



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**"Efecto del resveratrol y del co-tratamiento
resveratrol-nicotina en la longevidad de *Drosophila
melanogaster* (Meigen, 1830)"**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA:

ESTEFANÍA LIBERTAD CRUZ CORTÉS

DIRECTORA DE TESIS:

M. en C. María Eugenia Isabel Heres y Pulido

LOS REYES IZTACALA, EDO. MÉX, 2015.





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.

CONTENIDO

CONTENIDO.....	1
Lista de abreviaturas	2
INTRODUCCIÓN.....	4
Envejecimiento y longevidad	4
Relación entre RL [•] , especies reactivas y longevidad.....	6
Resveratrol	9
Resveratrol: efecto antioxidante y pro-oxidante	12
Resveratrol en la longevidad.....	14
Resveratrol y longevidad en <i>D. melanogaster</i>	18
Nicotina	19
Efectos biológicos de la nicotina	21
Nicotina y longevidad en <i>D. melanogaster</i>	24
JUSTIFICACIÓN	25
OBJETIVO.....	25
HIPÓTESIS.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
Químicos.....	27
Biológicos	27
Tratamientos	28
Diseño experimental	31
Análisis estadístico	32
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN.....	38
CONCLUSIONES	44
RECOMENDACIONES.....	45
REFERENCIAS.....	46
ANEXOS	61
ANEXO I. <i>Drosophila melanogaster</i>	61
ANEXO II. Estrés oxidante, radicales libres y especies reactivas de oxígeno	66

Lista de abreviaturas

ANOVA: Análisis de varianza (**AN**alysis **Of** **VA**riance, según terminología inglesa).

Bcl-2: B- célula de linfoma 2 (*B-cell lymphoma 2*, según terminología inglesa).

CAT: Catalasa.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DNA: Ácido desoxirribonucleico (Siglas en inglés, DNA).

ERO: Especies reactivas de oxígeno.

GPx: Glutación peroxidasa.

HR: Humedad relativa.

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

mM: mili molar.

µm: micro molar.

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido.

nm: Nanómetros.

O₂•⁻: Radical libre superóxido.

•OH: Radical libre hidróxilo.

RC: Restricción calórica.

RL•: Radical libre.

RES: Resveratrol.

ERN: Especies reactivas de nitrógeno.

SIRT: Sirtuinas.

SOD: Superóxido dismutasa.

RESUMEN

La longevidad se refiere a la duración de la vida de un organismo biológico y el envejecimiento limita de manera natural a la longevidad. Las variaciones en la longevidad se correlacionan inversamente con la tasa de generación de radicales libres RL^{\bullet} . Cuando el contenido intracelular de las especies reactivas de oxígeno (ERO) y los RL^{\bullet} se desequilibra, aumenta el estrés oxidante, y por lo tanto habrá daños en las biomoléculas, aunque en las células existen mecanismos de protección denominados antioxidantes. El resveratrol (RES) (3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno) es un polifenol presente en productos de la dieta humana como los frutos secos, vino tinto, vino blanco, uvas y frutos rojos. Éste se ha reportado con propiedades antioxidantes, pro-oxidantes, genotóxicas, pro-longevidad y anti-longevidad. La nicotina es una amina presente en una gran variedad de plantas principalmente en Solanáceas y en elementos de la dieta humana. La nicotina tiene propiedades similares a las del RES. Se evaluó el efecto del RES 0.01mM y la nicotina 0.062mM en la longevidad de *Drosophila melanogaster*. Se realizó durante 36 días un experimento con dieciséis réplicas, incluyendo igual número de hembras y machos, con cinco tratamientos (Agua miliQ, Etanol 2%, DMSO 0.3% (dimetilsulfóxido), RES 0.01mM y RES 0.01mM+nicotina 0.062mM) y se contabilizó cada tres días el número de moscas vivas hasta que murió la última de cada tratamiento. Con el paquete Minitab V.17 se compararon con *t* de Student, no pareada, las pendientes (tasa de mortalidad) para determinar diferencias significativas entre los tratamientos y entre los sexos. Los resultados indicaron que el tratamiento RES 0.01mM y RES+nicotina mostraron diferencias significativas con respecto al testigo Agua. El RES no tuvo efecto en los machos, pero aumentó 42.5% la longevidad de las hembras, como se ha reportado en otros estudios para *D. melanogaster*. La interacción RES+nicotina se manifestó en las diferencias porque en los machos disminuyó la longevidad 28.58% con respecto al agua y en hembras la aumentó 71.42%. Se concluye que la longevidad en hembras fue mayor con respecto a los machos y que la interacción RES+nicotina tiene un efecto diferente según el sexo, probablemente relacionado con una mayor sensibilidad en machos.

Palabras clave: Antioxidante, *Drosophila melanogaster*, nicotina, longevidad, resveratrol.

INTRODUCCIÓN

Envejecimiento y longevidad

El envejecimiento afecta prácticamente a todas las especies pluricelulares existentes en el planeta y es definido como un proceso fisiológico paulatino y gradual del deterioro de la capacidad funcional del organismo, como consecuencia de la acción del tiempo. De esta manera se han propuesto distintas teorías para explicarlo; una de ellas es la teoría de los radicales libres que se apoya en la demostración de que en condiciones fisiológicas normales, el uso del oxígeno por las células de los organismos aeróbicos genera especies reactivas de oxígeno (ERO) y radicales libres (RL•). Cuando el contenido intracelular de las ERO y los RL• se desequilibra, aumenta el estrés oxidante, esto se debe a un desbalance entre ERO y los antioxidantes que están presentes en un ser vivo (Figura 1). El estrés oxidante induce daño a las moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, que a su vez ocasiona la pérdida gradual de las funciones fisiológicas (Finkel, 2008). Una de las consecuencias del aumento del daño oxidante es el envejecimiento y se postula como un factor causal importante de la senescencia (Sohal y Weindruch, 1996).

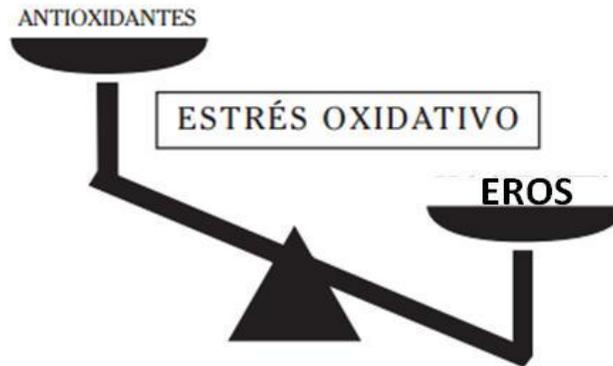


Fig. 1. Estrés oxidante: desbalance entre antioxidantes y ERO (Modificado de Barbosa *et al.*, 2008).

Para estudiar el envejecimiento es necesario definir el concepto de longevidad, ya que se refiere a la duración de la vida de un organismo biológico y el envejecimiento limita de manera natural a la longevidad. Además, las variaciones en la longevidad entre las diferentes especies se correlacionan inversamente con la tasa de generación de RL^\bullet en los organismos (Buffenstein *et al.*, 2008). Para disminuir los daños en la célula existen mecanismos de protección llamados antioxidantes que atrapan a los RL^\bullet presentes en la célula por lo que suprimen su actividad nociva. Algunos antioxidantes naturales pueden consumirse en la dieta diaria, algunos ejemplos son: Vitamina C, Vitamina E, quercetina, carotenos y resveratrol como los más importantes (Halliwell, 1996).

Relación entre RL•, EROS y longevidad.

Las ERO y las especies reactivas de nitrógeno (ERN) pueden producirse como parte de un procedimiento normal en cualquier sitio de una célula como en la mitocondria, el retículo endoplásmico o pueden originarse a partir de distintas reacciones que se llevan a cabo en la célula, tales como Fenton, Haver-Weiss, reacciones enzimáticas por acción de NADPH oxidasa o por la actividad de los citocromos P450 (CYP450s) (Halliwell, 2007).

Las ERO y las ERN juegan un doble papel ya que pueden ser especies perjudiciales o benéficas. El rol benéfico consiste en que pueden actuar como mensajeros secundarios en las cascadas de señalización intracelular, participar en distintos procesos inmunológicos y embrionarios, inducir la senescencia celular y la apoptosis (Valko *et al.*, 2007). En contraste, las reacciones perjudiciales de las ERO y las ERN están relacionadas con daños a macromoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos lo que induce el envejecimiento o reduce la longevidad (Vargas, 2007).

Otro factor importante relacionado con el envejecimiento y la longevidad de un organismo es la formación de RL•. Estos son especies atómicas o moleculares con uno o más electrones desapareados. Por lo tanto el RL• reaccionará con una molécula que done el electrón provocando daños en ella, también a su vez se producen ERO y una o varias reacciones en cadena dejando a varias moléculas con electrones desapareados (Figura 2).

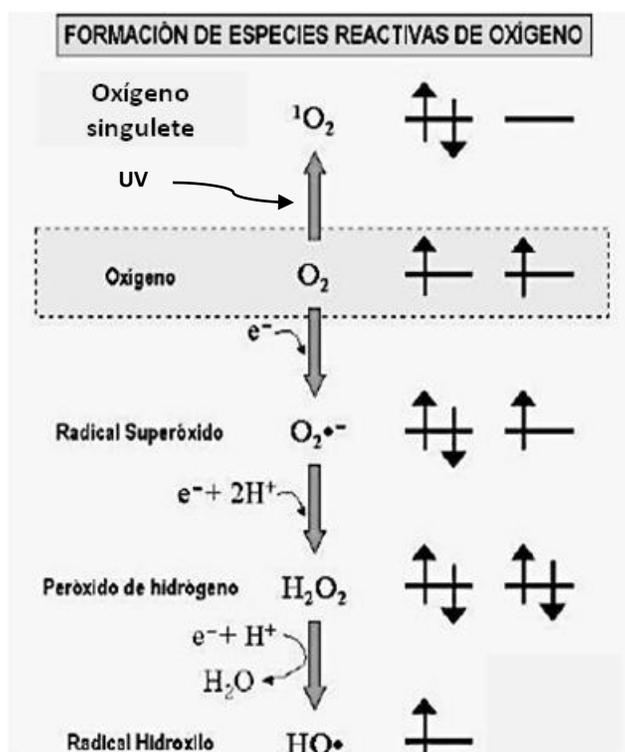


Fig. 2. Características de los orbitales moleculares π^* 2p de la molécula diatómica oxígeno y de sus derivados. Las flechas indican los electrones desapareados (Tomado de Vargas *et al.*, 2007).

La teoría de los RL• fue propuesta por Denman Harman en 1956, la cual propone en su primer postulado que el envejecimiento y el acortamiento de la longevidad es el resultado de los efectos perjudiciales de las ERO (Le Bourg, 2001; Golden *et al.*, 2002). A su vez esta teoría en su segundo postulado propone que por medio de compuestos antioxidantes estos daños pueden disminuir (Harman, 1992) ya que el antioxidante dona un electrón al radical libre (Halliwell, 2007; Lobo *et al.*, 2010) (Figura 3).

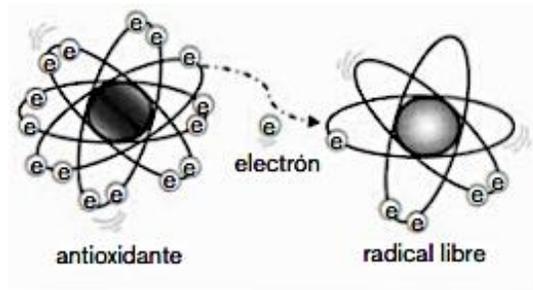


Fig. 3. Mecanismo antioxidante.

Existen distintos tipos de antioxidantes, los que son de tipo endógeno como la albúmina, la enzima superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) o la glutatión peroxidasa (GPx), entre otras; y existen los antioxidantes de tipo exógeno los cuales están disponibles en la dieta humana, tales como la vitamina C, la vitamina E, los carotenos y el RES (Halliwell, 2012).

Resveratrol

Los polifenoles son compuestos derivados de la fenilalanina que consisten en por lo menos un anillo aromático con un grupo hidroxilo. Los flavonoides, ácidos fenólicos, antocianinas y los estilbenos pertenecen a este grupo (Gambini *et al.*, 2013).

El resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno, RES) es un estilbeno y su estructura base consiste en la unión de dos anillos fenólicos por un doble enlace estireno, este doble enlace es el que da como resultado a dos isoformas: el *trans*-resveratrol y el *cis*-resveratrol (Figura 4).

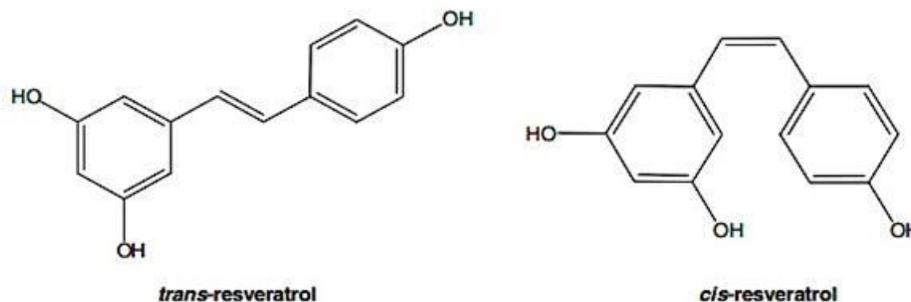


Fig. 4. Estructura química del *trans*-resveratrol y el *cis*-resveratrol (Tomado de Gambini *et al.*, 2013)

Principalmente el *trans*-resveratrol está presente en distintas plantas; aproximadamente 31 géneros entre los que se encuentran *Eucalyptus ssp.* (Eucalipto), *Abies ssp.* (Abeto), *Vitis sp* (Uva) y *Yucca sp* (Izote) (Signorelli, 2005) (Figura 5). El RES es producido en respuesta al estrés fúngico y a los daños producidos por la radiación de la luz ultravioleta (UV). A su vez el RES también ha

sido encontrado en muchos productos y en diferentes concentraciones en la dieta humana como los frutos secos, tales como los cacahuates (*Arachis hypogaea*) y los pistaches (*Pistacia ssp.*), la cáscara de uvas (*Vitis vinifera*), las moras (*Morus ssp.*), las zarzamoras (*Rubus ssp.*), el vino tinto vino blanco, vino rosado, los frutos rojos como los arándanos (*Vaccinium ssp.*) y las grosellas (*Vaccinium ssp.*). (Tabla I) (Gambini, 2013; Shakibaeie *et al.*, 2009).

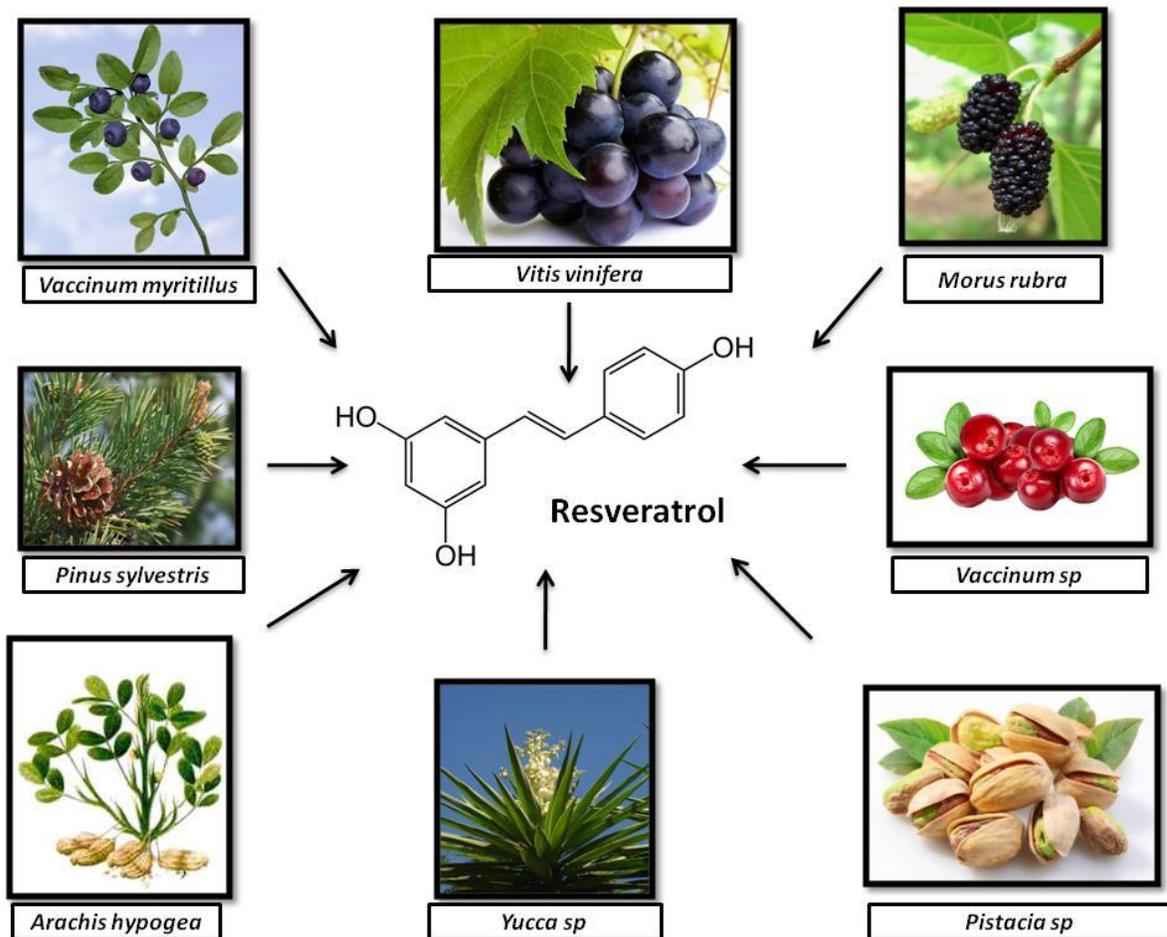


Fig. 5. Estructura del *trans*-resveratrol y especies donde se encuentra.

Tabla I. Concentraciones de *trans*-resveratrol y otros fenoles presentes en algunos alimentos (Baur *et al.*, 2006).

Recurso Alimentario	Concentración de <i>trans</i> -RES	Imagen
Vino tinto	0.1- 14.3 mg /L	
Vino blanco	<0.1 -2.1 mg/L	
Uva	3.54 mg /L	
Jugo de uva roja	0.50 mg /L	
Jugo de uva blanca	0.50 mg /L	
Jugo de arándano	~16 ng/mL	
Cacahuete (cubierta roja de la semilla)	0.02 – 1.92 µg/g	
Mantequilla de cacahuete	0.3-0.4 µg/g	

El isómero más abundante en la naturaleza es el *trans*-resveratrol, sin embargo el *cis*-resveratrol puede obtenerse a partir del *trans*-resveratrol por medio de la fotorreacción producida por la luz UV, solar o artificial al estar en contacto con el isómero a 254 ó 360 nm (Baur y Sinclair, 2008).

El isómero *trans* es el más estable y se le atribuyen propiedades antioxidantes, quimioprotectoras, antiproliferativas, neuroprotectoras, de regulación del ciclo celular, de inducción de apoptosis, antienvjecimiento, antialérgico, pro-longevidad, fitoestrógenas, entre otras (Ganmini *et al.*, 2013). La actividad fitoestrógena de acuerdo a Borrás *et al.* (2006) está relacionada con la longevidad ya que activa la transcripción de genes antioxidantes como los que codifican a las sirtuinas.

Resveratrol: efecto antioxidante y pro-oxidante

Algunos trabajos se han publicado acerca del efecto antioxidante del RES y su efecto benéfico en la longevidad en los modelos de *D. melanogaster*, *S. cerevisiae* y *C. elegans* (Alarcón, 2007). Algunos han determinado al RES como un potente antioxidante ya que atrapa radicales libres como el $O_2^{\bullet-}$ e OH^{\bullet} ; además de que promueve la actividad de otras enzimas antioxidantes, disminuye la generación de las ERO en mitocondria e inhibe la lipoperoxidación inducida por la reacción Fenton (Losa *et al.*, 2004). Las concentraciones que se han propuesto para disminuir el daño oxidativo (1, 2.5, 5, 10, 27, 30 μ M) (Baur y Sinclair, 2006; Alarcón y Villegas, 2007; Mikstacka *et al.*, 2010)

Sin embargo, en otros estudios se ha demostrado que el RES tiene efectos pro-oxidantes (Ozgova *et al.*, 2003) ya que puede producir grandes cantidades de radicales $\bullet\text{OH}$ o $\text{O}_2\bullet^-$ que dañan a macromoléculas como el DNA y las proteínas, además de producir citotoxicidad en presencia de metales como el cobre (Azmi *et al.*, 2005; Fukujara *et al.*, 2006) (Figura 6).

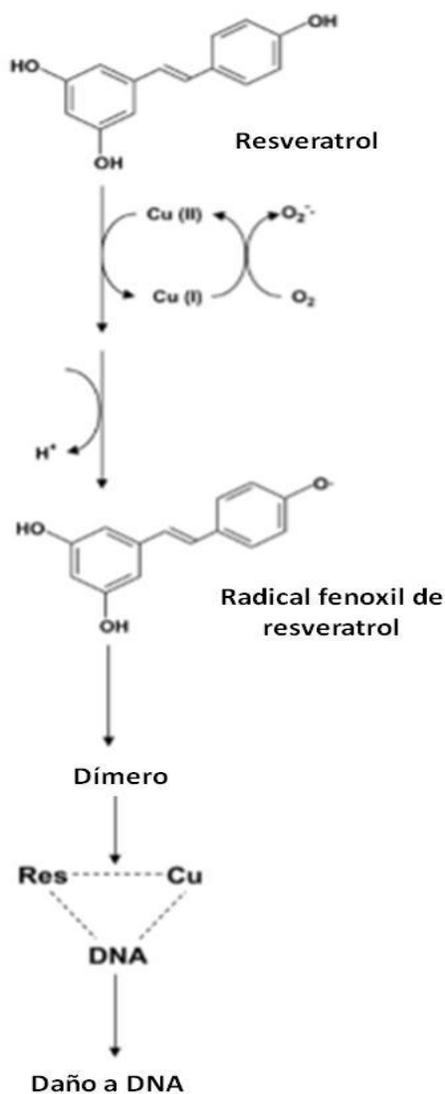


Fig. 6. Efecto pro-oxidante del RES en el DNA en presencia del metal cobre (Alarcón y Villegas, 2007).

En el modelo *D. melanogaster* se han reportado efectos genotóxicos de RES a una concentración de 0.01 mM (Gómez, 2013; Silva, 2013; Palacios, 2014), mientras que en rata, ratón, (Schmitt *et al.*, 2002), hámster chino (Matsuoka *et al.*, 2001) y en cultivos celulares de pulmón el efecto se ha observado en las concentraciones 1, 2 μ M y 10 μ M.

Resveratrol en la longevidad

El RES produce un aumento en la longevidad en varios modelos como en el pez cebra, el nemátodo *C. elegans*, la mosca de fruta *D. melanogaster*, y en ratón en condiciones de sobrepeso, a los cuales se aplicó un tratamiento crónico. El aumento en la longevidad en los seres vivos anteriores podría estar mediado por los genes que codifican a las enzimas llamadas sirtuinas que se activan en presencia del RES (Kaeberlein *et al.*, 2005; Sunagawa *et al.*, 2011). El nombre de las sirtuinas proviene de las palabras *silent information regulator* y se representan con las letras *sirt*, *sir*, SIR o SIRT (Imai y Guarente, 2014).

Las sirtuinas corresponden a una familia de enzimas con actividad desacetilasa que probablemente impiden la actividad enzimática por inhibición de la transcripción de determinados genes (Kaeberlein *et al.*, 2005; Volmar y Wahlested, 2015).

La RC es definida como reducción de energía tomada de la dieta sin estar en un estado de malnutrición, de acuerdo a Weindruch y Waldford (1987) es la forma en la que se puede obtener un aumento de esperanza de vida. Esto se ha observado en los organismos *Saccharomyces cerevisiae*, (Figura 7) y *Mus musculus* ya que

en presencia de CR se activan las sirtuinas al igual que en resveratrol que generan el aumento de la proliferación mitocondrial y activan diversos factores de transcripción como FOXO que a su vez aumenta la esperanza de vida (Guarente, 2005; Masoro, 2005; Partridge *et al.*, 2005; Baur y Sinclair, 2006; Tatar, 2007; Guarente, 2007).

Sin embargo los resultados relacionados con el aumento de longevidad en distintos modelos se confrontan con otros estudios que demuestran lo contrario (Agarwal, 2011).

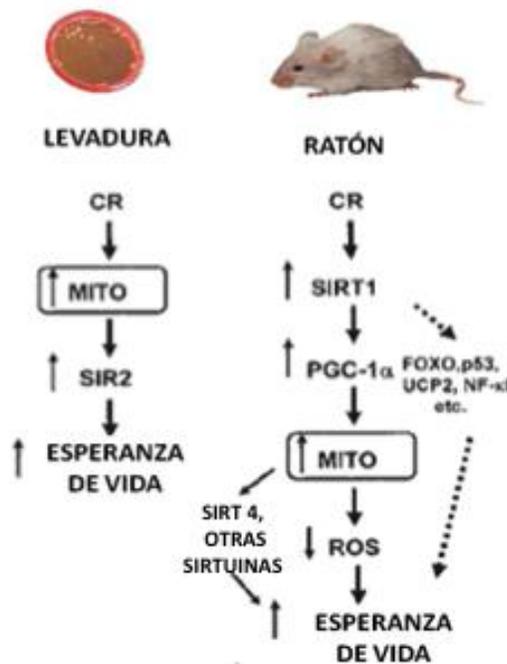


Fig. 7. Actividad de las sirtuinas en la longevidad en los modelos biológicos *S. cerevisiae* y *M. musculus* (Guarente, 2005). Las sirtuinas al ser activadas aumentan la proliferación mitocondrial (↑ MITO) y a su vez la esperanza de vida

En la Tabla II se muestran los modelos utilizados, concentraciones y resultados de cada estudio.

Tabla II. Estudios hechos para evaluar el efecto del RES en la longevidad de distintos modelos biológicos.

MODELO	AUTOR(ES)	CONCENTRACIONES	DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO
Rata <i>Rattus norvegicus</i>	Baur <i>et al.</i> , 2006	0.6 mg /Kg	Las ratas fueron alimentadas con una mezcla de RES, una dieta estándar, más una de 60% calorías. Se obtuvo como resultado que el RES aumentó la esperanza de vida en las ratas ~20%.
	Pearson <i>et al.</i> , 2008	5.4 mg/Kg (dosis baja), 7.9 mg/Kg (dosis media) y 24.2 mg/Kg (dosis alta)	Las ratas fueron alimentadas con una mezcla de RES, una dieta estándar, más una de 60% calorías. Se obtuvo como resultado que el RES en la dosis baja aumentó la esperanza de vida ~5% y en la dosis alta disminuyó la esperanza de vida ~1%.
Levadura <i>S. cerevisiae</i>	Howitz <i>et al.</i> , 2003	2.5 µM	Se evaluaron varios compuestos como piceatanol, RES, quercetina, fisetina, buteina. Las levaduras se alimentaron de una mezcla de glucosa, bactopectona y RES. El RES aumentó la esperanza de vida 70%.
	Kaeberlein <i>et al.</i> , 2005	10 , 100 y 1000 µM	Las levaduras se alimentaron de una mezcla de glucosa y RES. Como resultados obtuvieron que la dosis 100 µM aumentó la esperanza de vida ~10% y con 10 y 1000 µM disminuyeron la esperanza de vida ~5%.
	Jarolim <i>et al.</i> , 2004	10 y 100 µM	Las levaduras se alimentaron de una mezcla de glucosa, galactosa, RES y aminoácidos. Se obtuvo que el RES, en la dosis 10 µM, aumentó la esperanza de vida ~110 % y con 100 µM fue tóxico para las levaduras.
Pez cebra <i>Nothobranchius furzeri</i>	Valenzano <i>et al.</i> , 2006	600, 120 y 24 µg/g	Los peces fueron alimentados con RES y un triturado de la especie <i>Chironomus</i> . Se obtuvo como resultado que la dosis 600 µg/g aumentó la esperanza de vida ~30%, la dosis 120 µg/g aumentó la esperanza de vida ~50% y con 24 µg/g se disminuyó la esperanza de

			vida ~30%.
Mosca de fruta <i>Anastrepha ludens</i>	Zou <i>et al.</i> , 2009	100 y 200 μ M	Se alimentaron las moscas con un medio de levadura, sacarosa y RES. Con la dosis 200 μ M no aumentó la esperanza de vida y con 100 μ M aumentó ~30%.
Abeja <i>Apis mellifera</i>	Rascón <i>et al.</i> , 2012	30 y 130 μ M	Las abejas fueron alimentadas con una mezcla de RES, polen, sacarosa. Se obtuvo que las concentraciones 30 y 130 μ M aumentaron la longevidad.

Resveratrol y longevidad en *D. melanogaster*

En el modelo *D. melanogaster* se han obtenido distintos resultados de acuerdo a las concentraciones; Zou *et al.* (2009) y Bauer *et al.* (2004) determinaron que las concentraciones 100 y 200 μM aumentaron la esperanza de vida, sin embargo, Bass *et al.* (2007) no encontraron diferencias significativas con esas mismas concentraciones (Tabla III).

Tabla III. Efecto del RES en la longevidad de *D. melanogaster*.

Autor	Estudio	Resultados
Zou <i>et al.</i> , 2009	La longevidad depende de la composición calórica y el resveratrol en la dieta de la mosca de fruta.	Se alimentaron las moscas con un medio de levadura, sacarosa y RES. El RES fue utilizado para inducir la vía de la restricción calórica, que en los antecedentes se menciona que aumenta la esperanza de vida. Como resultado obtuvieron que con la dosis 200 μM no aumentó la esperanza de vida y con 100 μM se incrementó ~30%.
Bass <i>et al.</i> , 2007	Resveratrol aumentó la esperanza de vida de <i>D. melanogaster</i> y <i>C. elegans</i> .	Se alimentaron las moscas con un medio que consistió en nipagin, RES, ácido. propiónico, sacarosa y levadura. Los nemátodos se alimentaron en un medio con agar NGM y <i>Escherichia coli</i> . Con las concentraciones evaluadas (10, 32, 100, 200, 1000 μM) no hubo aumento en la esperanza de vida con las concentraciones 100, 200 y 1000 μM , pero sí lo hubo con las concentraciones 10 y 32 μM .
Bauer <i>et al.</i> , 2004	Aumento en la esperanza de vida en <i>D. melanogaster</i> en algunas concentraciones.	Se alimentaron las moscas con un medio de sacarosa, RES y levadura. Con las concentraciones 100 y 200 μM aumentó la esperanza de vida y con las concentraciones 50 y 500 μM disminuyó.

Nicotina

La nicotina es una amina compuesta por un anillo de piridina y de pirrolidina (Figura 8) que puede encontrarse en una gran variedad de plantas principalmente en Solanáceas como la papa (*Solanum tuberosum*), el pimiento (*Capsicum annuum*), el tomate (*Solanum lycopersicum*) y la planta del tabaco (*Nicotiana tabacum* y *Nicotiana glauca*) (Yildiz, 2004; Benowitz *et al.*, 2009). Por lo tanto la nicotina está presente en la dieta humana además del cigarro común (Siegfried *et al.*, 1999) (Tabla IV).

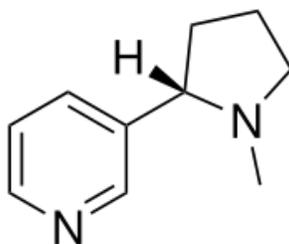


Fig. 8. Estructura química de la nicotina (Yildiz *et al.*, 1988).

Tabla IV. Dosis de nicotina en tabaco y algunos alimentos (Siegmud et al., 1999).

Recurso	Dosis de nicotina ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Imagen
Cigarro de tabaco	1000	
Parche de nicotina	1500	
Papa	4.5-2.2	
Tomate	2.4 -1.2	
Berenjena	1.09-0.7	
Pimiento verde	3.7-6.1	
Pimiento amarillo	9.0	
Pimiento rojo	5.9	
Chile verde	8.7- 6.3	
Salsa de tomate (Cátsup)	7.3	

Papas a la francesa	4.6	
Salsa de tomate	5.3	
Tomate silvestre	2.7-9.1	

Efectos biológicos de la nicotina

Existen antecedentes en los que se reporta la actividad pro-oxidante de la nicotina en diversas células *in vitro* (Crowley *et al.*, 2003) la actividad genotóxica a distintas concentraciones como 1μM, 0.5 mM y 1mM (Sobkowick y Lesicki, 2009; Ginzkey *et al.*, 2014;), actividad hormonal (Windham *et al.*, 2005), entre otros efectos biológicos (Tabla V).

Tabla V. Efectos de la nicotina *in vivo* y a nivel celular. (Yildiz, 2004; Ruiz *et al.*, 2004).

Efectos <i>in vivo</i> .	Efectos a nivel celular
Disminuye el ritmo cardíaco.	Incrementa la síntesis y la liberación de hormonas como el cortisol y la adrenocorticotropina.
Incrementa la presión sanguínea.	Induce el estrés oxidante.
Incrementa los ácidos grasos en la sangre.	Induce el intercambio de cromátidas hermanas.
Incrementa los niveles de catecolaminas en la sangre.	Induce aberraciones cromosómicas.
Excitación o relajación.	Induce efectos negativos en apoptosis.
Cáncer pulmonar, faringe, laringe.	Causa daños morfológicos a espermatozoides.
Reduce la producción espermática.	Induce la síntesis de las proteínas de choque térmico.

La nicotina es un compuesto relacionado con el estrés oxidante, se ha reportado que aumenta la lipoperoxidación en fumadores, la producción de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 que puede causar daños irreversibles en la estructura de la membrana celular de macrófagos (Yildiz, 2004), disminuye la actividad antioxidante de enzimas como SOD, CAT y glutatión reductasa (GRX) (Ashamury y Vijayammal, 1996) y al disminuir las actividades enzimáticas se producen como consecuencia grandes cantidades de radicales libres como $O_2^{\bullet-}$ e $\bullet OH$ (Halliwell y Guttridge, 1988). La nicotina en presencia de Fe^{2+} puede adherirse a otras moléculas provocando la

formación de compuestos que generan daños oxidativos a las biomoléculas (Figura 9) (Bridge, 2004).

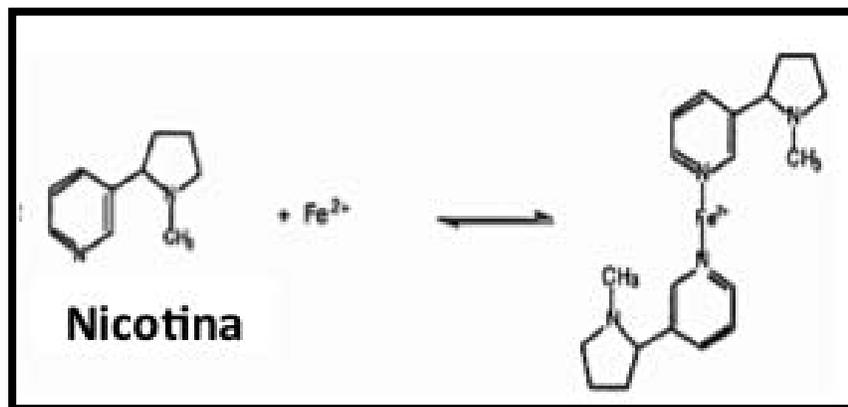


Fig. 9. Efecto pro-oxidante de nicotina en presencia del metal Fe⁺².

También hay estudios *in vitro* que indican que la nicotina tiene propiedades antioxidantes a distintas concentraciones (2.3, 4.7 mM y 10 μ M) (Guan *et al.*, 2003) pero a la concentración de 0.8 μ M lo induce. Se ha sugerido que la nicotina actúa como antioxidante porque atrapa iones Fe⁺², inhibe la reacción de Fenton (Soto *et al.*, 2002) e induce la actividad de la enzima peroxirredoxina (Prx), (Linert *et al.*, 1999) (Figura 8) y su actividad es similar a la transferrina (Newman *et al.*, 2002; Yildiz, 2004).

Además, en el estudio realizado por Chambers *et al.* (2013) la nicotina favoreció positivamente a la longevidad de *D. melanogaster* en heterocigotos del gen *park* (Tabla VI).

Nicotina y longevidad en *D. melanogaster*

En el modelo de *D. melanogaster* se ha observado un efecto neuroprotector y prolongevidad en moscas con Parkinson pero en hembras de rata no se ha observado que afecte la longevidad (Tabla VI) (Oliva, 1988; Chambers *et al.*, 2013)

Tabla VI. Efecto de la nicotina en la longevidad de *D. melanogaster* y *R. norvergicus*.

Autor	Estudio	Resultados
Chambers <i>et al.</i>, 2013	Incremento de la esperanza de vida y mejora del déficit motor y olfatorio en el modelo de Parkinson de <i>D. melanogaster</i> .	Las moscas fueron alimentadas con un medio rico en sacarosa y levadura. Con la concentración 0.062 mM de nicotina se incrementó la esperanza de vida en moscas con Parkinson, pero no en moscas silvestres.
Oliva, 1988.	Efecto de la nicotina en la fertilidad y la esperanza de vida en <i>R. norvergicus</i> .	La nicotina fue inyectada en las ratas, como resultado se obtuvo que aumentó la esperanza de vida en machos y en hembras ocurrió lo contrario.

JUSTIFICACIÓN

- En los antecedentes se presentan resultados diferentes entre los autores con el RES y la nicotina en relación a la longevidad. Por lo tanto, es necesario realizar más estudios con estos compuestos y se propone conocer sus efectos en la longevidad del eucarionte *D. melanogaster*. Además el RES es un compuesto consumido por muchas personas y propuesto como el "elixir de la eterna juventud" sin embargo existen estudios en los que se ha propuesto que participa como un factor en el acortamiento de la longevidad. La nicotina al igual que el RES es consumido por una gran cantidad de personas y está relacionado con el cáncer y otras enfermedades.

OBJETIVO

Evaluar el efecto del RES [0.01 mM] y del co-tratamiento RES [0.01 mM] + nicotina [0.62 mM] en la longevidad de adultos machos y hembras de *D. melanogaster*.

HIPÓTESIS

Debido a que en las referencias algunos autores indican que el RES es un compuesto antioxidante y tiene efectos pro-longevidad, entonces se esperaría obtener efectos positivos en la longevidad de *D. melanogaster*. Como se ha reportado que la nicotina tiene más efectos perjudiciales en distintos modelos biológicos, se esperaría tener un efecto de acortamiento de la longevidad en *D. melanogaster*. Con la administración de la nicotina en conjunto con RES se esperaría tener un aumento en la longevidad de *D. melanogaster* gracias a las propiedades antioxidantes y pro-longevidad reportadas para el RES.

MATERIALES Y MÉTODOS

Químicos

- Resveratrol $C_{14}H_{12}O_3$. CAS 501-36-0. Sigma Aldrich ©, St Louis Mo.
- Nicotina $C_{10}H_{14}N_2$. CAS 54-11-5. Sigma Aldrich©, St Louis Mo.
- Etanol C_2H_6O . CAS 64-17-5. Pureza 99%. Merck KGaA ©. Darmstadt, Alemania.
- DMSO (Dimetilsulfóxido) CH_3SOCH_3 . Merck KGaA ©. Darmstadt, Alemania.
- Solución conservadora: 5 mL de Tegosept 12% + 5 mL de ácido propiónico + 990 mL de H_2O . (Dueñas *et al.*, 2001).
- Medio Carolina. Se obtuvo de Carolina Biological Supply Company, Burlington, N.C. USA.
- Hojuelas de papa deshidratadas Maggi ®.

Biológicos

- Moscas *D. melanogaster Canton S⁺*. Donadas por la Dra. Norma Velázquez Ulloa del *Biology and Research Laboratory* en el *Lewis and Clark College*, Portland, EUA y posteriormente mantenidas en el Laboratorio de Genética Toxicológica de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM.
- Levadura fresca marca La Florida®.

Tratamientos

Los siguientes tratamientos crónicos se llevaron al cabo: RES0.01 mM, disuelto en Etanol 0.1%; RES 0.01 mM + nicotina 0.061mM, DMSO (0.3%) como testigo positivo, agua miliQ (testigo universal) y Etanol 0.1% como testigo disolvente (Tabla VII).

Tabla VII. Tratamientos crónicos evaluados en la longevidad de *D. melanogaster*.

Tratamientos	Característica
Agua miliQ	Testigo Universal.
DMSO 0.3%	Testigo de acortamiento de longevidad (Cruz y Licea, 2013).
Etanol 2%	Testigo disolvente de RES.
RES 0.01 mM	Concentración que ha sido reportada como genotóxica (Gómez, 2013; Silva, 2013; Palacios, 2014).
RES (0.01mM) + nicotina (0.062 mM)	Co-tratamiento con la concentración de nicotina 0.062 mM (Chambers <i>et al.</i> , 2013).
Nicotina 0.062 mM **	Concentración de nicotina 0.062 mM (Chambers <i>et al.</i> , 2013).

****El tratamiento Nicotina 0.062 mM fue evaluado por Licea, 2014 y fue parte de un proyecto que se llevó en conjunto con el autor de este trabajo, por lo tanto se elaboró simultáneamente.**

Las moscas de la cepa *Canton S⁺* se propagaron en frascos lecheros con medio de hojuelas de papa Maggi® hidratado con 20 mL de solución conservadora (Dueñas *et al.*, 2001). Se tomaron 75 hembras y 75 machos y se colocaron en un frasco lechero con betún de levadura activada a 25°C, 60% humedad relativa (HR) durante 22hrs. Después de ese período, las larvas derivadas de los huevos puestos se colocaron en el cultivo de papa, y en la incubadora. Ahí permanecieron ~72 horas, después se sacaron los frascos y se desecharon los organismos que emergieron (Figura 10). Después de 22 horas se recuperaron los adultos que emergieron y se transportaron a un nuevo cultivo de papa donde permanecieron dos días hasta alcanzar la madurez sexual y se registró el primer día de adultez. Seguido de este paso, las moscas fueron anestesiadas con CO₂ y separadas por sexo. Posteriormente, se colocaron las moscas en tubos de plexiglas, con Medio Carolina (*Carolina Co Biological Supply*, Carolina del Norte, EE.UU.) hidratado con las soluciones; se colocaron 10 moscas por tubo, con ocho viales por tratamiento y por sexo (Figura 11). A partir de ese momento el medio de cultivo, con las soluciones de los diferentes tratamientos, se cambió cada dos días y se comenzaron a contar las moscas vivas, por tubo y tratamiento hasta que la última mosca murió.



Fig. 10. Pasos para la sincronización de edades. Modificado de Linford *et al.*, 2013.

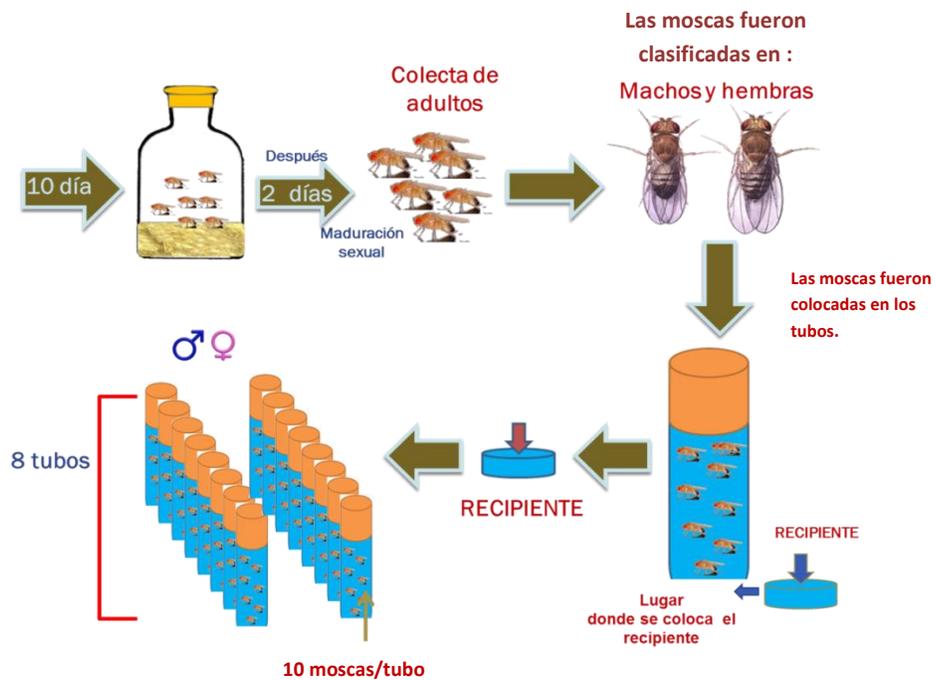


Fig. 11. Método para el experimento de longevidad.

Diseño experimental

Se realizó un experimento con dieciséis réplicas por tratamiento incluyendo igual número de hembras y machos. Cada unidad experimental consistió en 10 moscas. Los recipientes de cada tubo contenían 0.25 gr. de Medio Carolina y 0.5 mL del tratamiento (Figura 12). El recipiente fue cambiado cada dos días y el tubo cada semana con el fin de evitar la acumulación de heces fecales y otros desechos.

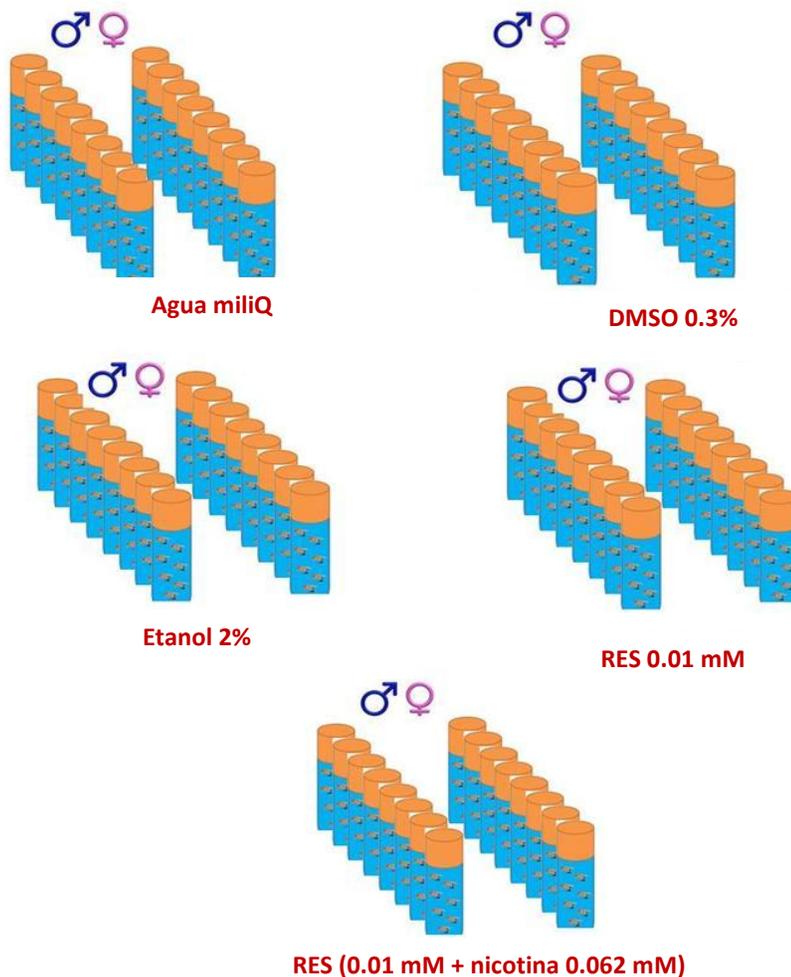


Fig. 12. Unidades experimentales y tratamientos crónicos evaluados en la longevidad de *D. melanogaster*.

Análisis estadístico

El conocimiento de la metodología estadística es una herramienta imprescindible para la obtención, análisis e interpretación de los datos que proceden de observaciones sistemáticas o de experimentaciones proyectadas, específicamente para conocer los efectos de uno o varios factores que intervienen en los fenómenos en estudio (Box *et al.*, 1993).

Dos métodos de análisis estadístico utilizados en el área de ciencias biológicas son el análisis de pendientes y el de regresión lineal; ambos son utilizados en experimentos diseñados que contengan un número adecuado de réplicas (Morales y González, 2003).

La regresión permite construir un modelo cuantitativo que relaciona los factores importantes con la respuesta (Montgomery, 1991). En este estudio la regresión lineal es aplicada para determinar la tasa de mortalidad de una población.

El análisis de comparación de pendientes se hizo con el paquete estadístico Minitab V.17 por medio de la prueba t , no pareada, para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos y entre los sexos.

RESULTADOS

En el testigo agua tanto los machos como las hembras sobrevivieron hasta el día 18. En el testigo Etanol 2% las hembras sobrevivieron hasta el día 24 y los machos hasta el día 21. En el testigo DMSO 0.3% tanto hembras como machos sobrevivieron sólo hasta el día 9. En el tratamiento RES 0.01 mM las hembras sobrevivieron hasta el día 27 y los machos hasta el 21. En el co-tratamiento RES 0.01 mM+ nicotina 0.062 mM las hembras sobrevivieron hasta el día 33 y los machos hasta el día 15 (Figuras 13 y 14).

Comparación de pendientes

Del análisis de comparación de las pendientes de las hembras vs. los machos en cada tratamiento, se obtuvo lo siguiente: En el tratamiento RES 0.01 mM y el co-tratamiento RES 0.01 mM+ nicotina 0.062 mM hubo diferencias significativas con *t* de Student a $p \leq 0.05$ (Tabla VIII y Figura 15).

Tabla VIII. Análisis de comparación de pendientes intra-tratamiento y por sexo.

Tratamiento	Machos	Hembras	<i>t</i>	<i>p</i> < 0.05
Agua	-0.25	-0.301	-0.74	-0.4872
Etanol2%	-0.3790	-0.3447	-1.17	0.1378
DMSO 0.3%	-0.2745	-0.3170	1.66	0.0864
RES 0.062 mM	-0.50	-0.39	-3.65	0.0041
RES 0.01 mM + nicotina 0.062 mM	-0.60	-0.21	-8.57	0.00013

El análisis de comparación de las pendientes entre el testigo agua y los tratamientos por sexo generó los datos que se muestran en la tabla IX al aplicar *t* de Student a $p \leq 0.05$. En los machos se encontraron diferencias entre el agua y el etanol 2%, RES 0.01 mM y RES 0.01 mM + nicotina 0.062 mM. En las hembras solamente se encontraron diferencias en RES 0.01 mM + nicotina 0.062 mM (Figura 16).

El análisis de comparación de las pendientes entre el testigo etanol y el tratamiento RES 0.01 mM y el co-tratamiento RES 0.01 mM + nicotina 0.062 mM por sexo generó los datos que se muestran en la Tabla X al aplicar *t* de Student a $p \leq 0.05$. En los machos se encontraron diferencias entre el etanol 2% vs. RES 0.01 mM y RES 0.01 mM + nicotina 0.062 mM. En las hembras solamente se encontraron diferencias en RES 0.01 mM + nicotina 0.062 mM. Las diferencias encontradas fueron las mismas con respecto a agua vs. RES 0.01 mM y agua vs. el co-tratamiento RES 0.01 mM + nicotina 0.062 mM.

Tabla IX. Análisis de comparación entre las pendientes de los tratamientos vs agua.

Tratamientos comparados	Pendientes machos	Machos	Pendientes hembras	Hembras
Agua vs Etanol 2%	-0.38	$t=-4.31, p=0.0017$	-0.34	$t=-1.11, p=0.1496$
Agua vs DMSO 0.3%	-0.27	$t=-0.95, p=0.1979$	-0.32	$t=-0.33, p=0.3755$
Agua vs RES 0.01 mM	-0.50	$t=-9.35, p=0.000042$	-0.39	$t=-2.48, p=0.0657$
Agua vs RES 0.01 mM + nicotina 0.062 mM	-0.60	$t=-7.65, p=0.00030$	-0.21	$t=2.16, p=0.0269$

Tabla X. Análisis de comparación entre las pendientes del tratamiento RES 0.01 mM y el co tratamiento RES 0.01 mM + nicotina 0.062 mM vs etanol 2%.

Tratamientos comparados	Pendientes machos	Machos	Pendientes hembras	Hembras
Etanol vs RES 0.01 mM	-0.50	$t=-3.04, p=0.0228$	-0.39	$t=-0.95, p=0.3669$
Etanol vs RES 0.01 mM + nicotina 0.062 mM	-0.60	$t=-2.0, p=0.0461$	-0.21	$t=-2.21, p=0.0544$

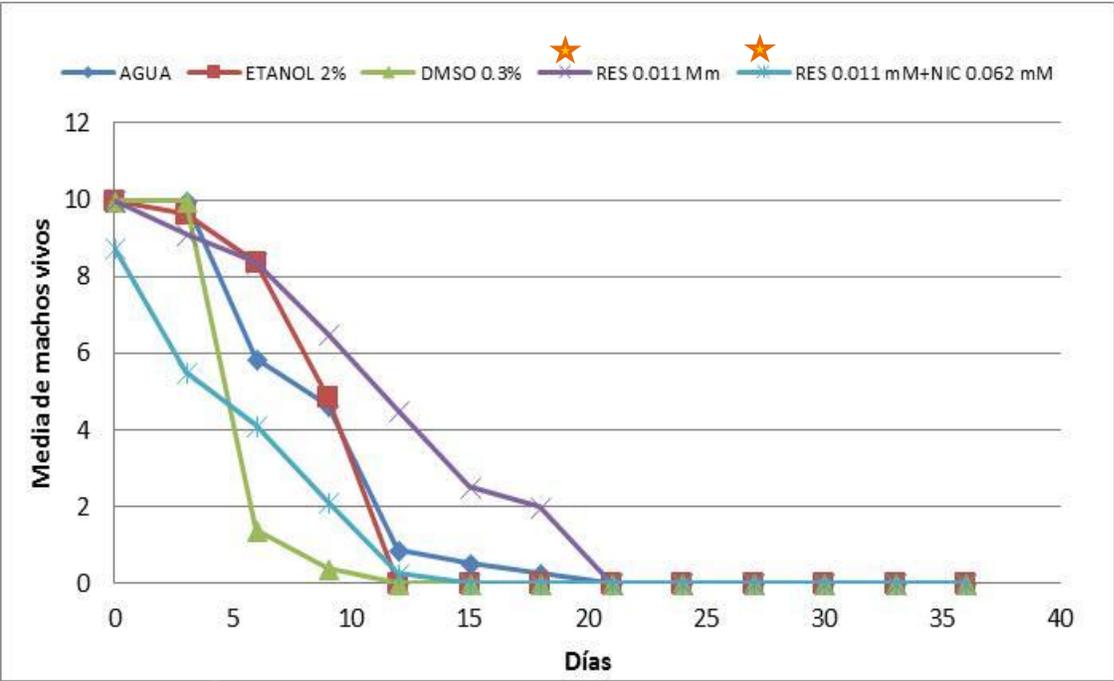


Fig. 13. Medias de machos vivos en cada tratamiento a lo largo de 18 días. En el co-tratamiento RES 0.11 mM + Nicotina 0.062 mM hubo una disminución del tiempo de vida de 28.58%.

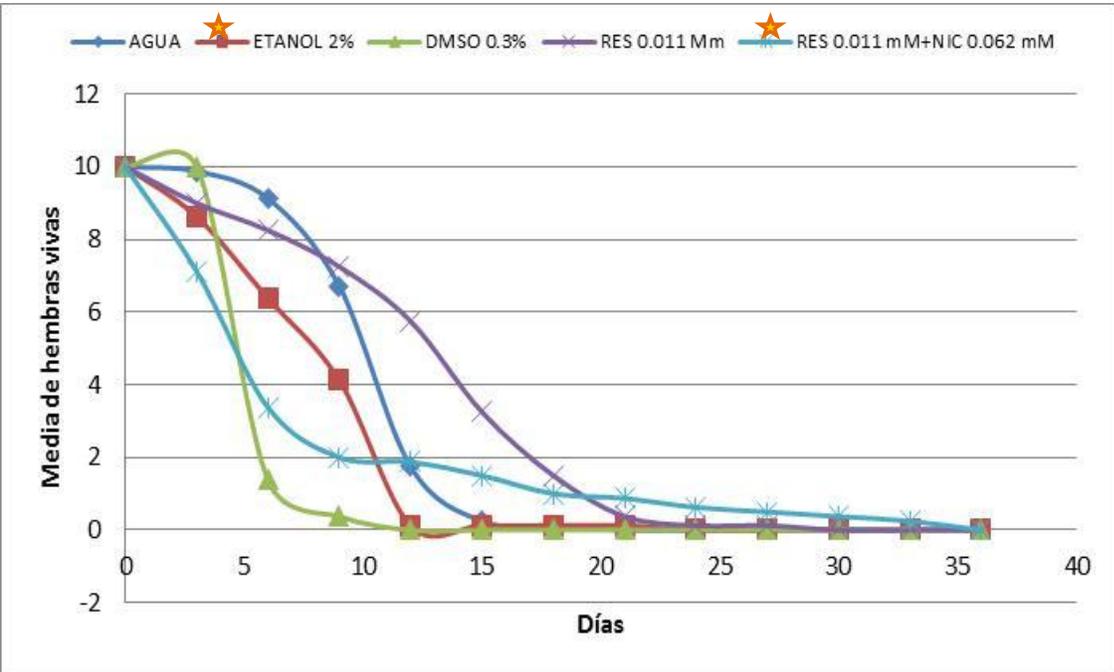


Fig. 14. Medias de hembras vivas en cada tratamiento a lo largo de 36 días. En el co-tratamiento RES 0.11 mM + Nicotina 0.062 mM hubo un aumento del tiempo de vida de 71.42% y en RES 0.011 mM de 42.5%.

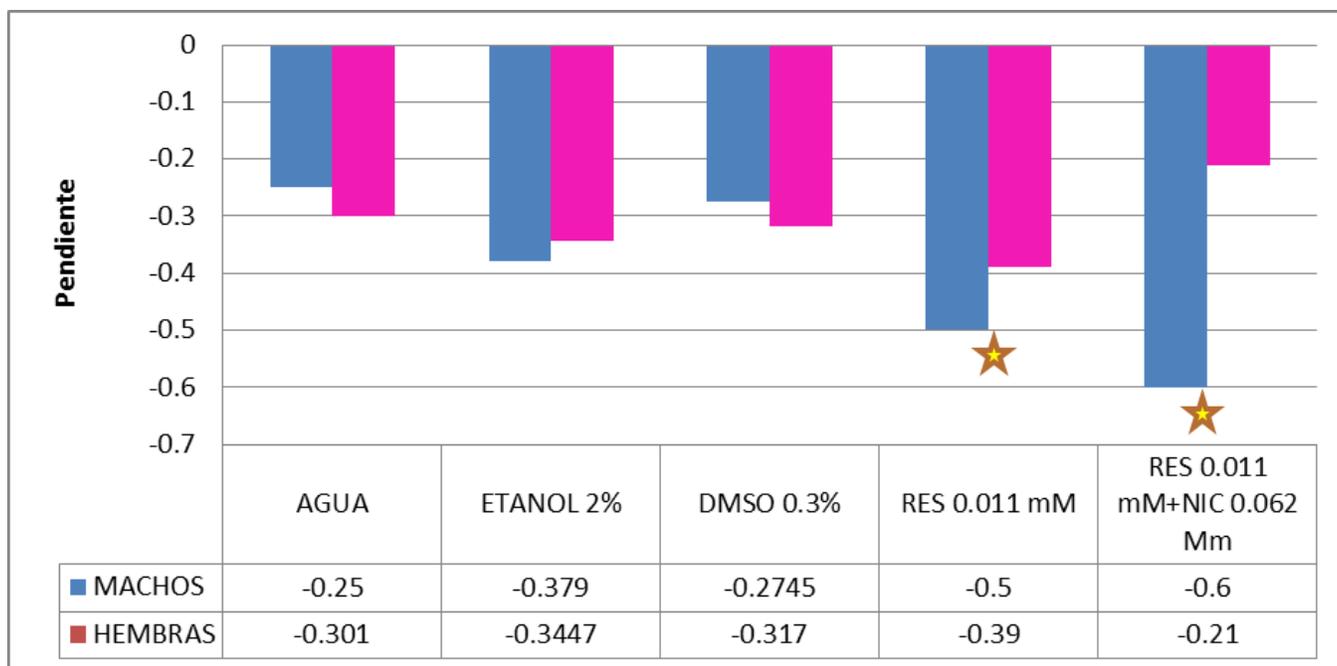


Fig. 15. Comparación de las pendientes (tasa de mortalidad) de las hembras vs. Machos en cada tratamiento. Las estrellas ★ indican los tratamientos que presentaron diferencias significativas entre los sexos.

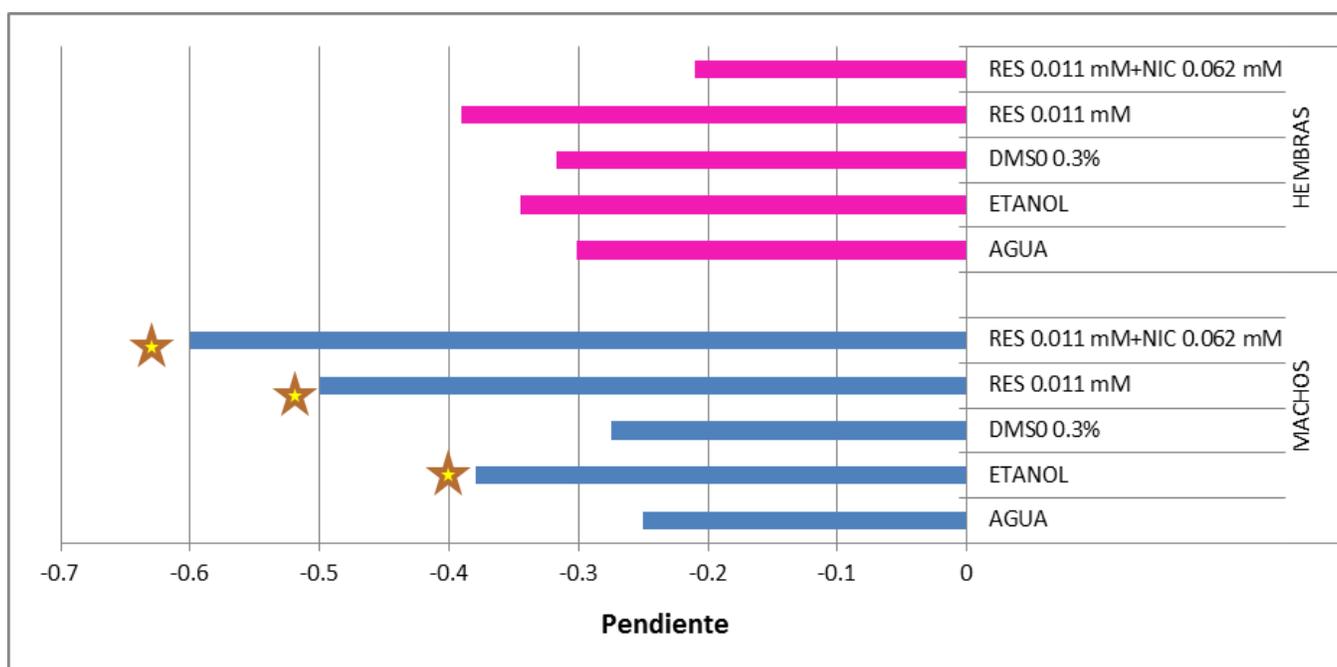


Fig. 16. Comparación de las pendientes (tasa de mortalidad) entre el testigo agua y los tratamientos por sexo. Las estrellas ★ indican el sexo donde se presentaron diferencias significativas con respecto al testigo agua.

DISCUSIÓN

Testigo disolventes

Testigo Agua miliQ y Etanol 2%

En el testigo agua no hubo diferencias entre machos y hembras (Tabla VIII) pero de acuerdo a la comparación de pendientes (tasa de mortalidad) entre machos y hembras de los tratamientos agua y etanol 2%, en los machos se encontraron diferencias entre el agua y el etanol 2% (Tabla IX). En el tratamiento etanol los machos sobrevivieron hasta el día 12 y las hembras hasta el 24 (Figura 13 y 14) por lo tanto la pendiente en hembras fue menor (-0.3447) a la de los machos (-0.379) (Figura 15). Por lo tanto, las hembras sobrevivieron más tiempo, esto puede explicarse porque se ha reportado que las hembras tienen una mayor resistencia al etanol que los machos en *D. melanogaster*; en el estudio realizado por Devinen y Haberlein (2012) se observó que las hembras eran diferentes a los machos en la ya que los machos lo metabolizan más lento que las hembras, debido a que la actividad de la alcohol deshidrogenasa es menor. Los resultados de este estudio también concuerdan con los de Kamping y Van Helden (1978) y Malherbe (2005) en los que se ha observado que las hembras son más resistentes al alcohol que los machos. Probablemente las diferencias se deban a que las hembras *D. melanogaster* tienen un adaptación que les permite alimentarse de mayores cantidades de etanol lo que les proporciona energía para realizar actividades como la ovoposición y la producción de huevos (Malherbe, 2005).

Testigo DMSO 0.3 %

El DMSO es un crioprotector que se usa para la preservación de distintos tipos de células como espermatozoides y embriones de mamíferos, funciona como solvente para distintos compuestos lipofílicos (San Martín, 2011) y atraviesa fácilmente las membranas celulares (Hollebeeck *et al.*, 2011). Al realizar la comparación entre las pendientes de machos y hembras del tratamiento DMSO 0.3% y entre este tratamiento vs. agua no se encontraron diferencias significativas (Tabla VIII). Nazir *et al.* (2003) determinaron que la concentración DMSO 0.3% no tiene efectos adversos en el desarrollo, en la longevidad, ni en la reproducción y no induce citotoxicidad.

Testigo Resveratrol (RES)

En este estudio la comparación de pendientes de hembras vs. machos del tratamiento RES tuvo diferencias significativas (Tabla VIII, IX y X) porque los machos sobrevivieron hasta el día 21 igual que el testigo agua en tanto que las hembras vivieron hasta el día 30 (Figura 13 y 14), lo que significa un aumento de 42.5% con respecto al agua. Estos resultados se explican porque RES tiene un sinnúmero de efectos sobre el metabolismo celular además de su capacidad antioxidante. Como ya se ha mencionado el RES es un fitoestrógeno (Szkudelska y Szkudelski 2010) que actúa sinérgicamente con otras hormonas presentes en las hembras lo que resulta en una mayor capacidad de respuesta para metabolizar los fitoquímicos como el RES (Wang *et al.*, 2013). En apoyo lo anterior, el RES

aumentó la longevidad en hembras de *D. melanogaster Canton S*⁺ (Wang *et al.*, 2003) y en las moscas hembras de *A. ludens* (Zou *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos con el RES 0.01 mM en este estudio concuerdan con lo obtenido por Valenzano *et al.* (2006) quienes con una concentración de 0.01 mM del RES aumentaron la esperanza de vida 30% en hembras del pez cebra (*N. furzeri*). Por otra parte, en estudios con el RES se ha observado que induce *in vivo* la expresión de los genes que codifican a las sirtuinas, un tipo de histona desacetilasas (Howitz *et al.*, 2003) que al ser activadas producen un aumento en la esperanza de vida (Wood *et al.*, 2004). De acuerdo a Guarente (2005) las sirtuinas generan un aumento de longevidad ya que activan factores de transcripción relacionados con esto, tales como FOXO, inhiben la producción de ERO, inducen la expresión de SOD y promueven la proliferación mitocondrial. También se ha reportado que las sirtuinas están implicadas en la extensión de longevidad de *S. cerevisiae*, *C. elegans*, ratones con sobrepeso y *D. melanogaster* (Kaeberlein *et al.*, 1999; Rogina *et al.*, 2000; Tissenbaun y Guarente, 2000). La concentración de 0.01 mM de RES utilizada en este trabajo, ha sido reportada como activadora de sirtuinas (STACs, por sus siglas en inglés) y en *S. cerevisiae* activa al gen *SIRT1* ocasionando un aumento en la longevidad (Howitz *et al.*, 2003) de la misma manera que en *C. elegans* y *D. melanogaster* (Wood *et al.*, 2004; Araki *et al.*, 2004). También de acuerdo a Greer *et al.* (2009) el RES y la restricción calórica activa a factores de transcripción como AMPK, FOXO, DAF-16 y PGC-1 α (Bauer *et al.*, 2006; Lagouage *et al.*, 2006; Zou *et al.*, 2009) los cuales participan en el aumento de longevidad en *S. cerevisiae*, mamíferos y *D. melanogaster*. En los antecedentes de RES 0.01 mM se han reportado las propiedades antioxidantes

en cultivos celulares (Mikstacka *et al.*, 2010; Dong *et al.*, 2014). Esto está relacionado con la teoría de los RL que dice que los antioxidantes los atrapan y promueven el aumento en la longevidad (Bokov *et al.*, 2004).

Mikstacka *et al.* (2010) en un estudio *in vitro* obtuvieron como resultado que a la concentración de RES 0.01 mM hubo un efecto protector en eritrocitos humanos. El RES protegió a estas células de la lipoperoxidación y de daños membranales ocasionados por el estrés oxidante inducido por el H₂O₂. Dong *et al.* (2014) observaron que la concentración 0.01 mM RES protege a células humanas monocíticas THP-1 ya que inhibe la lipoperoxidación, la acumulación lipídica, activa a *SIRT1* y al complejo enzimático AMPK. También Stocco *et al.* (2012) observaron un efecto protector de RES con la concentración 0.01 mM. El estudio fue realizado en células humanas de vejiga ECV304 con carcinoma las cuales fueron expuestas a condiciones de estrés oxidante, RES protegió a las células de ERO y alteró la expresión de *Bcl-2*. Por lo anterior, se infiere que el efecto del RES sobre la longevidad de las hembras *D. melanogaster* se deba al efecto antioxidante y pro-longevidad ya reportado por otros autores y contribuye a proponer que el RES es un compuesto pro-longevidad.

Co- tratamiento RES-nicotina

De acuerdo a la comparación de pendientes de hembras vs. machos en el co-tratamiento RES 0.01 mM+ nicotina 0.62 mM hubo diferencias significativas (Tabla VIII). En la comparación de pendientes del tratamiento agua y el co-tratamiento RES 0.01 mM+ nicotina 0.62 mM hubo diferencias significativas en ambos sexos (Tabla IX y X). Los machos de este co-tratamiento sobrevivieron solamente hasta el día 15 y las hembras hasta el día 36 por lo tanto la pendiente (tasa de mortalidad) de hembras fue mucho menor (0.21) a la de machos (-0.6) y fue también la menor en todos los tratamientos de estudio (Figura 16). Esto significa que el co-tratamiento disminuyó la longevidad de machos en 28.58% y la aumentó en hembras 71.42% con respecto al agua. Estos resultados concuerdan con un estudio realizado por Carillo y Gibson (2002) en los que observaron que las hembras de *D. melanogaster* eran más resistentes a la nicotina y a la cafeína que los machos. En este trabajo inferimos que el RES tuvo un efecto antioxidante que protegió a las hembras del efecto pro-oxidante reportado para la nicotina (Xia *et al.*, 2011; Chunmei *et al.*, 2012). Xia *et al.* (2011) observaron un efecto protector del RES en células endoteliales pulmonares en las cuales se indujo daño oxidante por medio de nicotina (0.07 mM). El RES activó a *SIRT1* y *Sir2* y disminuyó las ROS. Lin *et al.* (2012) evaluaron concentraciones de nicotina en un co-tratamiento con RES (0.001 y 0.01mM) para cada concentración de nicotina (0.1, 0.3, 0.6, 0.8, 1.0 mM) en células embrionarias de ratón. Observaron que en todas las concentraciones de nicotina se incrementó la actividad de la caspasa-3 y la lipoperoxidación. Además, disminuyó la actividad de GPX-1 (Glutación peroxidasa

uno), GPX-4 (Glutación peroxidasa cuatro), HIF-1 α , Bcl-2 y SIRT1. Además, al comparar el co-tratamiento RES +nicotina con el tratamiento nicotina, el RES activó a *SIRT1* y GPX-1, GPX4, SOD1 y SOD2 fueron activadas inhibiendo significativamente la lipoperoxidación. Joschko *et al.* (1991) determinaron que en concentraciones menores a 1.2 mM de nicotina se provocan severos daños en el crecimiento y morfología de células embrionarias. También Delijewski *et al.* (2014) realizaron un estudio con las concentraciones 0.01 a 0.05 mM de nicotina en melanocitos epidérmicos de humano, estos autores obtuvieron una actividad disminuida enzimática antioxidante de SOD, CAT y GPX, y un incremento en la producción de ERO y los daños celulares. Chambers *et al.* (2013) obtuvieron con la concentración de nicotina de 12 μ g/mL un acortamiento en la longevidad de 50% en moscas¹¹¹⁸. Oberduerffer *et al.*(2008) demostraron también que el RES activa a *SIRT1*, promueve la reparación de rupturas de ADN, reduce las anomalías transcripcionales relacionadas con el envejecimiento y suprime la vía TOR, la cual está relacionada con el acortamiento de longevidad en *C. elegans*, *S. cerevisiae* y *D. melanogaster* (Jia *et al.*, 2004; Kaeberlein *et al.*, 2005; Powers *et al.*, 2006). También varios estudios han demostrado que los antioxidantes contrarrestan los daños oxidantes provocados por la nicotina (Ashakumary *et al.*, 1996; Kalpana *et al.*, 2004; Bakkert *et al.*, 2011). Por todo lo anterior, se asume que de haberse producido daño oxidante por parte de la nicotina en *D. melanogaster* con la concentración 0.062 mM, que ha sido evaluada en su efecto sobre la longevidad en este modelo. Licea Herrera (datos no publicados) realizó un estudio en el cual se evaluaron los mismos testigos (DMSO 3%, agua miliQ) en conjunto con este trabajo y usó la nicotina en la concentración

0.062 mM obteniendo como resultado una reducción de 46.1% del tiempo de vida en machos y en hembras 27.2%, aunque las hembras sobrevivieron más tiempo que los machos. Esto resalta con el co-tratamiento RES 0.11 mM+ nicotina 0.062 mM donde los machos tuvieron la misma longevidad que el testigo agua y las hembras aumentaron su longevidad en un porcentaje que va más allá del testigo agua, indicando una interacción entre ambos compuestos que debe estar correlacionada con las respuestas del metabolismo celular al estrés oxidante.

CONCLUSIONES

- El tratamiento RES 0.01 mM tuvo diferencias significativas con respecto a los tratamientos Agua miliQ, DMSO 0.3% y Etanol 2% por lo tanto se sugiere que RES tuvo un efecto pro-longevidad en el modelo *D. melanogaster*.
- El tratamiento RES 0.01 mM + nicotina 0.062 mM tuvo diferencias significativas con respecto a los tratamientos por lo tanto se sugiere que RES tuvo una interacción que provocó un efecto pro-longevidad en hembras del modelo *D. melanogaster* debido a las propiedades antioxidantes ya reportadas.
- En el testigo etanol, en el tratamiento RES 0.01mM y el co-tratamiento RES 0.01 mM + nicotina 0.062 mM las hembras fueron más longevas que los machos.

RECOMENDACIONES

- Realizar estudios en los cuales se mida la actividad enzimática de CAT, GPX, SOD en el modelo *D. melanogaster*.
- Medir la actividad antioxidante de RES 0.01 mM con la prueba de Difenil-1-pirilhidrazilo (DPPH).
- Medir el daño oxidante de la nicotina a través de la generación de indicadores como 6-nitrotriptofano, malonaldehido, 8-OH-dG, 4-hidroxinonenal.
- Realizar estudios con otras concentraciones de RES, para verificar si el efecto pro-longevidad se mantiene.

REFERENCIAS

- Agarwal, B., Baur, J.A.2011. Resveratrol and life extension. *Ann N Y Acad Sci.* 1215, 138-143.
- Alarcón de la Lastra, C., Villegas, I. 2007. Resveratrol in health and disease. CRC Press. 33-56.
- Araki, T., Sasaki, Y., Milbrandt, J. 2004. Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science.* 305, 1010–1013.
- Ashakumary, L., Vijayammal, P.L.1996. Additive effect of alcohol and nicotine on lipid peroxidation and antioxidant defense mechanism in rats. *J Appl Toxicol.* 16, 305-308.
- Azmi, A.S., Bhat, S.H., Hanif, S., Hadi, S.M. 2006.Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a putative mechanism for anticancer properties. *FEBS Lett.* 23, 533-538.
- Bakker, R., Timmermans, S., Steegers, E.A., Hofman, A., Jaddoe, V. W.2011.Folic acid supplements modify the adverse effects of maternal smoking on fetal growth and neonatal complications. *J Nutr.* 141,2172–2179
- Barbosa, K.B.F., Bressan, J., Zulet, J.A., Martínez, J.A. 2008. Influence of dietary intake on plasma biomarkers of oxidative stress in humans. *An. Sist. Sanit. Navar.* 31, 259-280.

- Bass, T.M., Weinkove D., Houthoofd K., Gems D., Partridge L. 2007. Effects of resveratrol on lifespan in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev.* 128, 546–552.
- Baur, J.A., Sinclair, D.A. 2006. Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nat Rev Drug Discov.* 5, 493–506.
- Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., Allard, J.S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P.J., Poosala, S., Becker, K.G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K.W., Spencer, R.G., Lakatta, E.G., Le Couteur, D., Shaw, R.J., Navas, P., Puigserver, P., Ingram, D.K., de Cabo, R., Sinclair, D.A. 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature.* 444, 337–342
- Benowitz, N.L., Hukkanen, J. J. P. 2009. Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handb Exp Pharmacol.* 192, 29-60.
- Borrás, C., Gambini, J., Gómez, C. M. C., Sastre, J., Pallardo, F.V., Mann, G. E. 2005. 17beta-oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2 [MAPK]/NF kappa B cascade. *Aging Cell.* 4, 113–118.
- Bokov, A., Chaudhuri, A., Richardson, A. 2004. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech Ageing Dev.* 125, 811-826.
- Box, G., Hunter W., Hunter, S. 1993. *Estadística para investigadores*. Reverté. Barcelona, España.

- Buffenstein, R., Edrey Y.H., Yang T., Mele J.2008. The oxidative stress theory of aging: embattled or invincible? Insights from non-traditional model organisms. *Age (Dordr)*. 30,99-109.
- Carrillo, R., Gibson, G. 2002. Unusual genetic architecture of natural variation affecting drug resistance in *Drosophila melanogaster*. *Genet Res*. 80, 205-213.
- Castañeda,P.L., Heres, P. M. E., Dueñas, G.I. E. 2013. *Drosophila melanogaster*: un modelo experimental. Edit. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 78 pp.
- Chambers, R.P., Call, G.B., Meyer D., Smith, J., Techau, J.A., Pearman, K., Buhlman, L.M. 2013. Nicotine increases lifespan and rescues olfactory and motor deficits in a *Drosophila melanogaster* of Parkinson`s disease. *Behav Brain Res*. 15, 95-102.
- Crowley-Weber, C.L., Dvorakova, K., Crowley C., Bernstein, H., Bernstein, C., Garewal H., Payne, C.M. 2003. Nicotine increases oxidative stress induces apoptosis and sensitizes cell to genotoxic /xenobiotic stresses. *Chem Biol Interact*. 145, 53-66.
- Delijewski, M., Wrześniok, D., Otreba, M., Beberok, A., Rok, J., Buszman, E. 2014. Nicotine impact on melanogenesis and antioxidant defense system in HEMn-DP melanocytes. *Mol Cell Biochem*. 395,109-116.
- Devinen, V.A., Heberlein, U. 2013. The Evolution of *Drosophila melanogaster* as a Model for Alcohol Research. *West J Med*. 36, 121-138.

- Devineni, A. V. Heberlein, V. 2012. Acute ethanol responses in *Drosophila* are sexually dimorphic. Proc Natl Acad Sci USA. 51, 21087-21092.
- Duarte, T.L., Lunec, J. 2005. Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. Free Radic Res. 39, 671-686.
- Dueñas, I.E., Heres, P. M.E., Castañeda, L., Graf U.2001.Easy raising of *Drosophila melanogaster* consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. Droso Inf Serv. 84, 66-169.
- Finkel, T., Holbrook, N.J. 2008. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature 408, 239-247.
- Fukuhara, K., Nagakawa, M., Nakanishi, I., Ohkubo, K., Imai, K., Urano, S., Fukuzumi, S., Ozawa, T., Ikota, N., Mochizuki, M., Miyata, N., Okuda, H. 2006. Structural basis for DNA-cleaving activity of resveratrol in the presence of Cu (II). Biorg Med Chem.14, 1437–1443.
- Gambini, J., López-Gruoso R, Olaso-González G, Inglés M, Abdelazid, K., Alami, M., Bonet-Costa, V., Borrás, C., Viña, J.2013. Resveratrol: distribution, properties and perspectives. Rev Esp Geriatr Gerontol. 48,79-88.
- Ginzkey, C., Steussloff, G., Koehler, C., Hackenberg, S., Richter, E., Hagen R., Kleinsasser, N.H. 2014. Nicotine causes genotoxic damage but is not metabolized during long-term exposure of human nasal miniorgan cultures. Toxicol Lett. 229,303-310.

- 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. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM.
- Golden, T.R., Hinerfeld, D.A., Melov, S. 2002. Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging Cell.* 2, 117-123.
- Gruber, J., Tang, S.Y., Halliwell, B. 2007. Evidence for a trade-off between survival and fitness caused by resveratrol treatment of *Caenorhabditis elegans*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1100,530–542.
- Greer, E. L., Brunet, A. 2009. Different dietary restriction regimens extend lifespan by both independent and over lapping genetic pathways in *C. elegans*. *Aging Cell.* 8,113-127.
- Guan, Z. z., Yu, W. F., Nordberg, A. 2003. Dual effects of nicotine on oxidative stress and neuroprotection in PC12 cells. *Neurochem Int.* 43, 243-249.
- Guarente, L., 2005. Calorie restriction and SIR2 genes-towards a mechanism. *Mech Aging Dev.*126,923-928
- Guarente, L. 2007. Sirtuins in Aging and Disease. *Cold Spring Harb Symp Quant B.*72, 483-488.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1988. Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease. *Hum Toxicol.* 7, 7-13

- Halliwell, B. 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr.* 16, 33-50.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2007. *Free radicals in biology and medicine.* EUA, California. Oxford.
- Halliwell, B. 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 35, 1147-1150.
- Halliwell, B. 2012. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev.* 5, 257-265.
- Hansberg, T. W. 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico.* 13, 369-382.
- Hansen, M., Taubert, S., Crawford, D., Libina, N., Lee, S.J., Kenyon, C. 2007. Lifespan extension by conditions that inhibit translation in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell.* 6, 95–110
- Harman, D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 3, 298-300.
- Harman, D. 1992. Free radical theory of aging. *Mutat Res.* 275, 257-266.
- Hermes, L. M. 2004. Oxidative stress and medical sciences. *Comp Biochem Physiol C.* 12, 369-382.
- Hollebeeck, S., Raas, T., Piront, N. Dimethyl sulfoxide (DMSO) attenuates the inflammatory response in the *in vitro* intestinal Caco-2 cell model. *Toxicol Lett.* 206, 268-275.
- Howitz, K. T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.L.,

- Scherer, B., Sinclair, D.A. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend lifespan. *Nature*. 425, 191-196.
- Imai, S., Guarente, L. 2014. NAD⁺ and sirtuins in aging and disease. *Trends Cell Biol.* 24, 464-471
 - Jia, K., Chen, D., Riddle, D.L. 2004. The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C.elegans* larval development, metabolism and lifespan. *Development*. 131, 3897-3906.
 - Joschko, M.A, Dreosti, I.E., Tuls, R.S. 1991. The teratogenic effects of nicotine *in vitro* in rats: a light and electron microscope study. *Neurotoxicol Teratol.* 13, 307–316.
 - Kaeberlein, M., McDonagh, T., Heltweg, B., Hixon, J., Westman, E.A., Caldwell, S.D., Napper, A., Curtis, R., Di Stefano, P.S., Fields, S., Bedalov, A., Kennedy, B.K. 2005. Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *J Biol Chem.* 280, 17038-17045.
 - Kaeberlein, M., McVey, M., Guarente, L. 1999. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* 13, 2570-2580.
 - Kalpana, C., Menon, V.P. 2004. Modulatory effects of curcumin on lipid peroxidation and antioxidant status during nicotine-induced toxicity. *Pol J Pharmacol.* 56, 581–586.
 - Kleiber, R. J., Unelius, R.C., Lee, C.L., Suckling, M.D., Qian, C. M, Bruck, D. 2014. Attractiveness of Fermentation and Related Products to Spotted Wing *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae). *Environ Entomol.* 43, 439-447.

- Kohler, R. E. 1994. Lords of the fly: *Drosophila* genetics and the experimental life. Edit. University of Chicago Press. EUA. 344 pp.
- Jarolim, S., Millen, J., Heeren, G., Laun, P., Goldfarb, D.S., Breitenbach, M. 2004. A novel assay for replicative lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res.5, 169–177.
- Jennings, B. H. 2011. *Drosophila* – a versatile model in biology & medicine. Materials Today. 14,190–195.
- Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M., Puigserver, P., Auwerx, J. 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. Cell.127, 1109–1122.
- Le Bourg, E. 2001. Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. FEBS Lett. 498,183-186.
- Lin, C., Yon, J.M., Jung, A.Y., Lee, J.G., Jung, K.Y., Kang, J.K., Lee, B.J., Yun, Y.W., Nam, S.Y. 2012. Resveratrol prevents nicotine-induced teratogenesis in cultured mouse embryos. Reprod Toxicol. 34,340-346.
- Linert, W., Bridge, M.H., Huber, M., Bjugstad, K.B., Grossman, S., Arendash G.W.1999. In vitro and in vivo studies investigating possible antioxidant action of nicotine: relevance in Parkinson's and Alzheimer's diseases. Biochim Biophys Acta. 1454(2), 143-152.
- Linford, H.J., Bilgir, C.J., Pletcher, S.D. 2013. Measurement of lifespan in *Drosophila melanogaster*. J Vis Exp. 7, 71-81.

- Losa, G.A. 2003. Resveratrol modulates apoptosis and oxidation in human blood mononuclear cells. *Eur J Clin Invest.* 33,818–823.
- Malherbe, Y., Kamping, A., Van Delden, W., Van de Zande, L. 2005. ADH enzyme activity and Adh gene expression in *Drosophila melanogaster* lines differentially selected for increased alcohol tolerance. *J Evol Biol.* 18, 811–819.
- Masoro, E.J., 2005. Overview of caloric restriction and ageing. *Mech. Ageing Dev.* 126, 913–922.
- Matsuoka, A., Furuta A., Ozaki, M., Fukuhara, K., Miyata, N. 2001. Resveratrol, a naturally occurring polyphenol, induces sister chromatid exchanges in a Chinese hamster lung (CHL) cell line. *Mutat. Res.* 494, 107–113.
- Mikstacka, R., Rimando A.M., Ignatowicz, E. 2010. Antioxidant effect of trans-resveratrol, pterostilbene, quercetin and their combinations in human erythrocytes *in vitro*. *Plant Foods Hum Nutr.* 65, 57-63.
- Montgomery, C., Douglas C. 1991. *Diseño y análisis de experimentos*. Iberoamérica. México, D.F. 589 pp.
- Nazir, A., Mukhopadhyay, I., Saxena, D.K., Chowdhuri, D.K. 2003. Evaluation of the No Observed Adverse Effect Level of Solvent Dimethyl Sulfoxide in *Drosophila melanogaster*. *Toxicol Mech Methods.* 13, 1452-1471.

- Newman, M.B., Arendash, G.W., Shytle, R.D., Bickford, P.C., Tighe, T., Sanberg, P.R. 2002. Nicotine's oxidative and antioxidant properties in CNS. *Life Sci.* 71, 2807-2820.
- Oberdoerffer, P., Michan, S., McVay, M., Mostoslavsky, R., Vann, J., Park, S.K., Hartlerode, A., Stegmuller, J., Hafner, A., Loerch, P., Wright, S.M., Mills, K.D., Bonni, A. 2008. SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell.* 135, 907-918.
- Ozgová, S., Hermánek, J., Gut, I. 2003. Different antioxidant effects of polyphenols on lipid peroxidation and hydroxyl radicals in the NADPH-, Fe-ascorbate- and Fe-microsomal systems. *Biochem Pharmacol.* 66, 1127-37.
- Palacios, L., S. C. 2014. Evaluación del efecto del Resveratrol en el co-tratamiento con 4NQO en SMART en ala de *Drosophila melanogaster* cruza estándar (CE). Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. 89 pp.
- Partridge, L., Pletcher, S.D., Mair, W., 2005. Dietary restriction, mortality trajectories, risk and damage. *Mech. Ageing Dev.* 126, 35–41.
- Pearson, K.J., Baur, J.A., Lewis, K.N., Peshkin, L., Price N.L., Labinskyy, N., Swindel, I W.R., Kamara, D., Minor, R.K., Perez, E., Jamieson, H.A., Zhang ,Y., Dunn S.R., Sharma, K., Pleshko, N., Woollett, L.A., Csiszar, A., Ikeno, Y., Le Couteur, D., Elliott, P.J., Becker, K.G., Navas, P., Ingram, D.K., Wolf, N.S., Ungvari, Z., Sinclair, D.A., de Cabo, R. 2008. Resveratrol delays

age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab.* 8, 157-168.

- Powers, R.W., Kaeberlein, M., Caldwell, S.D., Kennedy, B.K., Fields, S. 2006. Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes Dev.* 20, 174-184.
- Rascón, B., Basil, P., Hubbard, D. A., Sinclair, G. V., Amdam. 2012. The lifespan extension effects of resveratrol are conserved in the honey bee and may be driven by a mechanism related to caloric restriction. *Aging.* 4, 499-508.
- Rogina, B., Helfand, S.L. 2004. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 15998–16003.
- Rubin, G. M., Yandell, M.D., Wortman, J.R., Miklos, G.L., Nelson, C.R., Hariharan, I.K., Fortini, M.E., Li, P.W., Apweiler, R., Fleischmann, W., Cherry, J.M., Henikoff, S., Skupski, M.P., Misra, S., Ashburner, M., Birney, E., Boguski, M.S., Brody, T., Brokstein, P., Celniker, S.E., Chervitz, S.A., Coates, D., Cravchik, A., Gabrielian, A., Galle, R.F., Gelbart, W.M., George, R.A., Goldstein, L.S., Gong, F., Guan, P., Harris, N.L., Hay, B.A., Hoskins, R.A., Li, J., Li, Z., Hynes, R.O., Jones, S.J., Kuehl, P.M., Lemaitre, B., Littleton, J.T., Morrison, D.K., Mungall, C., O'Farrell, P.H., Pickeral, O.K., Shue, C., Vosshall, L.B., Zhang, J., Zhao, Q., Zheng, X.H., Lewis, S. 2000. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science.* 24, 2204-2215.

- Ruiz, A.M., Rodríguez G.I., Rubio, C.C.,Revert, A.H. 2004. Efectos tóxicos del tabaco. Rev. Toxicol. 21, 64-71.
- San Martín, S. C., Soto, O. R., Sanchez, S. I., Mendez, A. E. 2011. Antioxidant properties of dimethyl sulfoxide and its viability as a solvent in the evaluation of neuroprotective antioxidants. J Pharmacol Toxicol Methods. 63, 209-215.
- Shakibaei, M., Harikumar, K.B., Aggarwal, B.B.2009. Resveratrol addiction: to die or not to die. Mol Nutr Food Res. 53,115-128.
- Siegmund, L. E. Pfannhauser, W. 1999. Determination of the nicotine content of various edible nightshades (Solanaceae) and their products and estimation of the associated dietary nicotine intake. Agric Food Chem. 47,3113-3120
- Signorelli, P., Ghidoni, R. 2005. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. J Nutr Biochem. 16, 449-466.
- Silva, J. 2013.Efecto modulador del resveratrol contra el promutágeno uretano con SMART en ala de *Drosophila melanogaster*, cruza estándar (CE). Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. 73 pp.
- Soto, O. R., Méndez, A. E., Hermida, A. A, López, R. A.M., Labandeira, G. J.L. 2002. Effects of (-)-nicotine and (-) - cotinine on 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress and neurotoxicity: relevance for Parkinson's disease. Biochem Pharmacol. 64, 125-35.

- Schmitt, E, Lehmann L, Metzler M, Stopper H. 2002. Hormonal and genotoxic activity of resveratrol. *Toxicol. Lett.* 136, 133–142.
- Sobkowiak, R., Lesicki, A. 2009. Genotoxicity of nicotine in cell culture of *Caenorhabditis elegans* evaluated by the comet assay. *Drug Chem Toxicol.* 32, 252-257.
- Sohal, S.R., Weindruch, R. 1996. Oxidative stress, caloric restriction and aging. *Science* 273, 59-63.
- Stocco, B., Toledo, K., Salvador, M., Paulo, M., Koyama, N., Torqueti, T. M. R. 2012. Dose-dependent effect of resveratrol on bladder cancer cells: chemoprevention and oxidative stress. *Maturitas.* 72, 72-78.
- Sunagawa, T., Shimizu, T., Kanda, T., Tagashira, M., Sami, M., Shirasawa, T. 2011. Procyanidins from apples (*Malus pumila Mill*) extend the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Planta Med.* 77, 122-127.
- Tatar, M., 2007. Diet restriction in *Drosophila melanogaster*. Design and analysis. *Interdiscip Top Gerontol.* 35, 115–136.
- Tissenbaum, H.A., Guarente, L. 2001. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 410, 227–230.
- Valenzano, D.R., Terzibasi, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L., Cellierino, A. 2006. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Curr Biol.* 16, 296-300.
- Valko, M., Leibfritz D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39, 44-84.

- Van Herrewege, J., David, J.R. 1984. Extension of life duration by dietary ethanol in *Drosophila melanogaster*: response to selection in two strains of different origins. *Genetica*. 63, 61-70
- Vargas, F., Rivas, C., Nursama, A., Zoltan, T. 2007. Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento. *Avances en Química*. 2, 3-15.
- Viswanathan, M., Kim, S.K., Berdichevsky, A., Guarente, L. 2005. A role for SIR-2.1 regulation of ER stress response genes in determining *C. elegans* life span. *Dev. Cell*. 9, 605–615.
- Wu, C.F., Yang, J.Y., Wang, F., Wang, X. 2013. Resveratrol: botanical origin, pharmacological activity and applications. *Chin J Nat Med*. 11, 1–15
- Walford, R.L., Harris S., Weindruck, R. 1987. Dietary restriction and aging: historical phase, mechanisms, current directions. *J. Nutr.* 117, 1650–1654.
- Wang, C., Wheeler, C.T., Alberico, T., Sun, X., Seeberger, J., Laslo, M., Spangler, E., Kern, B., de Cabo, R., Zou, S. 2011. The effect of resveratrol on lifespan depends on both gender and dietary nutrient composition in *Drosophila melanogaster*. *Age (Dordr)*. 35, 69-81.
- Wood, J.G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K., Helfand, S.L., Tatar, M., Sinclair, D. 2004. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*. 430, 686–689
- Xia, L., Ding, F., Zhu, J.H., Fu, G.S. 2011, Resveratrol attenuates apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells induced by high shear stress and pro inflammatory factors. *Hum Cell* 24, 127–33.

- Yildiz, D., Ercal, N., Armstrong, D. W. 1988. Nicotine enantiomers and oxidative stress. *Toxicol.* 130, 155-165.
- Yildiz, D. 2004. Nicotine, its metabolism and overview of its biological effects. *Toxicol.* 43,619-632.
- Zorrilla, G. A. E. 2002. El envejecimiento y el estrés oxidativo. *Rev Cubana Invest Biomed.* 21, 178-185.
- Zou, S., Carey, J.R., Liedo, P., Ingram, D.K., Müller, H.G., Wang, J.L., Yao, F., Yu, B., Zhou, A. 2009. The prolongevity effect of resveratrol depends on dietary composition and calorie intake in a tephritid fruit fly. *Exp Gerontol.* 44,472-476.

ANEXOS

ANEXO I. *Drosophila melanogaster*

El nombre *Drosophila* proviene del griego "amor al rocío" y *melanogaster* se debe a la coloración oscura del abdomen en el macho. Se conoce como la mosca de la fruta o mosca del vinagre (Castañeda *et al.*, 2013) (Figura 23). *Drosophila melanogaster* ha sido ampliamente utilizada como modelo por más de un siglo para estudiar una amplia gama de procesos biológicos relacionados con genética, desarrollo embrionario, aprendizaje, comportamiento, envejecimiento, longevidad, etc., (Jennings, 2011).

Drosophila melanogaster tiene muchas de las manifestaciones de la senescencia observadas en mamíferos (Zorrilla, 2002). Se utiliza como modelo experimental porque la mosca tiene 177 genes que son ortólogos a 289 genes de enfermedades humanas, lo que proporciona la base para el análisis de los procesos básicos que intervienen en las enfermedades humanas (Rubin *et al.*, 2000).

Aunque los seres humanos y moscas de la fruta pueden no parecer muy similares, se ha establecido que la mayoría de los mecanismos biológicos fundamentales y las vías que controlan el desarrollo y supervivencia son conservadas a través de la evolución entre estas dos especies (Jennings, 2011).

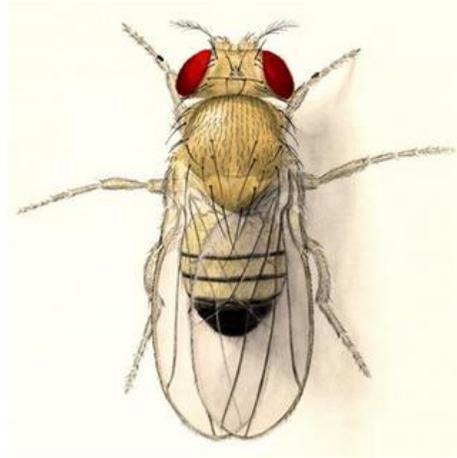


Fig. 23. *Drosophila melanogaster*, macho con punta del abdomen redondeada, con tres segmentos visibles y un par de peines sexuales en el primer par de patas (Tomado de drosophilamelanogaster27.blogspot.com).

Taxonomía de Drosophila melanogaster (Meigen, 1830)

Phylum: Artropoda

Clase: Hexapoda

Orden: Diphthera

Familia: Drosophilidae

Subfamilia: Drosophilina

Género: *Drosophila*

Subgénero: *Sophophora*

Especie: *Drosophila melanogaster*

D. melanogaster tiene dimorfismo sexual ya que la hembra es más grande que el macho, éste presenta ocho segmentos abdominales de los cuales tres están fusionados y melanizados; además presentan en el tarso del primer par de patas peines sexuales, los cuales son grupos de diez cerdas fuertes (Castañeda *et al.*, 2013) (Figura 24)

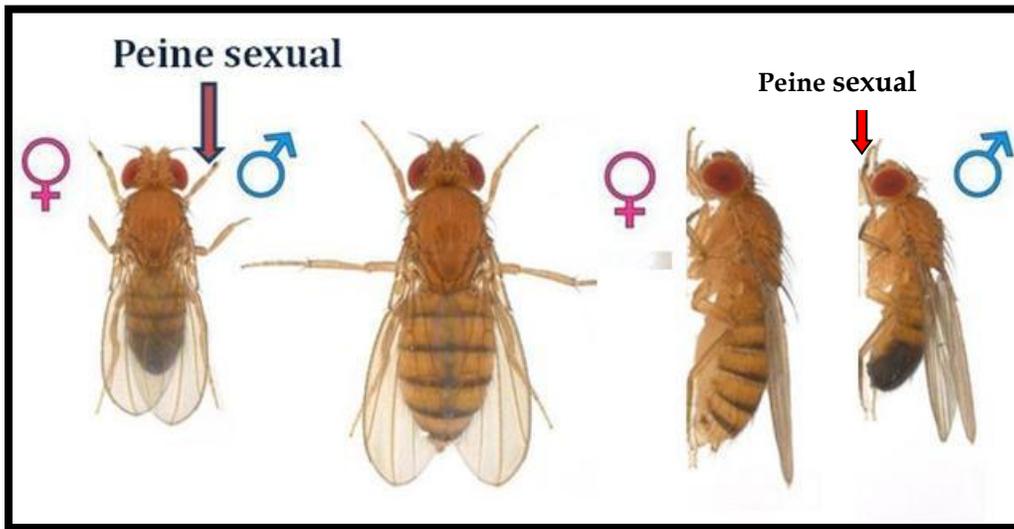


Fig.24. Dimorfismo sexual en *D. melanogaster* (Modificado de seresmodelicos.csic.es).

Ciclo de vida

El ciclo de vida es corto por lo tanto ofrece una gran ventaja para la investigación científica. *D. melanogaster* es un organismo holometábolo porque presenta una etapa larvaria, una pupal y una adulta, lo cual dura desde 10 días a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 65% HR (Dueñas *et al.*, 2001).

El ciclo inicia con la ovoposición, el embrión se desarrolla en el huevo por alrededor de un día (a 25°C) antes de la eclosión como una larva.

La larva se alimenta y llega a consumir de 3 a 5 veces su peso (Castañeda *et al.*, 2013) por lo tanto aumenta de talla (pasa por tres mudas) durante cinco días hasta que se convierte en pupa e inicia la metamorfosis para pasar a la siguiente etapa que es la adulta (Jennings, 2011) (Figura 25).

Durante la metamorfosis, la mayoría del tejido larval se destruye. Los tejidos adultos (ala, patas, ojos) se desarrollan a partir de grupos de células conocidas como discos imaginales (Rubin *et al.*, 2000).

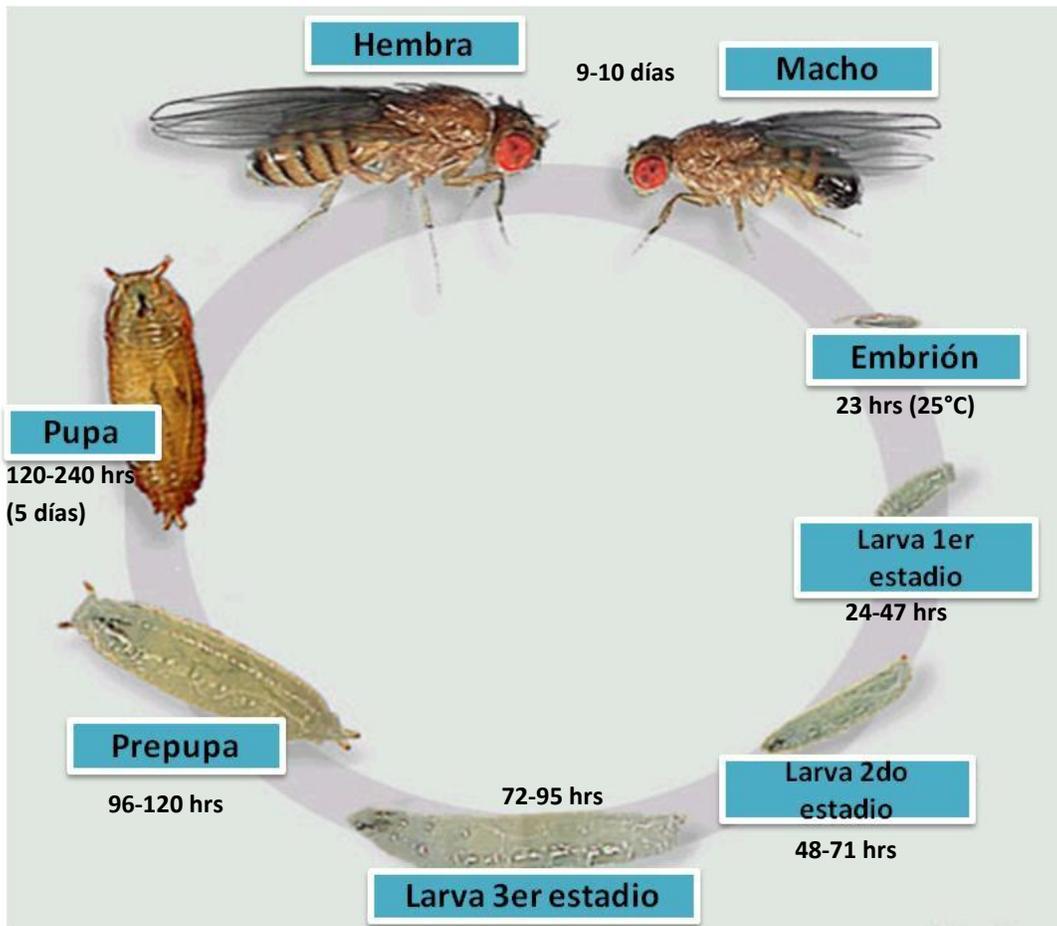


Fig. 25. Ciclo de vida *D. melanogaster* en condiciones de 25 °C (Tomada de Castañeda *et al.*, 2013).

ANEXO II. Estrés oxidante, radicales libres y especies reactivas de oxígeno

El estrés oxidante se refiere a la situación de desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y de defensa antioxidante que pueden ocasionar daños y beneficios en sistemas biológicos (Lobo *et al.*, 2010). Un concepto relacionado con el estrés oxidante son los RL• que pueden ser generados en una gran variedad de sistemas biológicos como los fenómenos que ocurren diariamente en el cuerpo humano. Y en sistemas químicos como la formación de plásticos y el envejecimiento de las pinturas (Halliwell, 2001).

En la estructura de los átomos y moléculas, los electrones están asociados en pares, cada par se mueve dentro de una región orbital. Un radical libre es cualquier especie independiente (de ahí el término "libre") que contiene una o más electrones no apareados. El electrón desapareado está en uno de los últimos orbitales (Mc Cord, 2000).

La formación de los radicales libres puede ser por medio de un rompimiento homolítico (Figura 26).

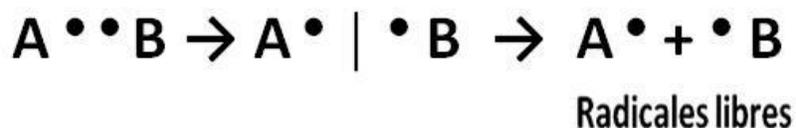


Fig.26. Formación de radicales libres por rompimiento homolítico (Tomado de Laguna, 2008).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Tabla X), son mencionadas a menudo en la literatura biomédica de los radicales libres, y es un término colectivo que incluye radicales de oxígeno con un electrón desapareado, además los RL^\bullet pueden reaccionar con otras moléculas ocasionando daños.

A continuación se enlistan algunos RL^\bullet y ERO (Halliwell, 2001).

Tabla X. Radicales libres y especies reactivas de oxígeno (Tomada de Halliwell, 2001).

Especies reactivas de oxígeno	
Radicales	No radicales
Superóxido, $O_2^{\bullet-}$	Peróxido de hidrogeno, H_2O_2
Hidroxilo, OH^\bullet	Ácido hipocloroso, $HOCl$
Peroxilo, RO_2^\bullet	Ácido hipobromoso, $HOBr$
Hidroperoxilo, HO_2^\bullet	Ozono, O_3
Alcoxilo, RO^\bullet	Oxígeno singulete, $1\Delta g O_2$
Oxígeno singulete $1 \Sigma O_2$	

Daño oxidante en las biomoléculas

Los radicales libres pueden reaccionar con moléculas orgánicas (Figura 27), en especial con las que poseen enlaces dobles como los lípidos insaturados, los anillos aromáticos de aminoácidos y las bases nitrogenadas (Le Bourg, 2001; Halliwell, 2007).

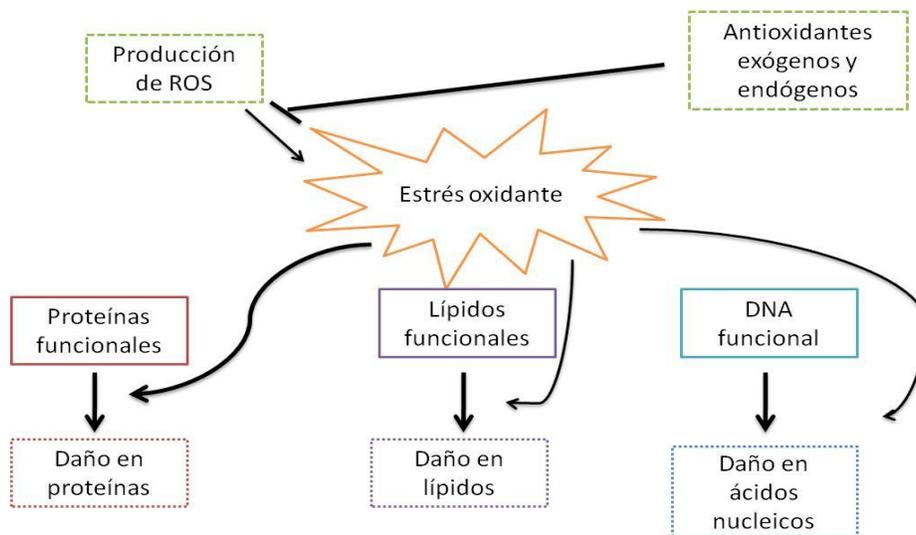


Fig 27. Rol del estrés oxidante en el daño en proteínas, lípidos y DNA

La alteración más importante inducida por los radicales libres en los lípidos es la lipoperoxidación. La lipoperoxidación es un proceso que afecta a los lípidos insaturados de la membrana bajo condiciones de estrés oxidante. Afecta la estructura de la membrana, el empaquetamiento de los componentes lipídicos y el funcionamiento intrínseco de la membrana (Vargas, 2007).

Las membranas celulares contienen fosfolípidos que tienen ácidos grasos con ligaduras dobles. Estos ácidos grasos son poliinsaturados y son más propensos a la oxidación que los saturados ya que los metilos del carbono alílico vecino entre dos dobles ligaduras pueden perder fácilmente un hidrógeno. Posteriormente se genera un radical carbono en un ácido graso, éste reacciona con O_2 para formar un radical peroxilo. El radical peroxilo puede robar un hidrógeno alílico a otro metileno con lo cual se propaga la reacción (Figura 28) (Hansberg, 2002).

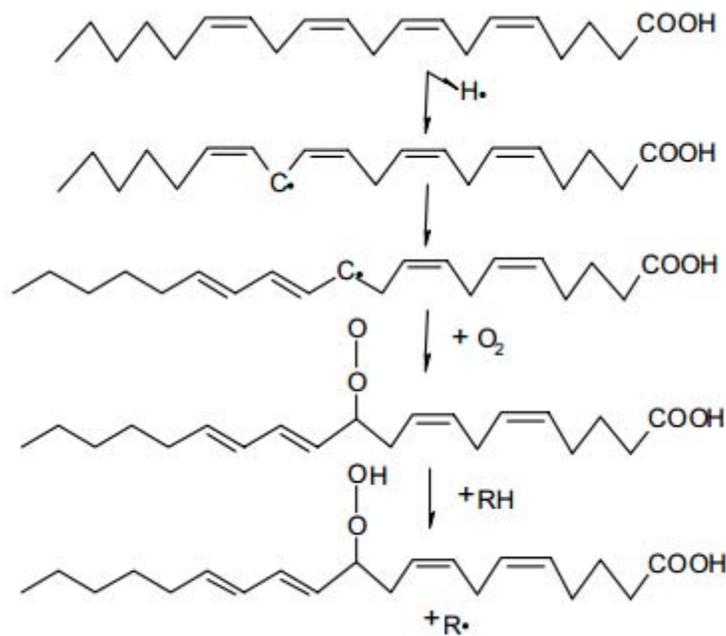


Fig. 28. Oxidación de lípidos, modificación del ácido araquidónico. La abstracción de un hidrógeno genera un radical en un carbono, éste puede migrar a esto se le llama rearreglo, con lo cual hay un reacomodo de las dobles ligaduras y en presencia del dióxígeno se genera un radical peroxilo que se puede apropiarse de un hidrógeno de otro lípido, con lo que se propaga la reacción.

En el caso de los ácidos nucleicos ocurren cambios en las bases nitrogenadas que pueden generar mutaciones cuando se duplica el ADN. El daño por los radicales libres puede ocasionar la modificación de bases nitrogenadas como la 8-hidroxi guanina, la cual es un buen indicador para detectar daños en ADN debido a el estrés oxidante (Hermes, 2004) (Figura 29 y Figura 30). La 8-hidroxi guanina puede formar puentes de hidrógeno con una adenina en vez de formarlo con una citosina.

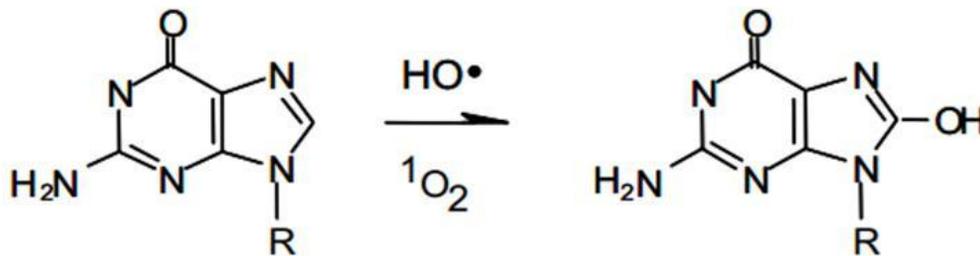


Fig 29. Productos de oxidación en el DNA y las proteínas. La 8-hidroxi guanina es el principal producto de oxidación de las bases nitrogenadas.

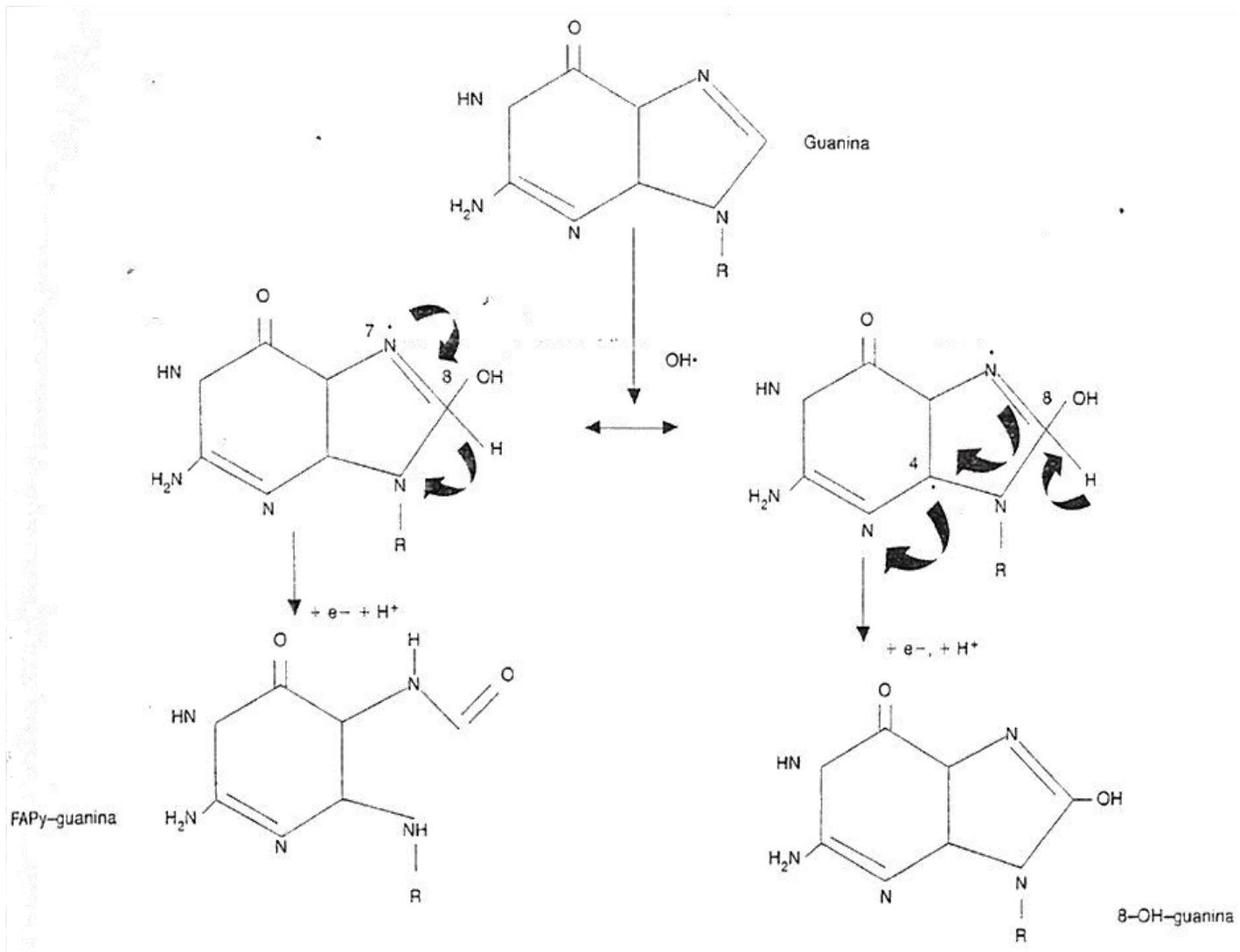


Fig. 30. Modificaciones de la guanina por acción de los radicales libres. a) El hidrogeno de la posición 7 del anillo purínico se colocó en la posición 8, generando el compuesto FAPy-guanina. b) El OH se unió a la posición 8 del anillo purínico. La adición al carbono 8 produce un aducto radical C-8-OH, llamado 8-oxo-7, 8-dihidro-2-deoxiguanosina o bien 8-OHdG.

En las proteínas según el aminoácido que reaccione con las ERO, puede haber cambios en la estructura primaria, ya que cada residuo puede modificarse y convertirse en otro diferente. Los aminoácidos más susceptibles son la histidina, la prolina, la cisteína, el triptófano, la tirosina y en menor grado la arginina, la lisina y metionina. La presencia de iones metálicos dentro de las proteínas puede catalizar la reacción Fenton e iniciar una cadena de reacciones de radicales libres, este proceso se conoce como oxidación de proteínas catalizada por metales (MCO) (Roberfroid y Buc, 1995)

Uno de los fenómenos más importantes durante la oxidación de proteínas es la formación de carbonilos que puede estar ligada a la transformación de un residuo aminoacídico, y la amidación (Figura 31) Por ejemplo, una histidina puede transformarse en una prolina o en un ácido glutámico y al mismo tiempo generar un carbonilo en la cadena lateral de un residuo vecino. Los grupos carbonilos son un distintivo de una proteína oxidada y la hace susceptible a la proteólisis. Otra alteración relacionada con las ERO es el entrecruzamiento intra e intermolecular por la oxidación de cisteínas principalmente en los grupos SH, lo cual fomenta la aparición de puentes disulfuro (Figura 32) (Roberfroid y Buc, 1995).

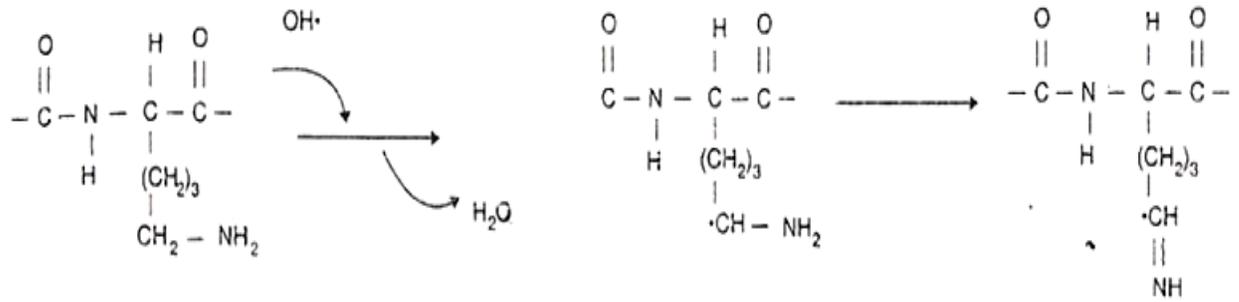


Fig. 31. Mecanismos de desaminación de un residuo de lisina a través de la formación de una amina.

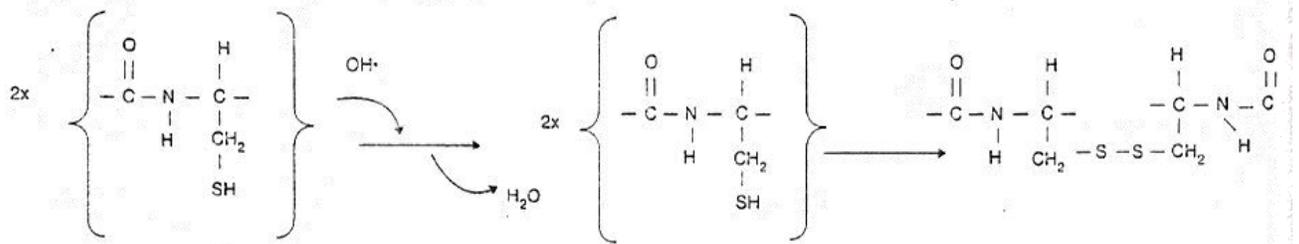


Fig. 32. Mecanismos de formación de puentes disulfuro mediada por radicales libres.