F.P., Serrano, G.S., Expósito M.I. 2008. Resveratrol, nuevos retos en el tratamiento antienvjecimiento. Hospital Arnau de Vilanova. 66-70.
- ✓ Miller, J. A., Miller, E. C. (1983). The metabolic activation and nucleic acid adducts of naturally-occurring carcinogens: Recent results with ethyl carbamate and the spice flavors safrole and estragole. *British Journal of Cancer*. **48**: 1-15.
- ✓ Mitruț P.,Burada FL., Aurelia E., Scorei R., Badea D., Genunche A.,- Dumitres C.,. Rogo Z., Mădălina M. (2009) The genotoxicity study of resveratrol in primary gastric adenocarcinoma cell cultures*Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 50(3):429–433.Original Paper
- ✓ Nomura T. (1979). Potent mutagenicity of urethane (ethyl carbamate) gas in *Drosophila melanogaster*. *Cancer Research*. **39**: 4224-4227.
- ✓ Osman M., Abdel-M., Hadeel M Bayoumi S., Zoheir A y Mohamed F (2012) Modulation of doxorubicin cytotoxicity by resveratrol in a human breast cancer cell line *Cancer Cell International* 4: 12:47<http://www.cancerci.com/content/12/1/47>
- ✓ Peñalver MI. (2000). Quimioprevención del cáncer. *Revista Cubana de Oncología*. **16**: 67-70.
- ✓ Plant N. (2003). *Molecular Toxicology*. Bios Sci. Pub., London, 145 pp.
- ✓ Quincozes S, Andrezza, C.; Gonçalves, A. y Gottfried, C. (2010): Actions of redoxactive redoxactive compound resveratrol under hydrogenperoxide insult in C6 astroglial cells. *Toxicology. In Vitro*, 24(3): 916-920

- ✓ Ragione FD., Cucciolla V., Criniti V., Indaco S., Borriello A. and Zappia V. (1998). p21Cip1 gene expression is modulated by Egr1: a novel regulatory mechanism involved in the resveratrol antiproliferative effect. *The Journal of Biological Chemistry*. **278**: 23360-23368.
  
  - ✓ Revel A., Raanani H., Younglai E., Xu J., Rogers I., Han R., Savouret JF. and Casper RF. (2003). Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects lung from DNA damage and apoptosis caused by benzo (a) pyrene. *Journal of Applied Toxicology*. **23**: 255-261.
- 
- ✓ Ribeiro PI. and Gaivao I. (2010). Efeito genotóxico do etanol em neuroblastos de *Drosophila melanogaster*. *Saude Publica*. **28** (2): 199-204.
  
  - ✓ Ribovich ML., Miller EC., Miller JA. and Timmins LG. (1982). Labeled I,N6-ethenoadenosine and 3,N4-etheno cytidine in hepatic RNA of mice given [ethyl-I,2-3H] or [ethyl-I-4C] ethyl carbamate (urethane). *Carcinogenesis*. **3**: 539--546.
  
  - ✓ Robert E., King J., Bomser A. and David B. (2006). Bioactivity of Resveratrol. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **5**: 65-70.
  
  - ✓ Rothfussa A., Masamitu H., Czichc A., Marilyn AJ., Burlinsone B., Sheila G.,, Shuichi H., Kirklandh D., Heflich,R, H., Howej J., Madoka N., O'Donovanl, M. (2011). Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: Combination of acute tests and integration into standard toxicity testing. *Mutation Research*. **723**: 108–120.

- ✓ Sakano KS., Oikawa Y. and Kawanishi S. (2002). Metabolism of carcinogenic urethane to nitric oxide is involved in oxidative DNA damage. *Free Radical Biology & Medicine.*, **33**: 703-714.
- ✓ Scherer EH., Winterwerp P., and Emmelot A. (1986). Modification of DNA and metabolism of ethyl carbamate in vivo: formation of 7-(2-oxoethyl) guanine and its sensitive determination by reproductive tritiation using <sup>3</sup>H-sodium bromohydride, *IARC Sci. Pub.* **70**: 109-125.
- ✓ Schmitt E., Lehmann L., Metzler M. and Stopper, H. (2002). Hormonal and genotoxic activity of resveratrol. *Toxicology Letters.* **136**: 133 - 142.
- ✓ Scott MD. (2002). Toxicological Summary for *trans*-resveratrol. National Institute of Environmental Health Sciences. pp 1-64.
- ✓ Shakibaei M., Harikumar KB., Aggarwal BB. (2009). Resveratrol addiction: to die or not to die. *Molecular Nutrition & Food Research.* **53**:115–28.
- ✓ Silva MV., Loureiro A. and Falcao A. (2008). Effect of food on the pharmacokinetic profile of *trans*-resveratrol. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics.* **46**: 564-570.
- ✓ Toloï T., Stocco B., Toledo K., Salvador M., Paulo M., Koyama N. and Regina M. (2012). Dose-dependent effect of Resveratrol on bladder cancer cells: Chemoprevention and oxidative stress. *Maturitas.* **72**: 72– 78.
- ✓ Uthurry CA., Varela F., Colomo B., Suárez L., Lombardero J., García del Hierro JR. (2004). Ethyl carbamate concentrations of typical Spanish red wines. *Food Chemistry.* **88**: 329-336.

- ✓ Valenzano DR. (2006). Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a shortlived vertebrate. *Current biology journal*. **16**: 296–300.
  
- ✓ Vázquez C. B. (2010). Farmacología principios básicos general. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México, D. F. 211 pp
  
- ✓ Viña, J., Gambinia, J., Gruesob,R., López,G., -González, O., Inglés, M., Abdelazida, K., Vicent Bonet-C., y Consuelo B. (2013). Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas. *Revista Española Geriátría y Gerontología*. **426**: 2-10.
  
- ✓ Vogel, E.W. (1991) Genotoxic chemicals. An Introduction into basic principles of genetic toxicology. Sylvius Lab., Holanda. 66 pp.
  
- ✓ Vogel, EW., Graf U., Frei H. and Nivard M, MJ. (1999). The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. *IARC Scientific Publications*. **146**: 427–470.
  
- ✓ Wild D. (1991). Micronucleus induction in bone marrow by vinyl carbamate, a hypothetical metabolite of the carcinogen urethane (ethyl carbamate). *Mutation Research*. **260**: 309-310.
  
- ✓ Wolter F., Akoglu B., Clausnitzer A. and Stein J. (2001). Down regulation of the cyclin D1/Cdk4 complex occurs during resveratrol-induced cell cycle arrest in colon cancer cell lines. *Journal of nutrition*. **131**: 2197-2203.

- ✓ Woo Cha S., Gu HK., Lee KP., Lee MH., Han SS., and Jeong TC. (2000). Immunotoxicity of ethyl carbamate in female BALB/c mice: role of esterase and cytochrome P450. *Toxicology Letters*. **115**: 173-181.
  
- ✓ Xu C., Li Y. and Kong A. (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of Pharmacal Research*. **28**: 249–268.
  
- ✓ Yamamoto T., Pierce WM., Hurst Jr., Chen HE., y Waddell WJ., (1990) Ethyl carbamate metabolism—in vivo inhibitors and in vitro enzymatic systems. *Drug Metabolism and Disposition*,**18**:276–280.
  
- ✓ Yan, Y., Yang, J., Chen, G., Mou, Y., Zhao, Y., Pan, L., Ma, C., Liu, X., Wu, C. 2011. Protection of resveratrol and its analogues against ethanol-induced oxidative DNA damage in human peripheral lymphocytes. *Mutation Research* **721**:171-177.
  
- ✓ Yu C., Shin YG., Kosmeder JW., Pezzuto JM. and Van-Breemen RB. (2003). Liquid chromatography/tandem mass spectrometric determination of inhibition of human cytochrome P450 isozymes by resveratrol and resveratrol-3-sulfate. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**: 307–313.

### METABOLISMO XENOBIOTICO (MX)

Cada vez el ser humano está más sujeto a la exposición de diversas sustancias químicas extrañas al cuerpo (xenobióticos), estos pueden ser medicamentos, aditivos en alimentos, contaminantes ambientales, cosméticos, pesticidas, etc.

Estos compuestos pueden acceder a nuestro cuerpo mediante, Ingestión, inhalación, por vía parenteral o a través de la piel. Los xenobióticos no son utilizados como nutrientes, por lo que no se incorporan en las rutas bioquímicas del metabolismo y tampoco son degradados por estas vías. (Castell, 2005).

Se trata, en general, de compuestos de naturaleza lipofílica, por lo que pueden atravesar con relativa facilidad las membranas biológicas, acceder al interior de las células y unirse a estructuras celulares de carácter lipofílico (Donato, 2009).

El metabolismo xenobiótico (MX), es un conjunto de reacciones que sufre el xenobiótico para ser excretado modificando su estructura química, a este conjunto de reacciones se le llama BIOTRANSFORMACIÓN que consiste en FASE I, FASE II y Excreción.

El hígado es el órgano que contribuye de forma mayoritaria a la función de facilitar la eliminación de los xenobióticos lipófilos, principalmente mediante enzimas, tales como el citocromo P450 (CYP450s) Figura 17 (Castell, 2005). El papel de estas enzimas es clave para la supervivencia celular, de no existir los xenobióticos se acumularían ocasionando desequilibrio celular, alteraciones funcionales e incluso muerte celular.

Su función es la de convertir los xenobióticos en moléculas más polares, más hidrosolubles y, por tanto, facilitar la excreción (Donato, 2009).

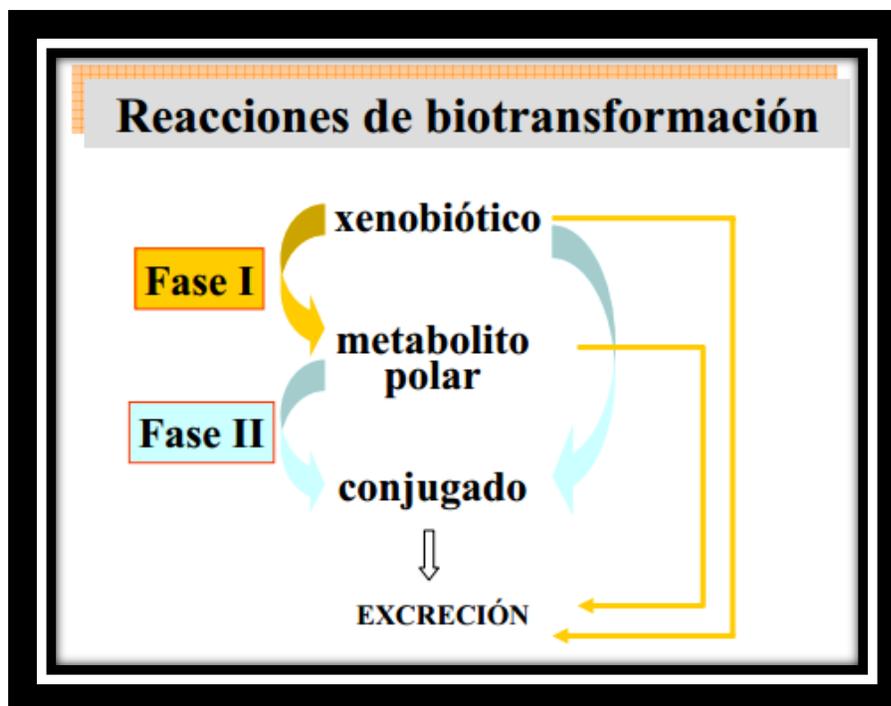


Figura 17. Proceso de Biotransformación del xenobióticos.

Obtenido de [http://www2.uah.es/tejedor\\_bio/bioquimica\\_ambiental/T6.htm](http://www2.uah.es/tejedor_bio/bioquimica_ambiental/T6.htm)

#### FASE 1

Estas reacciones involucran la introducción o exposición de grupos funcionales que modifican la estructura química del xenobiótico, tales como grupos amino (-NH<sub>2</sub>), carboxilo (-COOH), hidroxilo (-OH) o sulfhidrilo (-SH), englobando distintas reacciones, principalmente oxidación, reducción e hidrólisis. Los productos de estas reacciones son productos más polares que el compuesto original. Estos procesos son mayoritariamente catalizados por enzimas llamadas Citocromos P450 (Vázquez, 2010).

## CITOCROMOS P450 (CYP450s)

Los Citocromos P450 son una superfamilia de enzimas que tienen un grupo hemo (complejo Fe-porfirina), se localizan en el retículo endoplásmico liso que está distribuido ampliamente en los seres vivos. Se abrevian como CYP450, CY denota que es un citocromo, P significa pigmento y 450 la longitud de onda a la cual absorbe la luz cuando se une al monóxido de carbono (CO). Estas enzimas participan en la biotransformación de diversos compuestos químicos endógenos y exógenos que incluyen fármacos, contaminantes ambientales y otros xenobioticos (Vázquez, 2010).

Las familias de CYP450s 1, 2 y 3 en mamíferos están constituidas por enzimas encargadas principalmente de la biotransformación de xenobióticos, mientras que el resto de familias intervienen en la biosíntesis y el metabolismo de compuestos endógenos. Las oxidaciones catalizadas por el CYP450 son reacciones de monooxigenación dependientes de NADPH y para las que utiliza oxígeno molecular. Como consecuencia de estas reacciones el CYP450 acelera la eliminación de un gran número de fármacos y compuestos tóxicos del organismo, pero también es el responsable de la activación de toxinas o precarcinógenos (Donato, 2009).

En el hombre, los CYP450s están ampliamente distribuidos por todo su organismo y su expresión puede estar regulada por factores genéticos (polimorfismos genéticos), fisiopatológicos (regulación hormonal y enfermedades) o ambientales (factores nutricionales, inducción e inhibición). Por esta causa, sus niveles hepáticos varían extraordinariamente entre diferentes individuos, lo que justifica las notables diferencias que, en ocasiones, se observan en el metabolismo de fármacos y xenobióticos y en última instancia la variabilidad en la respuesta farmacológica o la diferente susceptibilidad a la acción de tóxicos o carcinógenos (Donato, 2009).

En ciertos casos, las reacciones metabólicas de la fase 1 convierten xenobióticos inactivos a compuestos biológicamente activos. En este caso, los xenobióticos originales se denominan "pro fármacos" o "procarcinógenos".

## FASE II

Llamada fase de conjugación, se realiza con la participación de metabolitos endógeno que generalmente son de carácter polar y se encuentran altamente disponibles en el organismo como son el ácido glucoronico, grupos sulfatos, acetilo y glutatión, los cuales se combinan con los productos de la reacción de la fase I, dando origen a productos altamente hidrosolubles, lo que permite que sean eliminados con facilidad por orina y heces (Plant, 2003).

El propósito global de las dos fases del mx es incrementar su solubilidad en agua (polaridad) y así facilitar su excreción del cuerpo.

## ANEXO 2

---

### *Drosophila melanogaster*

Para evaluar los efectos genotóxicos de cualquier compuesto, la genética toxicología hace uso de diversos organismos, uno de los cuales ha dado mejores resultados es *D. melanogaster* también llamada mosca de fruta o vinagre. Se alimenta de levaduras que crecen en restos vegetales en descomposición. (Castañeda *et al.*, 2008).

Taxonomía de *Drosophila melanogaster*:

**Phylum:** Artropoda

**Clase:** Hexapoda

**Orden:** Diptera

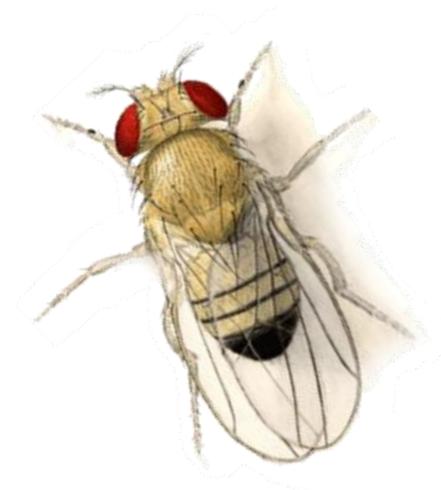
**Familia:** Drosophilidae

**Subfamilia:** Drosophilinae

**Género:** *Drosophila*

**Subgénero:** *Sophophora*

**Especie:** *melanogaster*



Es un organismo eucarionte pluricelular con cuatro pares de cromosomas: los sexuales que son Y (submetacéntrico) y X (acrocéntrico), los cromosomas 2 y 3 (metacéntricos) y el cromosoma 4 en forma de punto ver Figura 18 (Castañeda, *et al.*, 2008).

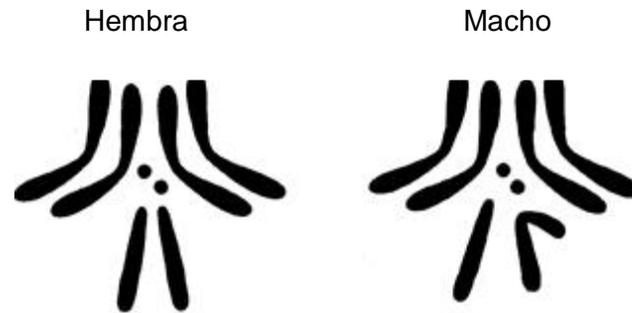


Figura 18. Cromosomas de *D. melanogaster*.

Tomado de <http://www.nature.com/scitable/topicpage/developing-the-chromosome-theory-164>

En *D. melanogaster* existe dimorfismo sexual, la hembra es más grande que el macho y presenta ocho segmentos abdominales, mientras que en el macho los tres últimos segmentos están fusionados y melanizados, además los machos presentan peines sexuales que son un grupo de aproximadamente diez cerdas fuertes (figura 19) en la articulación basal del tarso del primer par de patas (Castañeda, *et al.*, 2008).



Figura 19: Dimorfismo sexual en *D. melanogaster*.

Tomado de <http://www.explicame-evolucion.com/subtema/que-invalidaria-la-evolucion>

Una de las características más importantes para farmacología es que aproximadamente el 61% de los genes de enfermedades humanas tienen

homólogos en *D. melanogaster* y el 25.5% de sus proteínas son similares en 80% de su secuencia a las de los mamíferos (Celniker y Rubin, 2003).

## CICLO DE VIDA

Su ciclo de vida de *D. melanogaster* ofrece una gran ventaja para la investigación científica ya que es un organismo holometábolo es decir, presenta etapas larvarias y una etapa adulta separadas por una etapa pupal, durante la cual tiene lugar una metamorfosis completa. Este ciclo puede durar desde 10 días a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  y 65% Humedad Relativa (HR) hasta dos semanas a  $21^\circ\text{C}$  (Dueñas *et al.*, 2001).

El ciclo inicia con la ovoposición, donde una hembra puede depositar entre 600 a 800 huevos en sus 40-60 días de vida (figura 20), después de 24 horas eclosionan las larvas de 1er estadio que pasan por dos estadios más de 24 y 48 horas respectivamente. Durante la fase larvaria la ingesta de alimento es continua, llegando a consumir de 3 a 5 veces su peso, incrementándolo de 0.5 a 2.0 mg (Castañeda *et al.*, 2008). A los 5 días la larva entra en pupa y se inicia la metamorfosis. Las estructuras adultas se formarán principalmente a partir de la reorganización de los discos imaginales (Amorós, 2001) ver figura 20.

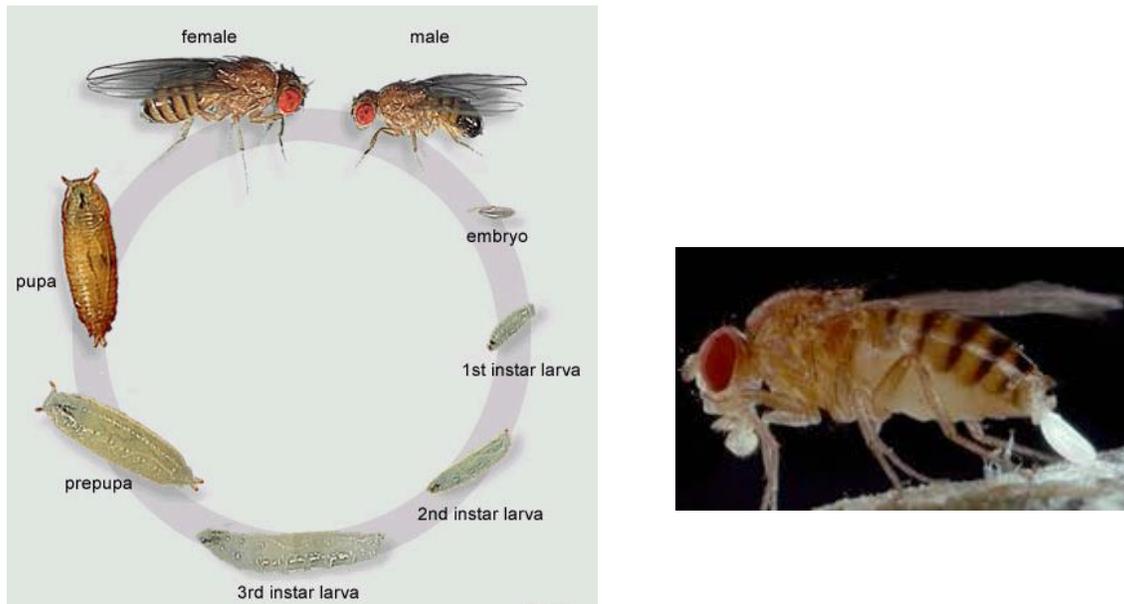


Figura 20. Ciclo de vida de *D. melanogaster* y puesta de huevos

### Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART) en ala de *D. melanogaster*.

El bioensayo hecho con *D. melanogaster* en la prueba SMART es reconocido como ideal para realizar investigación (Vogel *et al.*, 1999) debido a que los tratamientos se hacen *in vivo* y a que en el tejido graso de las larvas se presentan la mayoría de las funciones enzimáticas que se efectúan en los hepatocitos humanos (Guzmán y Graf, 1995).

SMART determina la genotoxicidad de agentes químicos por la pérdida de heterocigosis de dos marcadores genéticos: tricomas múltiples en el ala (*mwh*) y tricomas malformados o en forma de rosetas de maíz (*flr<sup>3</sup>*), expresados como clones o manchas (figura 21) derivadas de células mutantes en las alas de los organismos adultos (Heres *et al.*, 2010).

Esta prueba permite reconocer varios eventos genéticos como: mutaciones puntuales, algunos tipos de aberraciones cromosómicas, así como recombinación mitótica y conversión de genes (Graf *et al.*, 1984).

En la prueba SMART se puede cuantificar el tamaño de una mancha y este nos proporcionar información sobre la temporalidad del evento genotóxico, reconociéndose de esta manera: manchas grandes, producidas por daño temprano en la división de las células del disco imaginal de las larvas o manchas pequeñas, producidas por daño tardío. También podemos reconocer eventos de recombinación proximal al centrómero, que implica el intercambio del fragmento cromosómico que contiene ambos marcadores, por la expresión de los marcadores de *mwh* y *flr<sup>3</sup>* en células adyacentes como manchas individuales (Heres *et al.*, 2010).

La prueba SMART hace uso de tres líneas mutantes con marcadores recesivos:

- ↻ Línea (*mwh/mwh*) multiple wing hair, que porta una mutación recesiva ubicada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 a 0.3 unidades de mapa (3-0.3). En homocigosis total o en mosaicos somáticos tiene la expresión fenotípica de tricomas múltiples en vez de uno como sucede en la línea silvestre (Graf *et al.*, 1998).
  
- ↻ Línea *flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>S</sup>* (*flare3*) que presenta una mutación autosómica recesiva ubicada en el cromosoma 3 a 38.8 unidades de mapa (3-38.8). La expresión fenotípica son tricomas mal formados o en forma de roseta de maíz, esta mutación es letal en homocigosis por lo cual necesita el cromosoma balanceador (TM3) que se reconoce indirectamente por la presencia del marcador dominante Beaded serratia (*Bd<sup>S</sup>*) que se expresa fenotípicamente con la presencia de muescas en el borde del ala (Graf *et al.*, 1998).
  
- ↻ Línea Oregon-flare (*ORR(1);ORR(2);flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>S</sup>*), presenta mutaciones en los cromosomas 1 y 2 de la línea Oregon OR (*R*) resistente a DDT, que provoca la expresión constitutiva de una proteína inductora de los genes *CYP* (*CYP6a8* y *CYP6a9* del cromosoma 1 y *CYP6a2* del cromosoma 2) confiriéndole altos niveles de CYP450s. (Gómez , 2013).

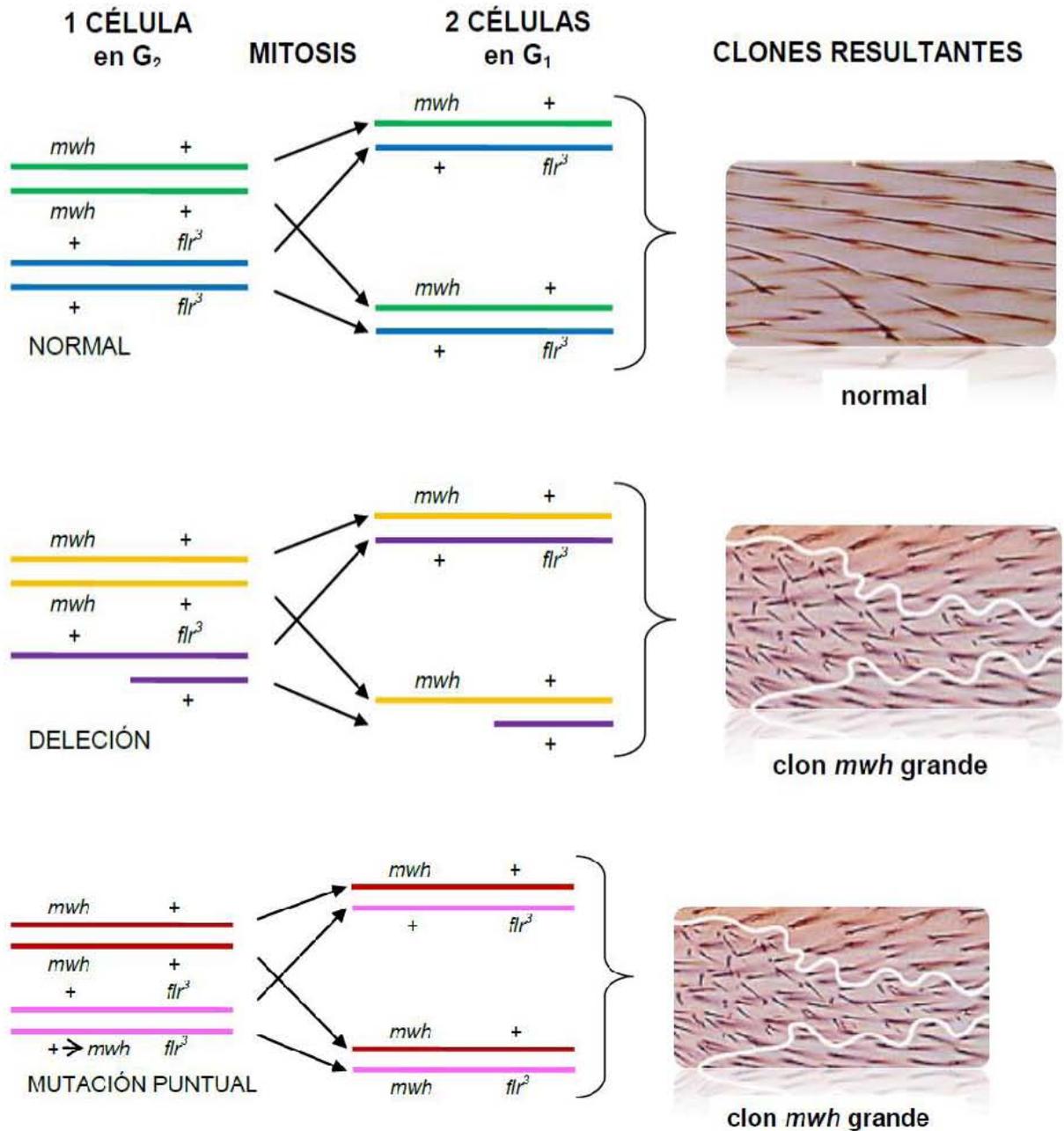


Figura 21a. Eventos genéticos que ocasionan la pérdida de heterocigosis de los marcadores *flr<sup>3</sup>* y *mwh*, y la formación de manchas en SMART en ala.

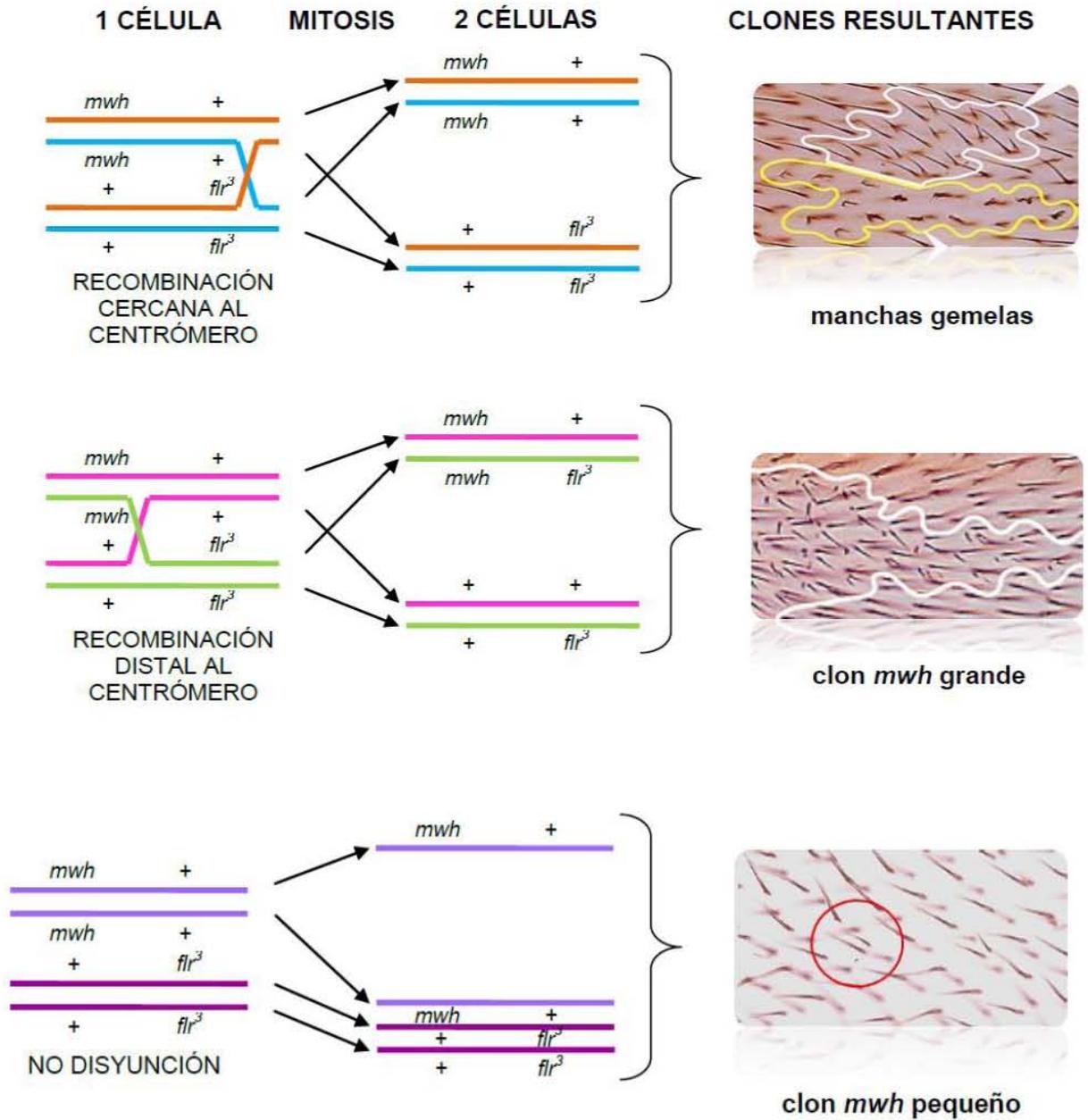


Figura 21b. Continuación Eventos genéticos que ocasionan la pérdida de heterocigosis de los marcadores *flr<sup>3</sup>* y *mwh*, y la formación de manchas en SMART en ala.