



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Evaluación del efecto del resveratrol sobre la genotoxicidad de la nicotina en SMART en ala de *Drosophila melanogaster* en las cruas estándar y de bioactivación elevada”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A:
MAURO DE JESÚS MAGAÑA ACOSTA

DIRECTORA DE TESIS:
M. en C. IRMA ELENA DUEÑAS GARCÍA

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX 2017





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.

Todo el que disfruta cree que lo que importa del árbol es el fruto, cuando en realidad es la semilla. He aquí la diferencia entre los que creen y los que disfrutan.
– Friedrich Nietzsche

On peut conduire une personne sur le chemin de la guérison, mais on ne peut la guérir: C'est une mythe, un mensonge, une folie, un escroquerie de dire que quelqu'un peut vous guérir [...] On est guéri par le fait qu'on est en train de changer, et d'avancer vers des situations qui sont de plus en plus agréables et confortables pour nous.

Chè per vendetta mai non sanò piaga.

A mis padres Teresa y José: Por darme la vida y permitirme formar parte de sus vidas y por el amor que me tienen. Por todo apoyo durante toda mi vida y por alentarme a seguir adelante y a ser una mejor persona día con día, nunca terminaría de agradecerles lo que han hecho por mí. Gracias por demostrarme que todo se puede.

A mis hermanos Marisol y José Luis: por cuidar de mí, por los momentos, las peleas, por el apoyo que a pesar de todo siempre me han brindado.

A Alby: por ser mi amiga desde el primer semestre, por todo el tiempo pasado, las pláticas, los enojos, por “soportarme” y aconsejarme en las buenas, en las malas y en mis momentos más oscuros.

A Andrea: por las risas y los buenos momentos, por tu capacidad de darle doble sentido a todo, por los malos consejos, por ayudarme y escucharme cuando lo necesité.

A Carlos (ingeniero): por tu amistad desde el primer semestre, por los buenos momentos en prácticas de campo, las pláticas amenas y por “rockear” el tiempo que duró atrox (bueno, sólo te dedicabas a comer).

A César: por ser de las pocas personas que dicen las cosas como son, por la sensatez en los consejos y por el bullying a Noé y Poncho.

A Elena: por confiar en mí y estar en la última etapa, las fiestas, las últimas prácticas de la carrera, soportar cuando te molesto, por mi cumpleaños en Veracruz que casi no recuerdo y los festivales de música.

A Gloria: por tu sinceridad y amistad, por los consejos, por las fiestas, por el bullying mutuo y por haber aguantado conmigo hombro a hombro los duros entrenamientos del equipo, eres toda una “luchona”.

A Hada: por los buenos momentos, por las risas y tu sinceridad. Por las fiestas y cada idiotez cometida en las quemas, fines de semestre y el depa.

A Jazz: por las risas y los buenos momentos, por confiar en mí, por molestar y por escuchar.

A Noé: por tu amistad, por hacernos reír a todos, por hacer que casi nos maten en el “Noé en llamas” y ahora pueda reírme de ello.

A Sergio, Poncho, Lalo, Ventura: por su amistad y los buenos momentos, por las bromas y la indiscreción.

A Zyan, Erik, Julier, Shes, Brenda, Andrea, Potter, Slayer, Gerardo, Memo, Lirio: por los buenos momentos, la sinceridad, el apoyo, las fiestas, etc. (ya no quiero escribir, ustedes saben que odio estas cosas, pero ya saben lo que pienso de cada uno).

A la maestra Irma Dueñas: por aceptarme en el laboratorio, enseñarme y apoyarme cuando lo necesité, por su disponibilidad y haberme dado la oportunidad de ir a EU ya que obtuve muchísima experiencia.

A la maestra María Eugenia Heres: por sus lecciones, por alentarme a seguir a la maestría y el doctorado y por hacerme saber que siempre hay que arriesgarse.

Al profesor Luis Felipe Santos y la maestra Laura Castañeda: por apoyarme las veces que lo necesité, enseñarme y hacer más amena mi estancia en el laboratorio.

A la doctora Ana María Bores y el doctor Elías Piedra: por las correcciones y su aportación para el mejoramiento de esta tesis, por tomarse el tiempo de leer todo el trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México: Por permitirme ser parte de sus aulas, por darme formación académica, deportiva, buenos amigos, experiencias y una segunda casa.

1.- Contenido

1.- Contenido	1
2.- Lista de abreviaturas	3
3.- Índice de figuras	4
4.-Índice de tablas	5
5.- Resumen	6
6.- Introducción	7
6.1.- Metabolismo xenobiótico (MX) y citocromos p450 (Cyp450s).....	10
6.2.- Nicotina (NIC).....	12
6.3.- Resveratrol (RES).....	15
7.- Antecedentes	19
7.1.- Efecto genotóxico de la NIC.....	19
7.2.- Efecto citotóxico de la NIC	19
7.3.- Efecto quimiopreventivo del RES.....	20
7.4.- Efecto genotóxico del RES	20
7.5.- Efecto citotóxico del RES.....	21
7.6.- Efecto del RES sobre el ciclo celular y la apoptosis.....	21
7.7.- Efecto pro-oxidante del RES	21
8.- Justificación.....	22
9.- Hipótesis.....	22
10.- Objetivos	23
10.1.- Objetivo general	23
10.2.- Objetivos particulares.....	23
11.- Materiales y métodos	24
11.1.- Químicos	24
11.2.- Biológicos.....	25
11.3.- Propagación de las cepas de <i>D. melanogaster</i>	25
11.4.- Cruza de bioactivación elevada (HB).....	26
11.5.- Cruza estándar (ST).....	26
11.6.- Colecta de huevos	26
11.7.- Diseño experimental	27
11.8.- Disección y montaje de alas.....	27

11.9.- Revisión al microscopio	28
11.10.- Análisis estadístico.....	28
12.- Resultados	30
12.1. Tratamientos NIC	31
12.1.2.- Distribución de clones en los tratamientos NIC	33
12.2. Tratamientos RES	35
12.2.1.- Distribución de clones en el tratamiento RES	37
12.3. Co-tratamientos NIC + RES	39
12.3.1.- Distribución de clones en los co-tratamientos NIC + RES	41
13.- Discusión.....	43
13.1.- Tratamientos NIC	43
13.2.- Tratamiento RES.....	47
13.3.- Co-tratamientos NIC + RES	51
14.- Conclusiones.....	55
15.- Recomendaciones.....	56
16.- Bibliografía	57
17.- Anexo 1	81
18.- Anexo 2	85
18.1.- <i>Drosophila melanogaster</i>	85
18.2.- Ciclo de vida.....	87
18.3.- Cromosomas de <i>D. melanogaster</i>	89
19.- Anexo 3	90
19.1.- Prueba de Mutación y Recombinaciones Somáticas (SMART)	90

2-. Lista de abreviaturas

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

CYP450s: Citocromos P450.

EtOH: Etanol.

***flr*³:** Marcador recesivo (flare).

HB: Cruza de bioactivación elevada de *D. melanogaster*.

HR: Humedad relativa.

ICH: Intercambio de cromátidas hermanas.

μM: Micromolar.

mM: milimolar.

MNs: Micronúcleos

***mwh*:** Marcador recesivo (multiple wing hair).

MX: Metabolismo xenobiótico.

NIC: Nicotina.

pH: Potencial de hidrógeno.

RES: Resveratrol.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

SMART: Prueba de mutación y recombinación somática (Somatic Mutation And Recombination Test).

ST: Cruza estándar de *D. melanogaster*

TG: Toxicología genética.

URE: Uretano.

3.- Índice de figuras

Figura 1. Interacción del xenobiótico con el material genético.	8
Figura 2: Proceso de biotransformación de xenobióticos lipofílicos.	11
Figura 3. Estructura química de la NIC.....	12
Figura 4. Metabolismo de la NIC	13
Figura 5. Principales fuentes de RES.....	16
Figura 6. Estructuras químicas de los isómeros <i>trans</i> y <i>cis</i> del RES.....	16
Figura 7. Propagación de las cruza HB y ST.....	25
Figura 8. Frecuencia de clones en los tratamientos NIC en la cruza HB.....	32
Figura 9. Frecuencia de clones en los tratamientos NIC en la cruza ST.....	32
Figura 10. Distribución de los clones en los tratamientos de NIC en la cruza HB.	34
Figura 11. Distribución de los clones en los tratamientos de NIC en la cruza ST.....	34
Figura 12. Frecuencia de clones en el tratamiento RES en la cruza HB.....	36
Figura 13. Frecuencia de clones en el tratamiento RES en la cruza ST	36
Figura 14. Distribución de clones en el tratamiento RES en la cruza HB.....	38
Figura 15. Distribución de clones en el tratamiento RES en la cruza ST.. ..	38
Figura 16. Frecuencia de clones en los co-tratamientos NIC + RES en la cruza HB. ...	40
Figura 17. Frecuencia de clones en los co-tratamientos NIC + RES en la cruza ST.....	40
Figura 18. Distribución de clones en los co-tratamientos NIC+RES en la cruza HB	42
Figura 19. Distribución de clones en los co-tratamientos NIC+RES en la cruza ST.....	42
Figura 20. Ejemplar de <i>D. melanogaster</i>	86
Figura 21. Dimorfismo sexual en <i>D. melanogaster</i>	87
Figura 22. Ciclo de vida de <i>D. melanogaster</i>	88
Figura 23. Cromosomas de <i>D. melanogaster</i>	89
Figura 24. Marcador <i>mwh</i>	91
Figura 25. Marcador <i>flr³</i>	91
Figura 26. Obtención de las cruza HB y ST.....	93
Figura 27. Evento genético que genera células normales.....	94
Figura 28. Evento genético (no disyunción).....	94
Figura 29. Evento genético (mutación puntual).	95
Figura 30. Evento genético (delección).	95
Figura 31. Evento genético (recombinación distal al centrómero).	96
Figura 32. Evento genético (recombinación cercana al centrómero).....	96

4.-Índice de tablas

Tabla 1. Tratamientos crónicos aplicados en las cruza HB y ST.	27
Tabla 2. Resultados completos de SMART en la cruza HB	81
Tabla 3. Análisis de la distribución del tamaño de clones <i>mwh</i> en la cruza HB.....	82
Tabla 4. Resultados completos de SMART en la cruza ST	83
Tabla 5. Análisis de la distribución del tamaño de clones <i>mwh</i> en la cruza ST.....	84
Tabla 6. Taxonomía de <i>D. melanogaster</i>	86

5.- Resumen

La nicotina (NIC) es el compuesto responsable de la adicción al tabaco, tiene la capacidad de generar ROS que pueden dañar el material genético de los organismos y esto ha sido reconocido como uno de sus mecanismos tóxicos más importantes. Por ende, se han investigado compuestos con potencial antioxidante que puedan ya sea modular o inhibir el potencial genotóxico de la NIC. El resveratrol (RES) se produce en 72 especies de plantas y está presente en varios frutos que forman parte de la dieta humana, principalmente en frutos rojos. Estudios en modelos *in vivo* han demostrado que el RES tiene efectos antioxidantes y protectores sobre diversos procesos biológicos, esto apoya la idea de que este compuesto pueda ser un agente quimioprotector. Por lo anterior, se evaluó el efecto del RES sobre la genotoxicidad de la NIC en las cruces estándar (ST) y de bioactivación elevada (HB) de *D. melanogaster* usando SMART, exponiendo las larvas de tercer estadio a los tratamientos crónicos: NIC [12.5, 25 y 50 μM], RES [11 μM] y co-tratamientos NIC [12.5, 25 y 50 μM] + RES [11 μM]. Todos los 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 el software SMART PC 2.1. Las pruebas U de Mann-Whitney y Wilcoxon y Kolmogorov-Smirnov fueron realizadas con el software STAT-Graphics 7.0. Los resultados indicaron que en la cruce HB no hubo daño genotóxico por parte de ninguno de los tratamientos de NIC, RES o los co-tratamientos NIC + RES, pero sí se afectó la división celular de los discos imaginales del ala en todos los tratamientos y co-tratamientos excepto NIC [12.5 μM]. Mientras que en la cruce ST se encontró genotoxicidad solamente en el tratamiento NIC [12.5 μM] y en el co-tratamiento NIC [25 μM] + RES [11 μM]. Sin embargo, también se afectó la división celular en todos los tratamientos y co-tratamientos, esto podría indicar una modulación en el ciclo celular probablemente por un efecto apoptótico o citotóxico. Se concluye que el tratamiento NIC [12.5 μM] y el co-tratamiento NIC [25 μM] + RES [11 μM] son genotóxicos sólo en la cruce ST y RES [11 μM] no fue genotóxico pero tiene la capacidad de alterar la división celular.

Palabras clave: antioxidante, *Drosophila melanogaster*, genotoxicidad, nicotina, quimiopreención, resveratrol, SMART en ala.

6.- Introducción

Todos los organismos están expuestos a diversos agentes que pueden alterar la estructura química de su material genético, por ejemplo: la luz ultravioleta, las especies reactivas de oxígeno (ROS) (por sus siglas en inglés) y los xenobióticos (Brusick, 1988; Guerrero *et al.*, 2005).

El término xenobiótico es usado para describir compuestos generalmente lipofílicos que son ajenos al organismo y no están implicados en procesos de nutrición (Brusick, 1988). Estos compuestos pueden ingresar al cuerpo ya sea por inhalación, absorción o ingestión y podemos encontrarlos en medicamentos, pesticidas, cosméticos, productos industriales e incluso alimentos. (Xu *et al.*, 2005).

Debido a lo anterior, los organismos utilizan una serie de enzimas que transforman estos compuestos en otros menos dañinos y así facilitan su eliminación, todo esto por medio del “metabolismo xenobiótico” (MX) (Xu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007). Si estas enzimas no existieran, el organismo estaría expuesto a diversas patologías e incluso la muerte, ya que algunos compuestos pueden acumularse en compartimientos hidrofóbicos en la célula dificultando o impidiendo la eliminación de los mismos, así como la capacidad de algunos de interactuar y alterar el material genético (Brusick, 1988).

La medida del daño genético causado por los xenobióticos sobre un organismo es el objeto de estudio de la Toxicología Genética (TG) y con ella han aparecido conceptos como: “potencial genotóxico” que es utilizado para indicar la posible capacidad que tienen determinados compuestos químicos para causar un proceso mutagénico o recombinogénico y “genotoxicidad” que es la toxicidad sobre el genoma (Repetto-Jiménez, 2009).

La TG analiza la acción de los agentes que pueden modificar el material genético, estos pueden ser clasificados como directos (mutágenos) e indirectos (promutágenos) (Vogel, 1991), cuyos mecanismos de acción sobre el genoma incluyen entre otros: sustitución de bases nitrogenadas, oxidación de bases, desaminación y/o alquilación (Klaasen *et al.*, 2005; Repetto-Jiménez, 2009).

El daño causado sobre el genoma puede derivar en mutagénesis, carcinogénesis, teratogénesis y rotura cromosómica, estos eventos ocurren cuando determinadas moléculas o procesos físicos alcanzan el DNA, y como consecuencia aparecen procesos que en ocasiones son de naturaleza irreversible (Quillardet *et al.*, 1986).

La lesión que puede producir un xenobiótico en el DNA puede ser reparada eficiente o ineficientemente de tal manera que el daño genético se eliminará o terminará expresándose en forma de mutación, ya sea en células somáticas y/o germinales. En células somáticas las alteraciones pueden ser dominantes o recesivas, y pueden transmitirse por división celular ocasionando cáncer y/o muerte celular. Mientras que en células germinales se pueden producir mutaciones hereditarias e infertilidad (Teaf y Middendorf, 2003) (Figura 1).

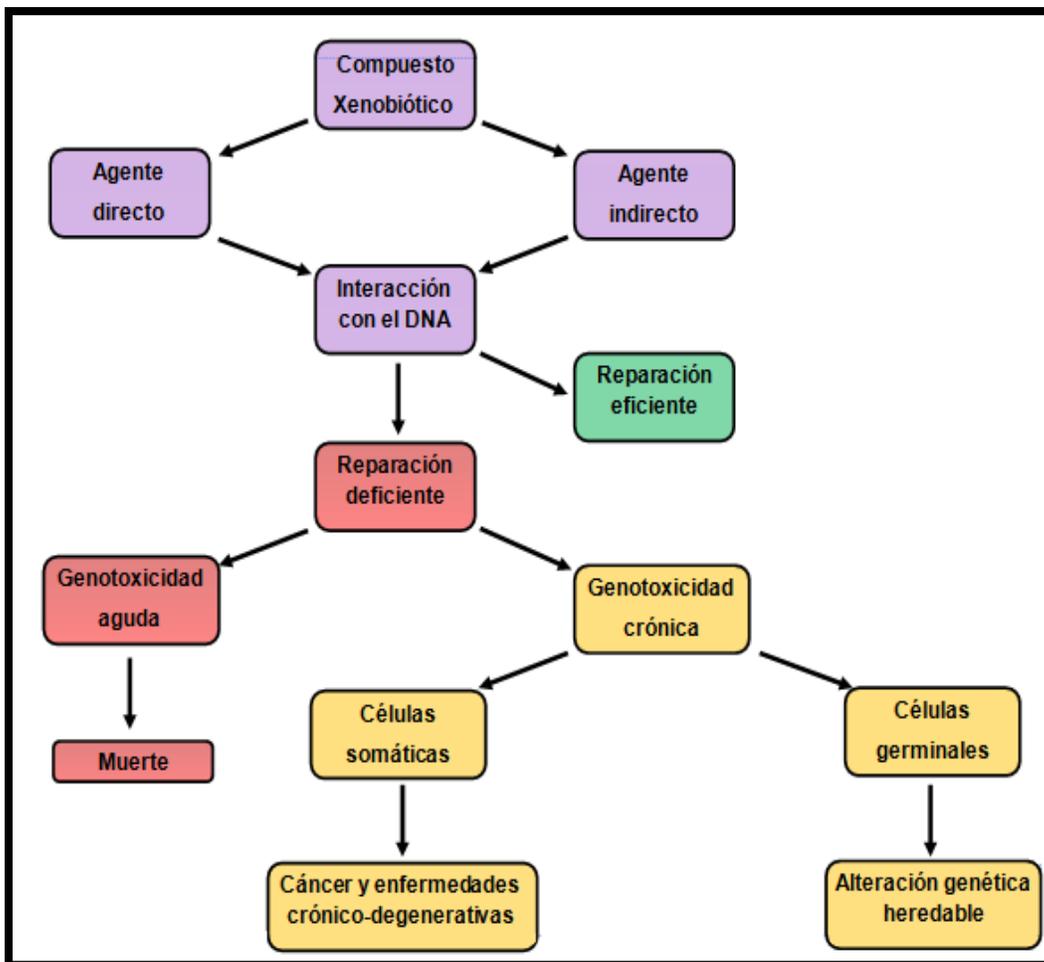


Figura 1. Interacción del xenobiótico con el material genético.

Las mutaciones en su mayoría pueden ser perjudiciales para el individuo que las sufre debido a que la expresión de algunos genes dañados pueden generar un RNA o una proteína alterada, ya sea eliminando la funcionalidad de la misma o causando su sobreexpresión (Miller y Miller, 1981).

A través del tiempo y mediante estudios epidemiológicos se ha podido establecer un paralelismo entre diversos aspectos de la mutagénesis y de la carcinogénesis, estimándose que aproximadamente el 70% de los cánceres en el hombre podrían ser prevenidos si el factor de riesgo principal pudiera ser identificado (Doll y Peto, 1981).

Al ser considerada la carcinogénesis en muchas ocasiones como consecuencia directa de la genotoxicidad y ambas como un proceso de toxicidad general, es importante determinar la capacidad de un compuesto para inducir un daño genético, así como considerar aspectos básicos de la toxicología (absorción, metabolismo, citotoxicidad, etc) (Bajpayee *et al.*, 2005).

Numerosos trabajos confirman que en la mayoría de los procesos cancerígenos intervienen mutaciones somáticas y ello puede ser inducido por la presencia de tóxicos. En consecuencia, en TG la capacidad de dañar de un agente químico o físico interesa, tanto en relación con las mutaciones hereditarias como en lo referente a los procesos cancerígenos (De la Fuente y Frutos, 1995).

Para evaluar el daño en el DNA causado por las genotoxinas, se utilizan ensayos de genotoxicidad que están diseñados para detectar de manera directa o indirecta un daño en el material genético derivado de diferentes mecanismos, siendo un requisito la evaluación mutagénica para la caracterización del efecto genotóxico de un producto químico (Repetto-Jiménez, 2009).

La detección y cuantificación del efecto genotóxico de un compuesto puede realizarse en ensayos tanto *in vivo* como *in vitro*, donde lo ideal sería que se clasifique al compuesto en el mismo nivel utilizando distintas técnicas (Quillardet *et al.*, 1985), esto es debido a que en la actualidad no existe un único test de mutagénesis capaz de detectar por si solo todo tipo de mutaciones (Klaasen *et al.*, 2005).

6.1.- Metabolismo xenobiótico (MX) y citocromos p450 (Cyp450s)

El hígado es el órgano que contribuye de forma mayoritaria en facilitar la eliminación de los xenobióticos mediante una serie de enzimas que de no existir, estos se acumularían ocasionando desequilibrio celular, alteraciones en las funciones e incluso la muerte (Donato, 2009).

El metabolismo xenobiótico (MX) es un conjunto de reacciones (“biotransformación”) por las que pasa el xenobiótico modificando su estructura química lo que permite facilitar su excreción. (Castell, 2005).

El MX consta de tres fases (I, II y III) (Figura 2) en las cuales participan diversas enzimas. En la fase I tienen acción los citocromos p450s (CYP450s) (Croom, 2012), que son una superfamilia de proteínas de membrana con un grupo hemo (complejo Fe-porfirina) localizadas en el lado citoplásmico del retículo endoplásmico liso y en mitocondria (Vázquez *et al*, 2008; Donato, 2009), y también se les encuentra en bacterias y archaeas (Danielson, 2002).

Los compuestos lipofílicos son metabolizados por los CYP450s principalmente, cuya función es transformar a los xenobióticos en moléculas más polares y de esta manera proveer sitios para las reacciones de conjugación que se dan en la Fase II (Donato, 2009).

En la fase II se encuentran enzimas transferasas que a veces pueden interactuar directamente con los xenobióticos, aunque es más común que reaccionen con los metabolitos producto de la fase anterior, estos metabolitos tienen grupos funcionales como hidroxilo, amino, carboxilo, epóxido, halógeno y además pueden ser metilados o acetilados. La presencia de estos grupos funcionales permite la reacción de conjugación del metabolito con sustratos endógenos como azúcares, aminoácidos, glutatión o sulfatos. (Croom, 2012). En síntesis a estas reacciones de conjugación se les denomina reacciones de fase II (Calvo-Carrillo, 2013).

Por último, la fase III consiste en el transporte y la excreción de los productos generados en la fase II a través de la membrana celular para su eliminación. Entre los transportadores de esta fase están la glucoproteína P, proteínas asociadas a la resistencia a fármacos y el polipéptido transportador de aniones orgánicos (OATP), estos transportadores están presentes en varios tejidos como hígado, intestino, riñón y cerebro entre otros (Xu *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2010).

La importancia fisiológica de esta fase radica en que las reacciones de conjugación con glutatión pueden en ocasiones dar lugar a la activación tóxica de compuestos en vez de facilitar su excreción, es por eso que la eliminación del compuesto en el organismo (que puede ocurrir por diferentes vías: urinaria, fecal y/o pulmonar) desempeña un papel determinante en el potencial tóxico de los xenobióticos (Calvo-Carrillo, 2013).

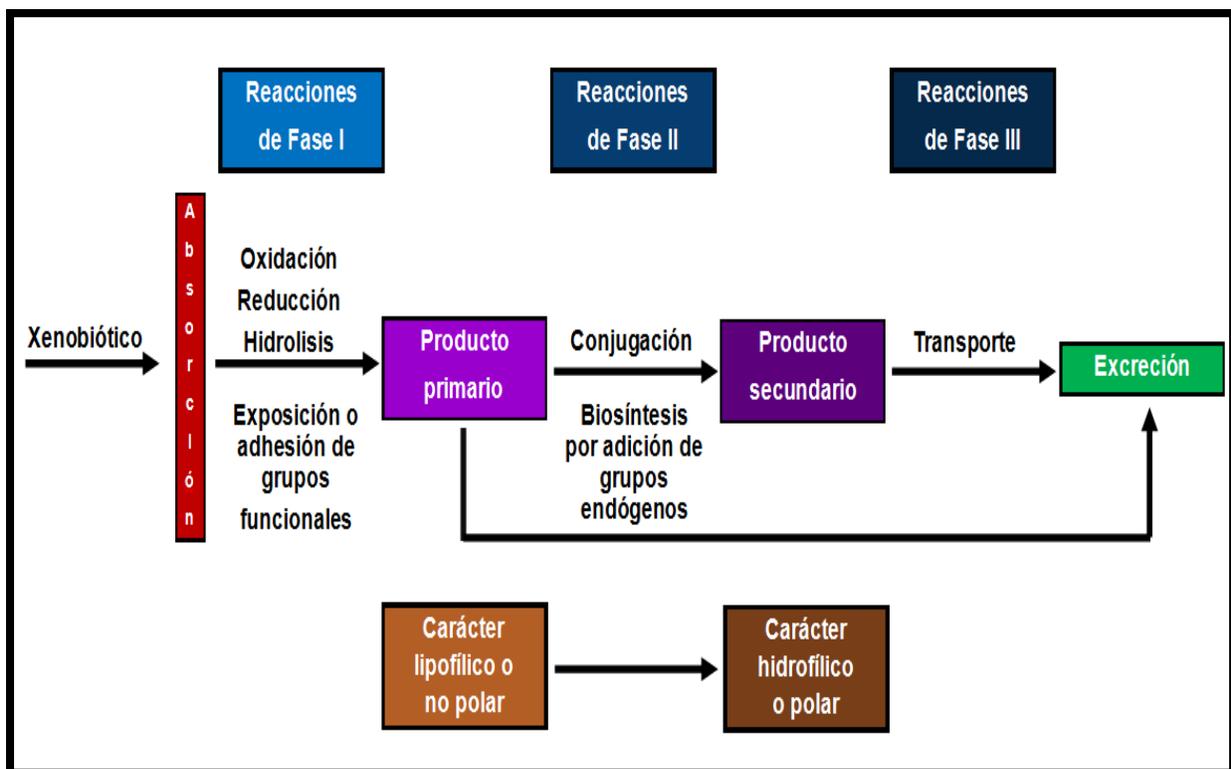


Figura 2: Proceso de biotransformación de xenobióticos lipofílicos (adaptada de Klaassen *et al.*, 2005).

6.2.- Nicotina (NIC)

La nicotina (NIC) (Figura 3) es un alcaloide con una estructura química sencilla que consta de un anillo de piridina y otro de metilpirrolidina, siendo el isómero L-Nicotina el más abundante en la naturaleza (Primo-Yúfera, 1995).

Se encuentra principalmente en la planta del tabaco *Nicotiana tabacum* y es el principal responsable de la adicción en fumadores (McGehee, 2006). Es un compuesto activo en cigarrillos y puros, teniendo concentraciones en promedio de [10 µg] por cigarrillo y de los cuales se inhalan aproximadamente 2 µg (Leshner, 2001; Johnson y Guthmiller, 2007).

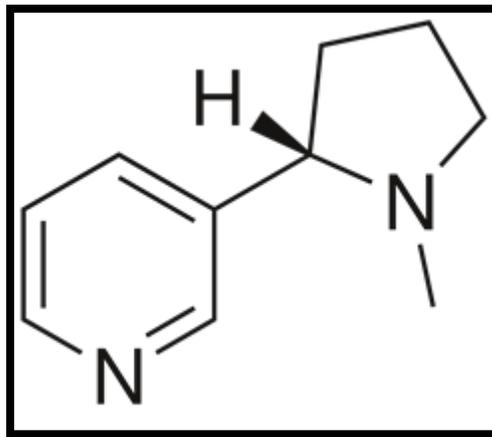


Figura 3. Estructura química de la NIC.

La NIC una vez dentro del cuerpo se absorbe fácilmente a través de las membranas de los tejidos debido a su carácter lipofílico (Antúnez-Treviño *et al.*, 2013). En el pulmón, después de la primera inhalación, se facilita su transferencia por los alveolos y accede a la circulación arterial llegando al cerebro en un tiempo de entre 10 y 20 segundos (Benowitz, 1990).

Una vez en el cerebro, induce una activación indirecta de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, esta activación está relacionada con la potente acción reforzante de la NIC (McGehee, 2006) debido a que interviene en el sistema límbico dopaminérgico del *locus coeruleus* que es el centro de placer del encéfalo (Erhardt *et al.*, 2000).

Como consecuencia, se produce la liberación de adrenalina suprarrenal, lo que se traduce en alteraciones de las funciones cardíacas, reproductivas, neuronales, respiratorias y endócrinas (Malhotra *et al.*, 2010).

El metabolismo de la NIC en humanos ocurre mayoritariamente en el hígado por medio de los CYP450s, en donde más del 90% es metabolizada por la isoforma CYP2A6 (Benowitz y Jacob, 1994), aunque se ha reportado que CYP2B6 también es capaz de hacerlo en pequeñas cantidades (Messina *et al.*, 1997) así como la flavin monooxigenasa (FMO₃) y la uridinadifosfato glucuroniltransferasa (UDPG) (Hukkanen *et al.*, 2005).

La NIC después de ser metabolizada forma dos compuestos principales sin capacidad adictiva: Cotinina (70-80 %) (Shigenaga *et al.*, 1988) y Nicotina 1'-N-óxido (5-8 %) (Cashman *et al.*, 1992; Park *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 2004). Además de muchos otros metabolitos como la *trans*-3'-hidroxicotinina, nicotina-N-β-glucoronil, N-metilnicotina ion, nornicotina, entre otros (Benowitz *et al.*, 2008) (Figura 4).

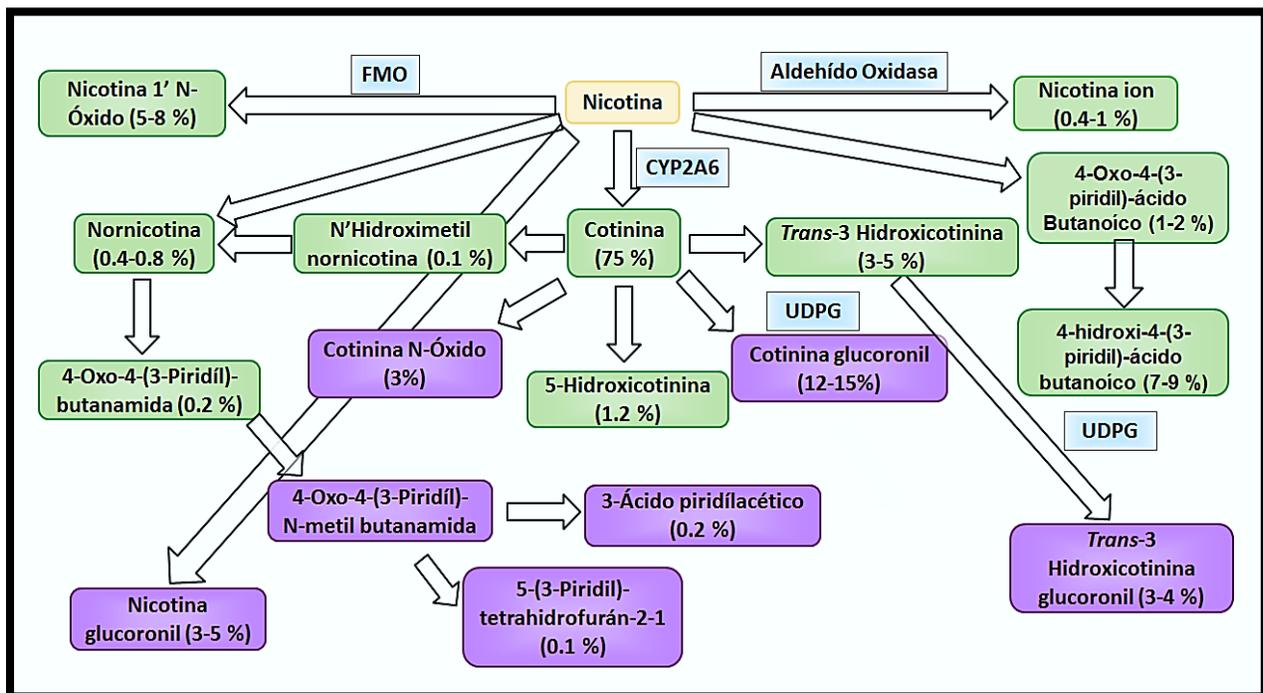


Figura 4. Metabolismo de la NIC en humanos (productos de fase I marcados en verde y productos de fase II en morado). Basado en porcentajes promedio de metabolitos excretados a través de la orina. Las enzimas que principalmente metabolizan la NIC (azul) son CYP2A6, flavin monooxigenasa (FMO₃) y uridinadifosfato glucuroniltransferasa (UDPG) (adaptado de Hukkanen *et al.*, 2005).

Finalmente, la NIC es excretada a través de los riñones por filtración glomerular y secreción tubular, con un porcentaje de reabsorción dependiente del pH de la orina, siendo en 7.0 reabsorbida a través de la red tubular (Benowitz y Jacob, 1985). Por otro lado, los niveles en sangre dependen de la cantidad de cigarrillos consumidos (Patterson *et al.*, 2003), los cuales disminuyen después de 20 minutos debido a la distribución a diversos tejidos (Benowitz *et al.*, 1988).

La NIC se usó como un potente insecticida natural desde el siglo XVII, pero gracias a su gran toxicidad hoy se encuentra en desuso. Se sabe que unos 50 mg podrían producirle la muerte a un hombre de no contar con la capacidad para metabolizarla (Primo-Yúfera, 1995). Debido a su estructura química la NIC genera radicales libres y ROS (Yamamoto y Casida, 1999; Jain y Flora, 2012; Marriage *et al.*, 2014) y esto ha sido reconocido como uno de sus mecanismos tóxicos más importantes (Ballinger *et al.*, 1996; Finkel y Holbrook, 2000; Argentin y Cicchetti, 2004; Izzotti *et al.*, 2009) debido a que algunas ROS tienen la capacidad de atravesar la membrana celular y generar daños al DNA (Crowley-Weber *et al.*, 2003; Barr *et al.*, 2007) ya sea por el rompimiento de cadenas y/o modificaciones a las bases (Ahmad *et al.*, 2003; De La Lastra *et al.*, 2007).

En las células las ROS se pueden generar durante el transporte electrónico mitocondrial, por la acción de enzimas óxido-reductasas, o por el daño indirecto que puede causar algún agente mutagénico entre otras cosas (Ahmad *et al.*, 2003; De La Lastra *et al.*, 2007). A pesar de regular ciertos procesos como la apoptosis y la expresión de genes, son nocivas para los organismos cuando se desequilibra el potencial redox, dañando constituyentes celulares e induciendo la muerte celular (Paul, 2010).

Por eso, el estrés oxidativo producido por la sobreproducción de las ROS también está asociado al envejecimiento, diabetes tipo II, Alzheimer, Parkinson, artritis reumatoide y cáncer (Dreher y Junod, 1996; Halliwell y Gutteridge, 1999; Rahman, 2007; Mayor-Oxilia, 2010). Debido a lo anterior, se ha propuesto el uso de diversos compuestos que ayuden a reducir el daño que pueda ser causado por las ROS.

6.3.- Resveratrol (RES)

La quimiopreención se define como la prevención, retraso o la inhibición de la carcinogénesis, mutagénesis o el envejecimiento por la administración de una o más entidades químicas, ya sean fármacos individuales o componentes naturales de la dieta (Namasivayam, 2011).

Estudios han demostrado que el consumo de vegetales puede disminuir el riesgo de desarrollar distintos tipos de cáncer (Safe *et al.*, 1999) y aunque la naturaleza de los constituyentes que son responsables de la disminución del riesgo no han sido completamente aclarados, se ha demostrado que los alimentos vegetales contienen agentes quimiopreventivos como: vitaminas, minerales, compuestos orgánicos de azufre, polifenoles, isoflavonoides entre otros (Namasivayam, 2011).

El resveratrol (RES) (*Trans-3-5-4'*-trihidroxiestilbeno) es un polifenol natural no flavonoide, perteneciente a la familia de los estilbenos que está formado por dos anillos aromáticos unidos por un metileno (Catalgol *et al.*, 2012). Se produce en 72 especies de plantas en respuesta a un factor exógeno como la radiación UV, bacterias patógenas y hongos como *Botrytis cinerea* (Favaron *et al.*, 2009).

Se encuentra presente en varios frutos que forman parte de la dieta humana, principalmente en frutos rojos como los arándanos (*Vaccinium sp*), uvas (*Vitis vinifera*), zarzamoras (*Rubus fruticosus* y *Morus rubra*) grosella (*Rubus rubra*), moras (*Ribes rubrum*), también está presente en algunas semillas como los cacahuates (*Arachis hypogea*) y las nueces (*Juglans regia*). Además, podemos encontrarlo en plantas herbáceas no comestibles como: *Veratrum album* y *Veratrum californicum*, así como en coníferas: *Picea glauca* y *Pinus silvestris*, y otras especies arbóreas como *Eucaliptus sp.* (Soleas *et al.*, 1997; Burns *et al.*, 2002) (Figura 5).



Figura 5. Principales fuentes de RES (adaptado de Aggarwal *et al.*, 2004).

La forma más abundante del RES en la naturaleza es el *trans*-resveratrol (Robert *et al.* 2006), que puede ser convertido al isómero *cis*-resveratrol si se expone a la luz solar o artificial debido a que éste es un compuesto extremadamente fotosensible (Amri *et al.*, 2012; Gambini *et al.*, 2013) (Figura 6).

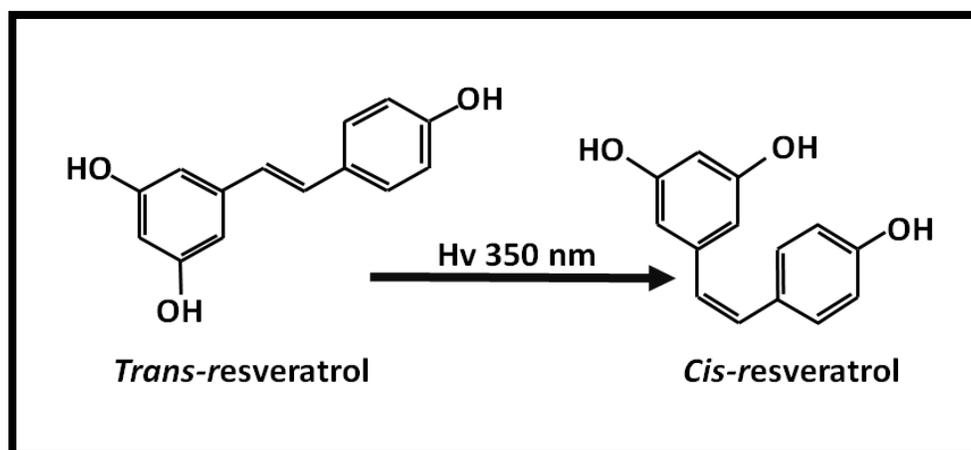


Figura 6. Estructuras químicas de los isómeros *trans* y *cis* del res (Catalgol *et al.*, 2012).

Aunque el *trans*-resveratrol posee mayor actividad biológica (Robert *et al.* 2006), ambos isómeros pueden tener efectos biológicos distintos (Gambini *et al.*, 2013) y pueden actuar sobre un gran número de moléculas blanco (Suenaga *et al.*, 2008; Shakibaei *et al.*, 2009). Se ha descrito que el *trans*-resveratrol inhibe la acción de las ROS en leucocitos (Rotondo *et al.*, 1998) y en fibroblastos (Andrianbelomson *et al.*, 1998), y también puede inhibir la liberación de O₂ en neutrófilos humanos (Repetto-Jiménez, 2009). Mientras que el *cis*-resveratrol puede actuar como un antagonista estrogénico en humanos (Repetto-Jiménez, 2009).

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 glucósido del *trans*-RES (Mattivi *et al.*, 1995) el cual se elimina rápidamente. Por lo tanto las formas conjugadas del RES son las que llegan a los tejidos donde ejercen su efecto biológico (Piver *et al.* 2004^b).

Diversos estudios muestran que el RES además de ser un antioxidante, presenta efectos antitrombogénicos, antitumorales, antiosteoporóticos, antimicrobianos y antienvjecimiento (Agaarwal *et al.*, 2004; Baur y Sinclair, 2006; Kasdallah-Grissa *et al.*, 2007; Csizar *et al.*, 2008), y sugieren que tiene un papel neuroprotector debido en parte a su actividad antiinflamatoria, y por su capacidad de disminuir los niveles de factor de necrosis tumoral (TNF) (Foti-Cuzzola *et al.*, 2011).

Estudios en modelos *in vivo* han demostrado que el RES tiene efectos protectores en diferentes procesos biológicos produciendo un aumento de la vida media en levaduras, moscas y algunos peces (Agaarwal *et al.*, 2011) que podría estar mediado por el aumento de las sirtuinas que están directamente relacionadas con la restricción calórica y la longevidad (Imai *et al.*, 2000) esto también apoya la idea de que este producto sea un agente quimioprotector (Gescher *et al.*, 2003; Baur y Sinclair, 2006).

El RES como agente quimiopreventivo también ha mostrado poder inhibir algunas isoformas de CYP450s en humano relacionadas con la activación de moléculas pro-cancerígenas como el CYP3A4 y CYP1A1 (Guengerich *et al.*, 2003; Piver *et al.*, 2004^a; Mohammadi-Bardbori *et al.*, 2012).

Por otro lado, el RES es metabolizado por las isoformas CYP1B1 y CYP1A2, obteniendo como producto final de su oxidación picetanol, un metabolito que tiene ciertas propiedades anticancerígenas debido a que participa en el arresto del ciclo y en la muerte celular (Piver *et al.*, 2004^b; Kim *et al.*, 2009).

Por lo anterior, el efecto quimiopreventivo que presenta el RES puede deberse a:

- a) La disminución o anulación del daño provocado por las ROS (Sharma *et al.*, 1994; Martínez *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2011).
- b) La detención del ciclo celular y activación de la apoptosis, evitando la proliferación de una amplia variedad de células cancerígenas como los linfoides, mieloides, mama, colon, páncreas, próstata, estómago, ovario, hígado y pulmón (Aggarwal *et al.*, 2004; Piver *et al.*, 2004^b; Kim *et al.*, 2009).
- c) La inhibición de algunas enzimas de fase I del MX (CYP450s), que son responsables en la activación de compuestos pro-cancerígenos (Guengerich *et al.*, 2003; Piver *et al.*, 2004^a).

7.- Antecedentes

7.1.- Efecto genotóxico de la NIC

Existen estudios que avalan el efecto genotóxico de la NIC dentro de un modelo *in vitro* a concentraciones bajas como el de Argentin y Cicchetti (2004), donde reportaron que NIC [1-10 μM] provocó daño al DNA por medio de la inducción de estrés oxidante, además de causar la formación de micronúcleos (MNs) en fibroblastos gingivales de humano. Mientras que NIC [1, 10, 100 y 1000 μM] produjo aberraciones cromosómicas, MNs e intercambio de cromátides hermanas (ICH) de manera dosis-dependiente en linfocitos de humano (Ginzkey *et al.*, 2013).

Por otro lado, el efecto genotóxico en estudios *in vivo* sólo se ha reportado con una concentración muy alta, usando NIC [11.4 mM] en SMART en ala de *D. melanogaster* en la cruza ST (Gómez-Loza, 2017).

7.2.- Efecto citotóxico de la NIC

En cuanto al efecto citotóxico de la NIC, existen muy pocas referencias que lo avalen a concentraciones bajas. En estudios *in vitro* (Moga *et al.*, 2016) reportaron que NIC [3.112-31.125 μM] indujo muerte celular, mientras que NIC [0.662-3.112 μM] provocó autofagia. Ambos resultados fueron obtenidos en un cultivo de células troncales de mesénquima periodontal de humano.

En estudios *in vivo*, se reportó que [11.4 mM] provocó una alteración en la división celular en la cruza ST, usando SMART en ala de *D. melanogaster* (Gómez-Loza, 2017).

7.3.- Efecto quimiopreventivo del RES

Existe una amplia variedad de estudios referentes a los efectos quimiopreventivos del RES como antioxidante, en modelos *in vitro* está reportado que RES [27 μM] fue efectivo contra la formación de radicales libres en células HL-60 de leucemia (Sharma *et al.*, 1994), RES [44 μM] inhibió la acción de las ROS en leucocitos (Rotondo *et al.*, 1998), RES [30 μM] fue capaz de inhibir la formación de radicales libres del oxígeno derivados del óxido nítrico (NO) en macrófagos (Martínez *et al.*, 2000), RES [1 mM] disminuyó la frecuencia de MNs inducidos por H_2O_2 en células astrogiales de humano (Quincozes *et al.*, 2010) y RES [5, 25 y 50 μM] protegieron al DNA del daño oxidante provocado por el etanol (EtOH) en linfocitos humanos (Yan *et al.*, 2011).

En estudios *in vivo* se encontró que RES [43 μM] redujo la frecuencia de clones pequeños y totales en co-tratamiento con uretano (URE) en la craza ST por medio de SMART en ala de *D. melanogaster* (Silva-Calzada, 2013).

7.4.- Efecto genotóxico del RES

En el efecto genotóxico del RES a concentraciones bajas, existe discrepancia en cuanto a los resultados en modelos *in vitro*. Está reportado que RES [2.5, 5, 10 y 20 μM] resultaron ser negativas en todas las cepas utilizando la prueba de Ames en *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* (Matsuoka *et al.*, 2001) y RES [1, 5 y 10] no resultaron genotóxicos en células A549 de adenocarcinoma (Chen *et al.*, 2013).

Por otro lado, RES [5 y 10 μM] provocó MNs e ICH en células pulmonares de hámster chino (Matsuoka *et al.*, 2001) y RES [5, 10 y 43 μM] causó MNs en células de adenocarcinoma gástrico (Mitrut *et al.*, 2009).

En estudios *in vivo*, usando SMART en ala de *D. melanogaster*, RES [11 μM] fue genotóxico para clones grandes y gemelos en la craza ST (Gómez, 2013) y RES [11 μM] fue genotóxico para manchas pequeñas y totales en la craza ST (Silva-Calzada, 2013). Mientras que RES [10 $\mu\text{g/mL}$] resultó genotóxico en clones grandes y totales en co-tratamiento con metil metano sulfonato en la craza HB (Sánchez-López, 2013).

7.5.- Efecto citotóxico del RES

En estudios *in vitro* está reportado que RES [10 y 20 μM] provocó citotoxicidad en células de hámster chino (Matsuoka *et al.*, 2001), RES [50 μM] disminuyó el crecimiento celular por citotoxicidad (Scott, 2002) y RES [63 μM] aumentó la citotoxicidad de la doxorubicina (Osman *et al.*, 2012).

En estudios *in vivo*, usando SMART en ala de *D. melanogaster* se reportó que RES [10 $\mu\text{g/mL}$] alteró la división celular en la craza HB (Sánchez-López, 2013), RES [11 μM] alteró la división celular en la craza ST (Gómez, 2013; Silva-Calzada, 2013; Dueñas-García *et al.*, 2017) y RES [11 μM] alteró la división celular en la craza HB (Dueñas-García *et al.*, 2017).

7.6.- Efecto del RES sobre el ciclo celular y la apoptosis

Existen una gran cantidad de estudios *in vitro* que indican que concentraciones de bajas de RES inducen apoptosis por medio de la activación de las caspasas 3 y 9, usando RES [32 μM] en células de leucemia (Clement *et al.*, 1998), RES [100 μM] en células tumorales de colon humano (Mahyar-Roemer, 2001) y RES [20 μM] en células de la línea ECV304 de carcinoma humano (Toloi *et al.*, 2012). Mientras que existen estudios que indican la inducción de la apoptosis de manera dependiente a P53 utilizando RES [10 μM] en células epidérmicas de ratón (She *et al.*, 2001) y RES [20 μM] en células de próstata humana (Hung-Yun *et al.*, 2011).

7.7.- Efecto pro-oxidante del RES

Existen solamente estudios *in vitro* en donde está reportado que RES [10-100 μM] promovió la degradación del DNA en presencia de metales de transición como el cobre (Fukuhara y Miyata, 1998) y RES [50 μM] en tratamiento crónico de 24 h. tuvo efectos pro-oxidantes en células estrelladas hepáticas (Martins *et al.*, 2013).

8.- Justificación

La NIC es un agente potencialmente genotóxico por su capacidad de generar ROS que pueden causar estrés oxidativo e interactuar con el DNA, además es la principal responsable de la dependencia en las personas al tabaco siendo también un problema de salud pública. El estrés oxidativo y el daño al DNA han sido correlacionados con muchas otras enfermedades de alta prioridad (cáncer, Parkinson, Alzheimer, artritis reumatoide, diabetes tipo II, etc). Por eso, se han realizado diversas investigaciones que incluyen el consumo de diferentes compuestos con potencial antioxidante tanto de origen natural como sintético. El uso del RES como un quimiopreventivo y antioxidante ha adquirido relevancia en la investigación en los últimos años, teniendo resultados muy contradictorios debido a que los efectos benéficos que se obtienen en modelos *in vitro* son a concentraciones muy altas, ahora se sabe que el factor de biodisponibilidad nunca permite alcanzar esas concentraciones por lo que los efectos en un organismo tiene muchas incógnitas aún. Además se ha reportado que el RES puede tener efectos pro-oxidantes y citotóxicos dependiendo del compuesto con el que sea conjugado. Por eso, también es importante determinar si existe o no un efecto pro-oxidante del RES en un modelo *in vivo* en presencia de la NIC. Por lo anterior, en este trabajo se pretende evaluar el efecto del RES sobre la genotoxicidad de la NIC usando SMART en ala de *D. melanogaster* en cruza estándar (ST) y de bioactivación elevada (HB).

9.- Hipótesis

Teniendo en cuenta que el RES es potencialmente antioxidante, se espera que sea capaz de modular el daño inducido por la NIC, ya sea en la cruza ST o HB, debido a lo siguiente:

1. La NIC debido a su estructura química es capaz de producir radicales libres y ROS (Yamamoto y Casida, 1999; Jain y Flora, 2012; Marriage *et al.*, 2014).
2. El RES ha mostrado poder disminuir o anular el daño provocado por las ROS (Sharma *et al.*, 1994; Rotondo *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2000; Quincozes *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2011).

10.- Objetivos

10.1.- Objetivo general

- Evaluar el efecto del RES ante la potencial actividad genotóxica de la NIC en la prueba SMART en ala de *D. melanogaster* en las cruzas ST y HB.

10.2.- Objetivos particulares

- Determinar la frecuencia de los tipos de clones producidos en las alas de *D. melanogaster*, con los diferentes tratamientos de NIC, RES y los co-tratamientos NIC + RES.
- Determinar la capacidad genotóxica de la NIC, RES y los co-tratamientos NIC + RES a través de la frecuencia y tipo de clones producidos en ambas cruzas.
- Determinar las frecuencias acumuladas de los clones *mwh* en las células de los discos imaginales del ala de *D. melanogaster* con los diferentes tratamientos de NIC, RES y los co-tratamientos NIC + RES.

11.- Materiales y métodos

11.1.- Químicos

- ✓ Agua bidestilada (Milli-Q)
- ✓ Etanol (EtOH). CAS No. 64-17-5. Sigma® St. Louis, MO, USA.
- ✓ Uretano (URE) (Carbamato de etilo) (>99%). CAS No. 51-79-6. Sigma® St. Louis, MO, USA.
- ✓ Nicotina (NIC). CAS No. 3876. Sigma® St. Louis, MO, USA.
- ✓ Resveratrol (RES). CAS No. R5010. Sigma® St. Louis, MO, USA.
- ✓ Medio instantáneo Carolina (MIC). Carolina Biological Supply Company. Burlington, N.C. USA.
- ✓ Nipagin metilparabeno (Tegosept). CAS 99-76-3.
- ✓ Ácido propiónico. CAS 79-09-4. Sigma® St. Louis, MO, USA.
- ✓ Tegosept (NIPAGIN). CAS 99-76-3 Sigma® St. Louis, MO, USA.
- ✓ Ácido ortofosfórico. CAS 7664-38-2. Merck® Darmstadt, Alemania.
- ✓ Entellán. CAS 1.07961. Merck® Darmstadt, Alemania.

11.2.- Biológicos

Cepas mutantes de *D. melanogaster*: “flare” ($flr^3/TM3$, Bd^{Ser}), “Oregon R(R)-flare” (ORR(1); ORR(2); $flr^3/TM3$, Bd^{Ser}) y “multiple wing hairs” (mwh/mwh) del laboratorio de Genética Toxicológica de la FES–Iztacala, UNAM. Donadas originalmente por el Dr. Ulrich Graf del Swiss Federal Institute of Technology de la Universidad de Zurich, Schwerzenbach, Suiza (Anexo 3).

11.3.- Propagación de las cepas de *D. melanogaster*

Las tres cepas se propagaron en frascos de vidrio de 250 mL (Figura 7) que contenían medio de cultivo de hojuela de papa deshidratada marca Maggie®, a los que se le agregaron 20 mL de la solución conservadora que contiene: 5 mL de tegosept al 12% disuelto en EtOH (como bactericida) y 5 mL de ácido propiónico (como fungicida), aforados a 1 L de agua a una proporción (1:10). Las cepas se incubaron a 25°C y 65% de humedad relativa (HR) en total oscuridad (Dueñas *et al.*, 2001).



Figura 7. Propagación de las cruzas HB y ST.

11.4.- Cruza de bioactivación elevada (HB)

Las hembras vírgenes de la cepa “Oregon R(R)-flare” (ORR(1); ORR(2); *flr³/TM3, Bd^{Ser}*) y machos “multiple wing hairs” (mwh/mwh) se aislaron y se cruzaron en proporción 3:1. Posteriormente se colocaron en frascos con medio de puré de papa Maggie® con la solución conservadora durante tres días a 25°C y 65% de HR en total oscuridad (Anexo 3).

11.5.- Cruza estándar (ST)

Las hembras vírgenes de la cepa “flare” (*flr³/TM3 Bd^{Ser}*) y machos multiple wing hairs (mwh/mwh) se aislaron y se cruzaron en proporción 3:1. Después se colocaron en frascos con medio de puré de papa Maggie® con la solución conservadora durante tres días a 25 °C y 65% de HR en total oscuridad (Anexo 3).

11.6.- Colecta de huevos

Se colocó en frascos de 250 mL el medio de levadura fresca activada marca La Florida®, dejándolo reposar durante 24 h. Pasado ese tiempo se colocaron en los frascos y de manera independiente las moscas adultas procedentes de ambas cruza y se incubaron por 8 h.

Posterior a ese periodo de tiempo, se retiraron las moscas adultas y los frascos con los huevos se regresaron a la incubadora. Después de 72 ± 4 h se recuperaron las larvas de tercer estadio diluyendo rápidamente la levadura con agua corriente y haciéndola pasar a través de una coladera de acero inoxidable de malla fina.

11.7.- Diseño experimental

Los tratamientos evaluados se muestran en la tabla 1. Se realizaron tres experimentos independientes con tres réplicas por tratamiento por cada cruce, agregando aproximadamente la misma cantidad de larvas de 72 ± 4 h en tubos de ensayo que previamente contenían 0.5 g de medio instantáneo Carolina (*Drosophila* Instant Medium) y 2 mL de las diferentes soluciones, posteriormente se colocaron los tubos en la incubadora a 25°C y 65% de HR hasta que emergieron los imagos.

Tabla 1. Tratamientos crónicos aplicados a las larvas de tercer estadio en las cruces HB y ST.

Tratamientos				
Controles Negativos	Control Positivo	Tratamientos NIC	Tratamiento RES	Co-tratamientos
Agua Mili-Q	URE [20 mM]	NIC [12.5 µM]	RES [11 µM]	NIC [12.5 µM] + RES [11 µM]
EtOH 1%		NIC [25 µM]		NIC [25 µM] + RES [11 µM]
		NIC [50 µM]		NIC [50 µM] + RES [11 µM]

Las concentraciones de NIC utilizadas en los tratamientos, fueron determinadas con base en una CL_{50} en un ensayo previo en la cepa Canton S (datos no publicados). Mientras que la concentración de RES utilizada se determinó de acuerdo a Asensi *et al*, (2002) donde reportan que la biodisponibilidad del RES en tejidos es muy baja y difícilmente se superan [>11 µM] por lo que concentraciones mayores no deben ser extrapoladas a modelos *in vivo*.

11.8.- Disección y montaje de alas

Los imagos se fijaron y almacenaron en frascos con EtOH al 70%, se sexaron y se disectaron las alas con la ayuda de unas pinzas de relojero. Las alas se montaron en preparaciones permanentes con Entellan®. Se colocaron 10 pares de alas en los portaobjetos con una proporción 1:1 de hembras y machos en cada laminilla. Únicamente se tomaron en cuenta las alas de las moscas con fenotipo silvestre (*trans*-heterocigotas) porque éstas permiten observar eventos de mutación y recombinación.

11.9.- Revisión al microscopio

Las alas de 60 individuos se revisaron por cada tratamiento en un microscopio óptico a 40X, debido a que el tamaño óptimo para la prueba son 55 individuos por tratamiento (Frei y Würgler, 1995). Se analizó tanto la superficie dorsal como ventral de las alas y se registró el número y el tipo de clones mutantes de las células de acuerdo a lo establecido por (Graf *et al.*, 1984) donde se buscó la presencia de clones simples (fenotipos *mwh* o *flr³*) ya sean pequeños (1-2 células), grandes (>3 células) y/o clones gemelos o dobles (clones *mwh* adyacentes a clones *flr³*).

11.10.- Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó el software SMART-PC versión 2.1 que evalúa con una regla de decisión múltiple basada en la prueba de ji cuadrada (Kastenbaum-Bowman) con un grado de libertad y una probabilidad de ($p < 0.05$) (Frei y Würgler, 1988). Esta prueba asume que un tratamiento dado, aumenta la frecuencia de daño genético por un múltiplo de la frecuencia del testigo negativo, permitiendo decidir si la frecuencia de clones inducidos en los tratamientos muestra resultados positivos, débiles positivos, indecisos o negativos basándose en las siguientes hipótesis:

- ❖ Hipótesis nula (Ho): La frecuencia de las mutaciones inducidas y espontáneas en los individuos, no es significativamente mayor a la frecuencia del control negativo.

- ❖ Hipótesis alternativa (Ha): La frecuencia de las mutaciones inducidas y espontáneas en los individuos, es “m” veces mayor a la frecuencia del testigo negativo (Graf *et al.*, 1984). Donde “m” es un factor de multiplicación que se utiliza en el análisis estadístico e indica las veces que debe de incrementarse el número de eventos de los tratamientos con respecto al control negativo para considerarlo como una respuesta positiva.

Los clones pequeños van a predominar en relación a la frecuencia de los grandes y gemelos, por lo que el programa los analiza por separado evitando así una sobreestimación de clones menos frecuentes. De esta forma para considerar un aumento significativo de los clones pequeños se determinó un valor del factor de multiplicación $m= 2$, mientras que para clones grandes y gemelos se usa un valor de $m= 5$ (Frei y Würzler, 1988).

Cada hipótesis fue probada al 5% de significancia y con base a lo anterior pueden ser posibles las siguientes decisiones:

- Aceptar H_0 y rechazar H_a : negativo.
- Rechazar H_0 y aceptar H_a : positivo.
- Rechazar H_0 y rechazar H_a : indeciso.
- Aceptar H_0 y aceptar H_a : débil positivo.

Los resultados débiles positivos (w) e indecisos (i) obtenidos con SMART, fueron analizados con la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney y Wilcoxon ($\alpha = \beta = 0.05$) con ayuda del software estadístico STAT-Graphics versión 7.0. Esta prueba considera la variabilidad entre los individuos y no requiere de una distribución normal de los datos (Frei y Würzler, 1995).

Por último, para el análisis de las distribuciones del tamaño de los clones *mwh*, se aplicó la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov (K-S) con una probabilidad de ($p < 0.05$). Esta prueba permite medir el grado de concordancia entre dos distribuciones comparando las frecuencias acumuladas de una distribución con la otra.

12.- Resultados

A continuación se muestran los resultados de SMART en ala de *D. melanogaster*, después de haber revisado un total de 567 individuos (1134 alas) de la craza HB y 503 individuos (1006 alas) de la craza ST tratados crónicamente con NIC [12.5, 25 y 50 μ M], RES [11 μ M] y los co-tratamientos NIC + RES.

Los resultados completos de SMART para la craza HB se encuentran en la tabla 2 (Anexo 1) y para la craza ST están en la tabla 4 (Anexo 1). En las figuras 8, 9, 12, 13, 16 y 17 se muestran las gráficas de los resultados del estadístico de χ^2 (Kastenbaum-Bowman) (Frei y Würgler, 1988) de los tratamientos NIC, RES y co-tratamientos NIC + RES en ambas cruzas, después de haber comparado las frecuencias y el tipo de mancha por individuo contra cada tratamiento y co-tratamiento con los controles negativos.

Por otro lado, los resultados completos de la distribución de clones *mwh* en la craza HB se encuentran en la tabla 3 (Anexo 1) y los de la craza ST en la tabla 5 (Anexo 1). En las figuras (10, 11, 14, 15, 18 y 19) se presentan las gráficas de la distribución de los clones con los resultados de la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov (Frei y Würgler, 1988) de los tratamientos NIC, RES y co-tratamientos en ambas cruzas respectivamente, después de haber comparado la distribución acumulada de los clones, entre los tratamientos y co-tratamientos con los controles negativos.

12.1. Tratamientos NIC

En la figura 8 que corresponde a los resultados del estadístico de Kastenbaum-Bowman de los tratamientos NIC en la cruce HB, se aprecia que ningún tratamiento de NIC resultó ser genotóxico. Esto se puede observar al comparar las frecuencias de clones obtenidos en los tres tratamientos de NIC contra el control negativo agua Milli-Q. (Ver tabla 2.C). En los tratamientos de NIC [12.5 y 25 μM] se observa que la frecuencia de clones *mwh* por individuo es prácticamente igual que la del control negativo para todos los tipos de clones, mientras que el tratamiento de NIC [50 μM] tuvo un ligero aumento (+0.1) en clones grandes, gemelos y totales en comparación con los otros dos tratamientos de NIC, sin embargo tampoco resultó genotóxico.

En la figura 9 se muestran los resultados de la cruce ST, se aprecia que el tratamiento NIC [12.5 μM] fue el único que al ser comparado con el control negativo tuvo una diferencia estadísticamente significativa en clones pequeños, grandes y totales. Es decir, resultó genotóxico (Ver tabla 4.C). En cuanto a clones pequeños, se observa que la NIC [12.5 μM] tuvo una frecuencia de clones por individuo de (1.16) la cual casi duplicó la frecuencia del control negativo (0.73) y fue muy similar a la del control positivo (1.21), mientras que en clones grandes se observa una diferencia estadísticamente significativa en comparación con ambos controles y por otro lado, no hubo presencia de clones gemelos. Por último, en los tratamientos NIC [25 y 50 μM] no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en comparación al control negativo para ningún tipo de clon, presentándose frecuencias de clones *mwh* por individuos muy similares al agua Milli-Q.

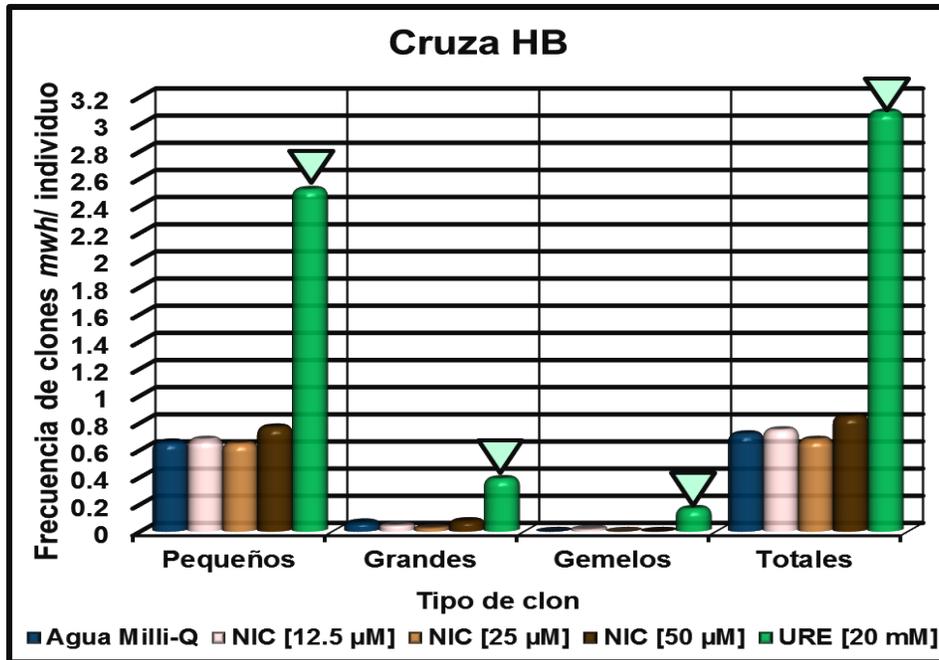


Figura 8. Frecuencia de clones pequeños, grandes, gemelos y totales por individuo en los tratamientos NIC en la cruce HB ($p < 0.05$). ∇ = diferencia significativa del control positivo URE con respecto al control negativo.

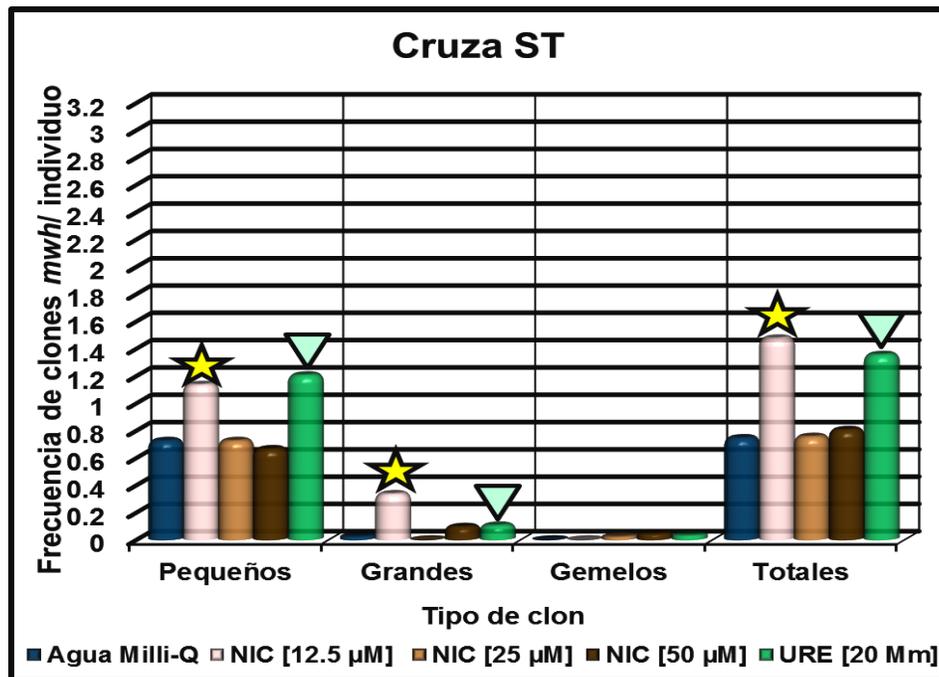


Figura 9. Frecuencia de clones pequeños, grandes, gemelos y totales por individuo en los tratamientos NIC en la cruce ST ($p < 0.05$). \star = Diferencia significativa de los tratamientos NIC con respecto al control negativo. ∇ = diferencia significativa del control positivo URE con respecto al control negativo.

12.1.2.- Distribución de clones en los tratamientos NIC

En la figura 10 se presentan los resultados de la distribución del tamaño de los clones *mwh* en los diferentes tratamientos con NIC en la cruce HB, señalando con (★) los resultados significativos del estadístico de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0.05$). En el gráfico se aprecian diferencias significativas en las distribuciones de clones *mwh* de los tratamientos de NIC [25 y 50 μM] en comparación con ambos controles (Ver tabla 3). En el tratamiento de NIC [25 μM] se observa una gran cantidad de clones que se expresaron sólo en la célula parental con 85% seguido de los que se expresaron en dos células (primera generación celular) (12%) y finalmente en menor cantidad llegaron a observarse clones de entre 17-32 células (quinta generación) (2%). En NIC [50 μM] se observa que la mayor cantidad de clones sólo se expresaron en la célula parental (75%) seguido de los que afectaron hasta la primera generación con un 16%, también se expresaron clones hasta la quinta generación e incluso se encontró un clon (>256 células) que indica que el daño se expresó hasta la novena generación. Por último, en el tratamiento NIC [12.5 μM] no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo, pero si las hubo en comparación al control positivo. Este tratamiento presentó al igual que los otros una mayor cantidad de clones en la célula parental (87%).

En la figura 11 se muestran los resultados de la distribución del tamaño de los clones *mwh* en los diferentes tratamientos con NIC en la cruce HB, señalando con (★) los resultados significativos del estadístico de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0.05$). Donde se observa que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres tratamientos de NIC y ambos controles (Ver tabla 5). En el tratamiento de NIC [12.5 μM] la mayor cantidad de clones se expresaron sólo en la célula parental (63%), también hubo clones que se expresaron hasta la primera (10%), segunda (7%), tercera (1%), cuarta (4%), quinta (7%), sexta (5%) y séptima generación celular (1%). Por otro lado en el tratamiento NIC [25 μM] solamente se encontraron clones que se expresaron en la parental (93%) y el resto (7%) hasta la primera generación celular. Y por último en el tratamiento de NIC [50 μM] el 82% del total de clones encontrados afectaron sólo una célula, posteriormente hubo una disminución de clones expresados en la primera generación (6%) y el resto se llegó a expresar hasta la segunda generación celular (12%).

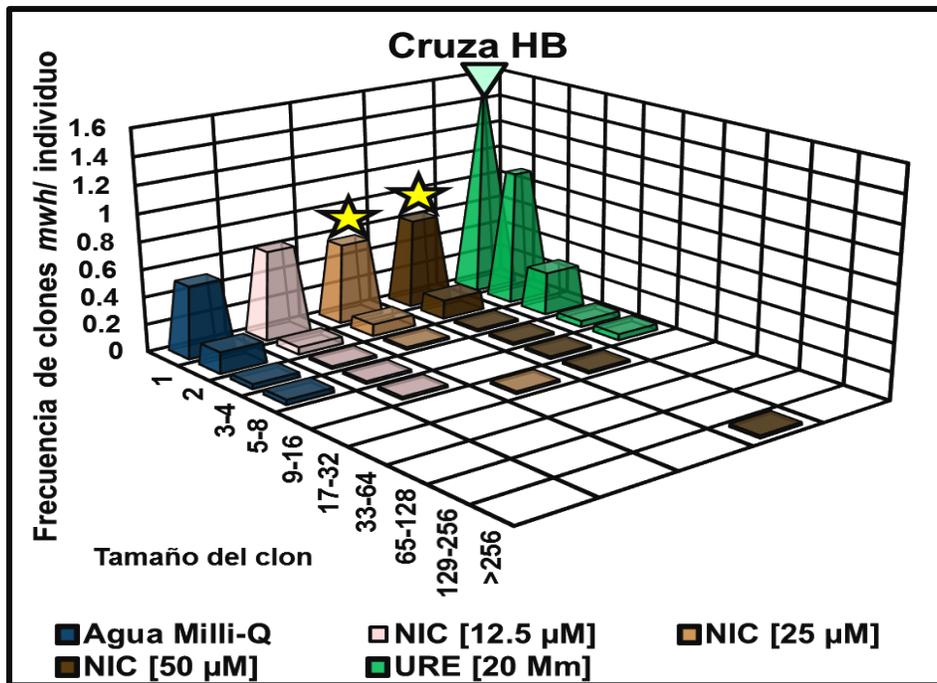


Figura 10. Distribución de los clones *mwh* en los tratamientos de NIC en la cruza HB ($p < 0.05$)
 ★ = Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo y positivo.
 ▽ = Diferencia estadísticamente significativa del control URE con respecto al control negativo.

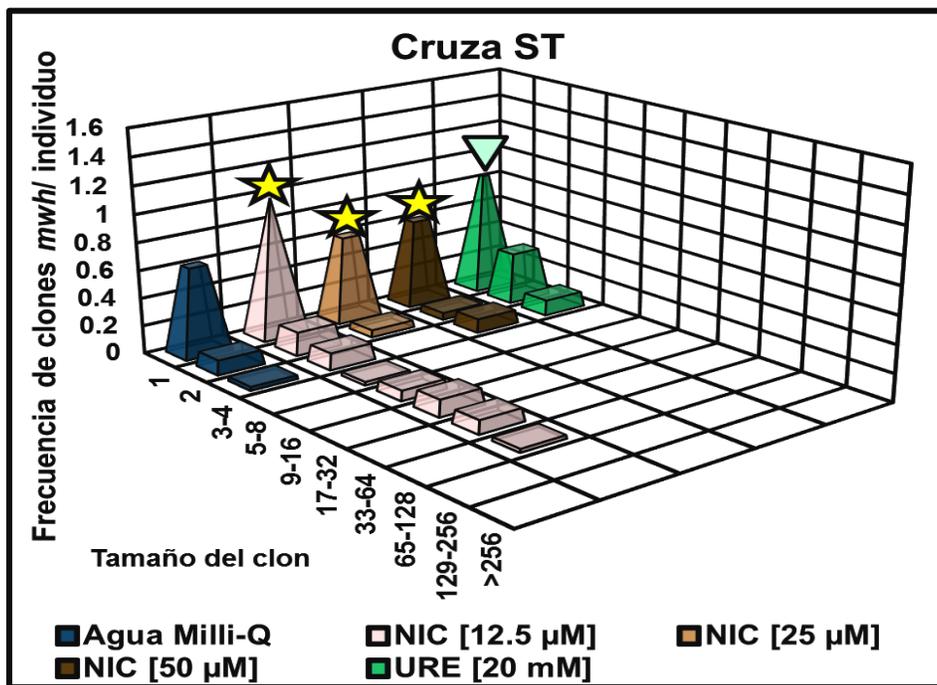


Figura 11. Distribución de los clones *mwh* en los tratamientos de NIC en la cruza ST ($p < 0.05$).
 ★ = Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo y positivo.
 ▽ = Diferencia estadísticamente significativa del control URE con respecto al control negativo.

12.2. Tratamientos RES

En la figura 12 se muestran los resultados del estadístico de Kastenbaum-Bowman del tratamiento RES para la cruce HB. Se puede apreciar que no se encontraron diferencias significativas para ningún tipo de clon entre el control negativo EtOH 1% y el tratamiento RES [11 μ M] por lo que no se encontró genotoxicidad por parte del tratamiento RES. La frecuencia de clones pequeños en el RES fue de (0.73) ligeramente mayor a la del control EtOH (0.60), sin embargo, esta no fue una diferencia significativa. En cuanto a clones grandes, las frecuencias del control EtOH y el tratamiento RES son prácticamente iguales (0.08) y en clones gemelos el RES presentó una frecuencia de clones de (0.02) contra (0) del control EtOH (Ver tabla 2.D).

En la figura 13 se muestran los resultados del tratamiento RES para la cruce ST. La frecuencia de clones pequeños en el tratamiento RES fue de (0.58) menor a la del control negativo EtOH (0.66), sin embargo no resultó ser una diferencia significativa. En cuanto a clones grandes el RES presentó una frecuencia de (0.05) que fue estadísticamente menor a la del control negativo EtOH (0.33). Y por último, en clones gemelos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento RES y el control negativo (Ver tabla 4.D).

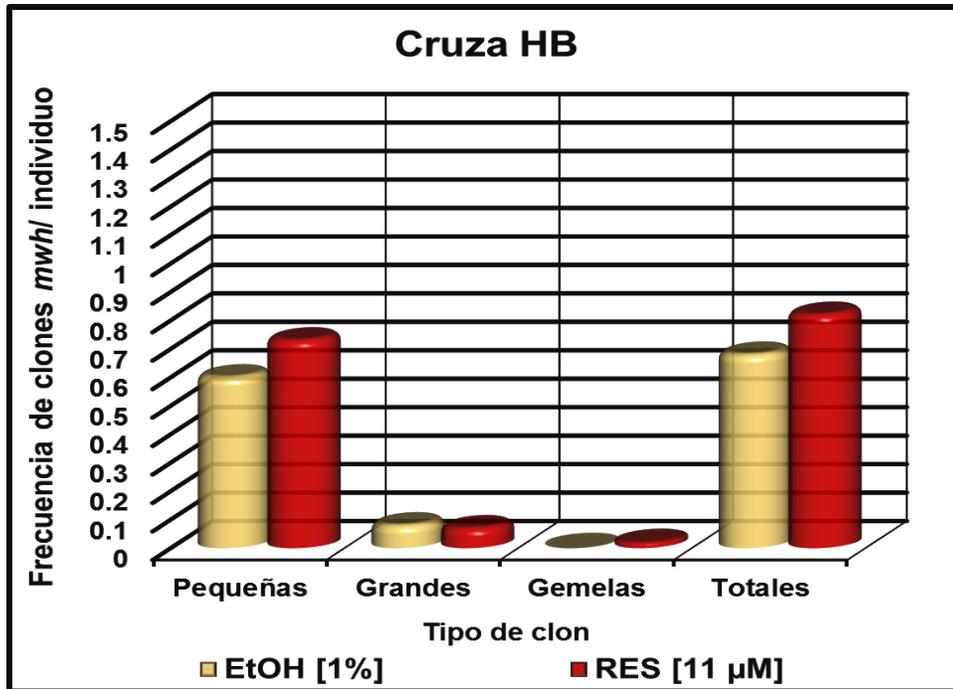


Figura 12. Frecuencia de clones pequeños, grandes, gemelos y totales por individuo en el tratamiento RES en la cruza HB ($p < 0.05$).

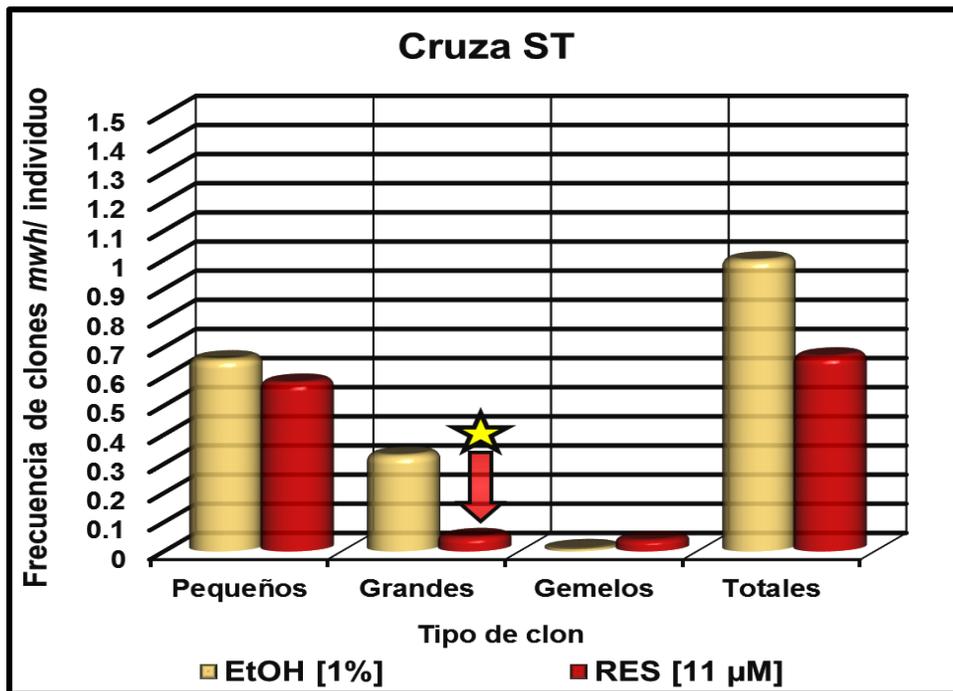


Figura 13. Frecuencia de clones pequeños, grandes, gemelos y totales por individuo en el tratamiento RES en la cruza ST ($p < 0.05$). ★ = Diferencia significativa del tratamiento RES con respecto al control negativo.

12.2.1.- Distribución de clones en el tratamiento RES

En la figura 14 se presenta la gráfica de la distribución del tamaño de los clones *mwh* del tratamiento RES en la cruza HB, señalando con (★) el resultado significativo del estadístico de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0.05$). Se puede apreciar que la distribución de clones del RES es estadísticamente significativa en comparación con el control negativo EtOH (Ver tabla 3). En el tratamiento RES se observa que la mayor cantidad de clones se expresaron sólo en la célula parental (75%), seguido de una disminución de la incidencia de los que se expresaron hasta la primera generación celular (16%), mientras los clones que se presentaron hasta la segunda generación fueron el (4%), y por último se encontraron clones que llegaron a expresarse hasta la quinta (17-32 células) y la séptima generación (65-128 células) con una incidencia del 2% en ambos casos.

En la figura 15 se muestra la gráfica de la distribución del tamaño de los clones *mwh* del tratamiento RES en la cruza ST señalando con (★) el resultado significativo del estadístico de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0.05$). Se observa que al igual que en la cruza ST existen diferencias significativas en la distribución de clones del RES con respecto al control negativo (Ver tabla 5). En el tratamiento RES se puede observar que la frecuencia de clones se expresó de una manera muy similar a la ocurrida en la cruza HB encontrándose clones *mwh* que solo se expresaron en la parental (75%) seguido de los clones que se expresaron hasta la primera (16%), segunda (5%), quinta (2%) y séptima generación celular (2%).

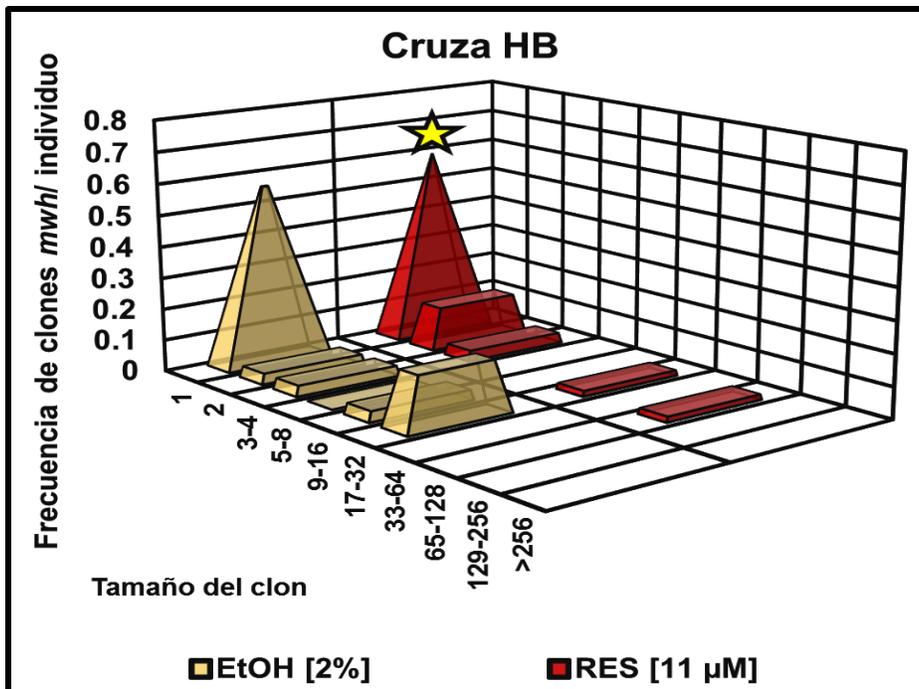


Figura 14. Distribución de clones en el tratamiento RES en la cruza HB ($p < 0.05$).
 ★ = Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo EtOH.

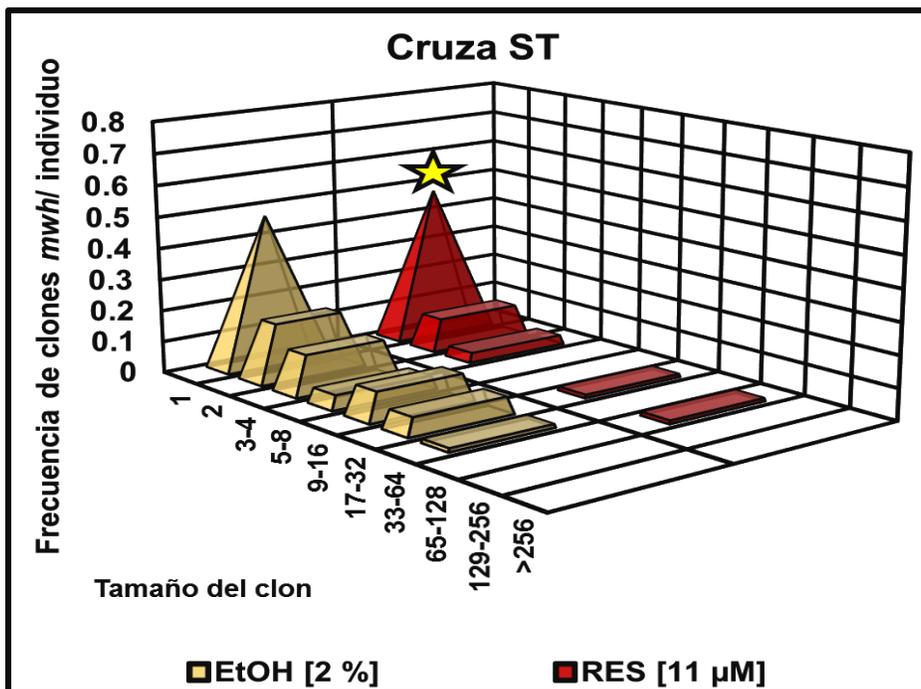


Figura 15. Distribución de clones en el tratamiento RES en la cruza ST ($p < 0.05$).
 ★ = Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo EtOH.

12.3. Co-tratamientos NIC + RES

En la figura 16 se muestran los resultados para la cruce HB, en donde se puede observar que no existen diferencias significativas para ningún tipo de clon entre el control negativo EtOH y los co-tratamientos NIC + RES, por lo cual ningún co-tratamiento fue genotóxico (Ver tabla 2.E), además de que los co-tratamientos NIC + RES no presentaron diferencias comparados con el tratamiento RES (Ver tabla 2.F) y de la misma manera, las frecuencias de los co-tratamientos al ser comparadas con sus respectivos tratamientos NIC no presentaron diferencias significativas (Ver tabla 2.G, H, I). En la gráfica se observa que en clones pequeños, los co-tratamientos NIC [12.5, 25 y 50 μ M] + RES tuvieron una frecuencia de (0.68, 0.65, 0.77) respectivamente siendo ésta frecuencia fue muy parecida a la del control negativo. En clones grandes de igual manera se obtuvo una frecuencia similar entre los co-tratamientos y el control negativo. Y por último los clones gemelos se presentaron solamente en el co-tratamiento de NIC [12.5 μ M], sin embargo la diferencia no fue significativa al compararlo con el control negativo.

En la figura 17 se presentan los resultados de la cruce ST, en donde solo se encontró una diferencia significativa del co-tratamiento NIC [12.5 y 25] + RES en comparación con el control EtOH en clones pequeños, grandes y totales (ver tabla 4.E). En clones pequeños al ser comparado con su respectivo tratamiento NIC [25 μ M] resultó en un aumento del 26%, mientras que en clones grandes aumentó la frecuencia (+0.24) (ver tabla 4.H). En el co-tratamiento de NIC [12.5 μ M] + RES se aprecia que las frecuencias en todos los tipos de clones son iguales en comparación con el control negativo, tomando en cuenta que su respectivo tratamiento NIC [12.5 μ M] fue genotóxico, se puede observar que en el co-tratamiento hubo una disminución de alrededor del 35% en la frecuencia de clones pequeños, mientras que en clones grandes disminuyó la frecuencia hasta 0, siendo estas diferencias estadísticamente significativas (Ver tabla 4.G). Y por último el co-tratamiento NIC [50 μ M] no fue diferente a los controles negativos ni presentó variación al ser comparado con su respectivo tratamiento NIC [50 μ M] (Figura 9) (Ver tabla 4.I).

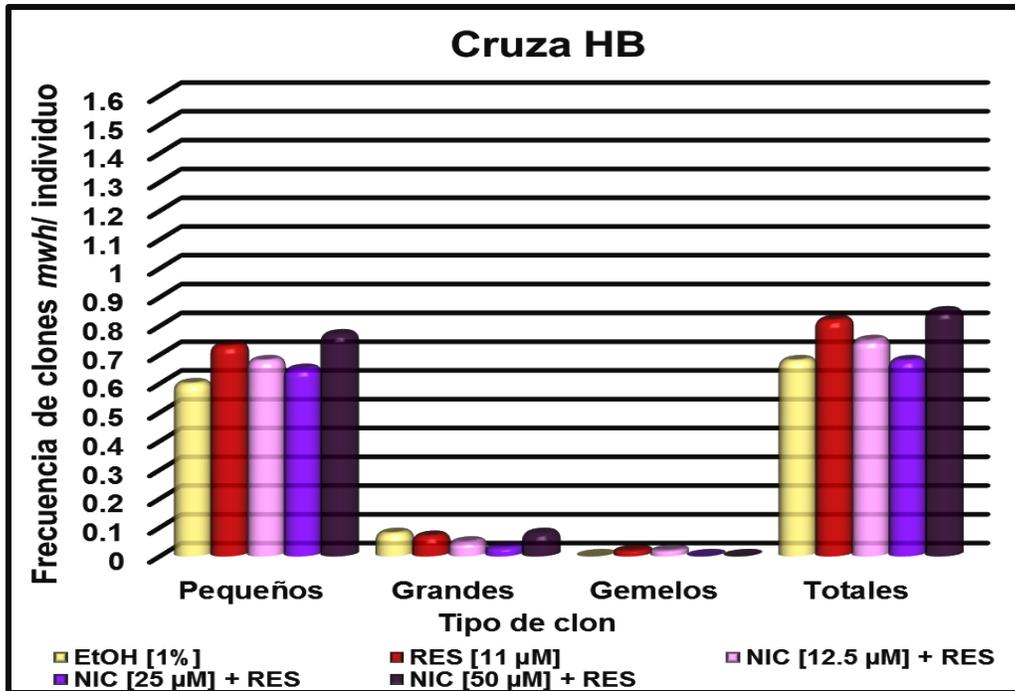


Figura 16. Frecuencia de clones pequeños, grandes, gemelos y totales por individuo de los co-tratamientos NIC + RES en la cruza HB ($p < 0.05$).

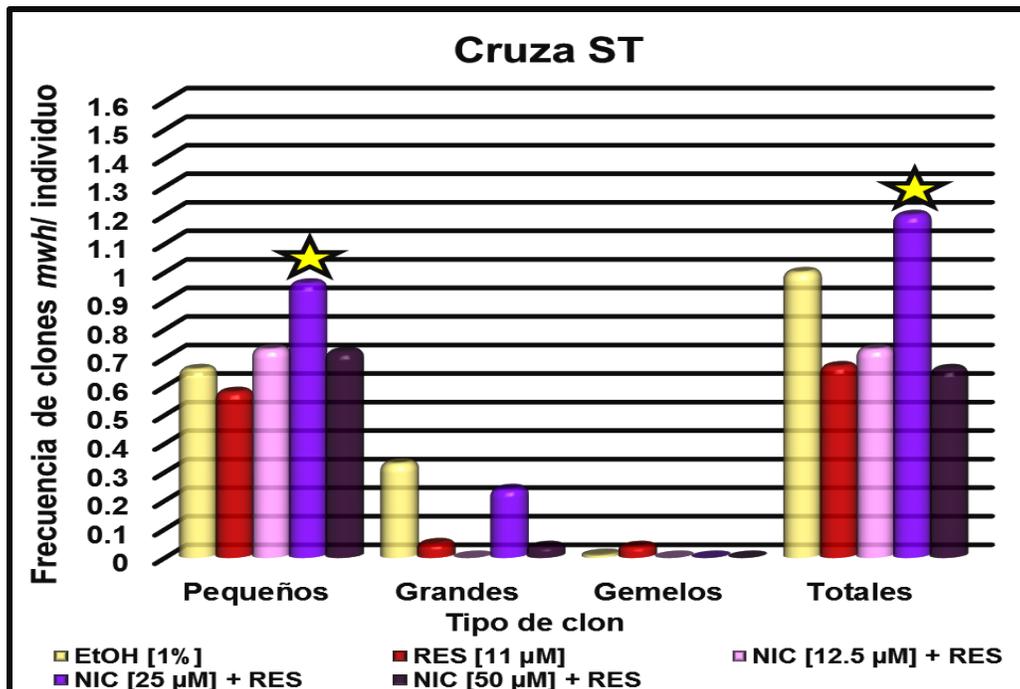


Figura 17. Frecuencia de clones pequeños, grandes, gemelos y totales por individuo de los co-tratamientos NIC + RES en la cruza ST ($p < 0.05$). ★ = Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo EtOH

12.3.1.- Distribución de clones en los co-tratamientos NIC + RES

En la figura 18 se muestra la gráfica de la distribución del tamaño de los clones *mwh* de los co-tratamientos NIC + RES en la cruza HB señalando con (★) los resultados significativos del estadístico de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0.05$). Donde se puede apreciar que los tres co-tratamientos de NIC + RES resultaron ser diferentes con respecto al control negativo (Ver tabla 3). En el co-tratamiento de NIC [12.5 μ M] + RES, se puede observar que la mayor cantidad de clones *mwh* se expresaron sólo en una célula (73%) mientras que el resto se llegaron a expresar hasta la primera generación celular (23%). En el co-tratamiento de [NIC 25 μ M] de igual forma, la mayoría de los clones sólo se expresaron en una sola célula (86%), y el resto fueron clones que se llegaron a expresar en la primera (4%), segunda generación (2%) y hasta la cuarta generación celular (8%). Por último, en el co-tratamiento NIC [50 μ M] los clones que se expresaron en sólo una célula fueron (82%) y el resto fueron clones que llegaron a expresarse en la primera (10%), segunda (3%), tercera (3%) y cuarta generación celular (2%).

En la figura 19 se presenta la gráfica de la distribución del tamaño de los clones *mwh* de los co-tratamientos NIC+RES en la cruza ST señalando con (★) los resultados significativos del estadístico de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0.05$). Se observa que la distribución de clones de los tres co-tratamientos resultaron ser diferentes a la del control negativo (Ver tabla 5). En el co-tratamiento NIC [12.5 μ M] + RES se encontró que la mayor cantidad de clones se expresaron en una sola célula (86%) mientras que el resto se expresó en la primera (13%) y hasta la segunda generación celular (1%). En el co-tratamiento NIC [25 μ M] + RES se aprecia que el 70% de clones sólo se expresaron en una sola célula, mientras que el resto de clones se expresó hasta la primera (8%), segunda (2%), tercera (3%), cuarta (1%), quinta (7%), sexta (7%) y séptima generación celular (2%). Finalmente, en el co-tratamiento NIC [50 μ M] + RES la expresión de los clones predominó también en una sola célula (83%) y el resto de clones lograron expresarse en la primera (11%), tercera (3%) y hasta la quinta generación celular (3%).

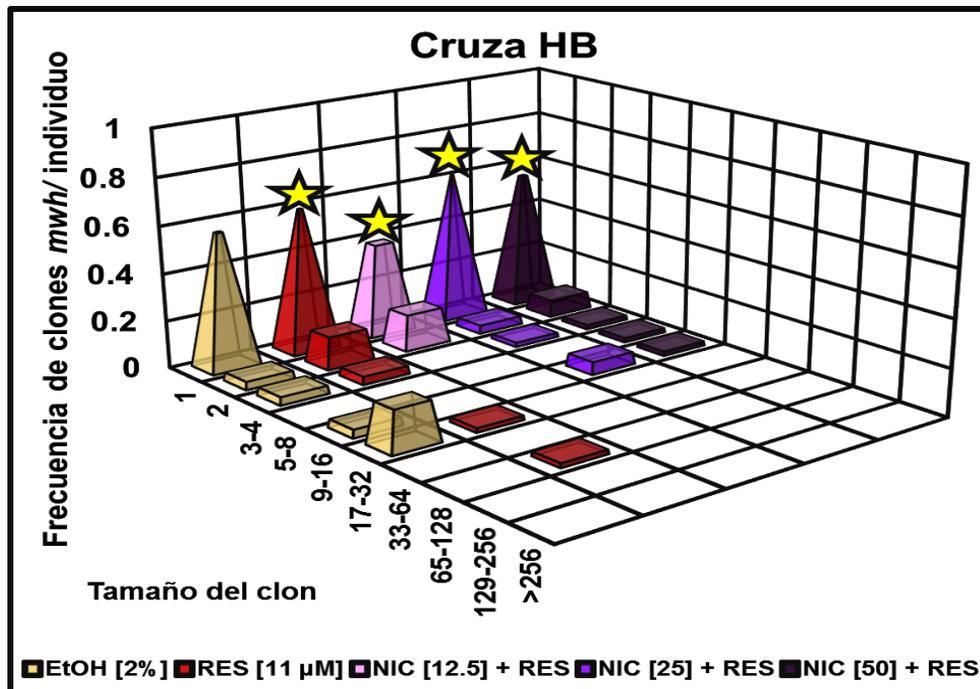


Figura 18. Distribución de clones en los co-tratamientos NIC+RES en la cruza HB ($p < 0.05$).
 ★ = Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo EtOH.

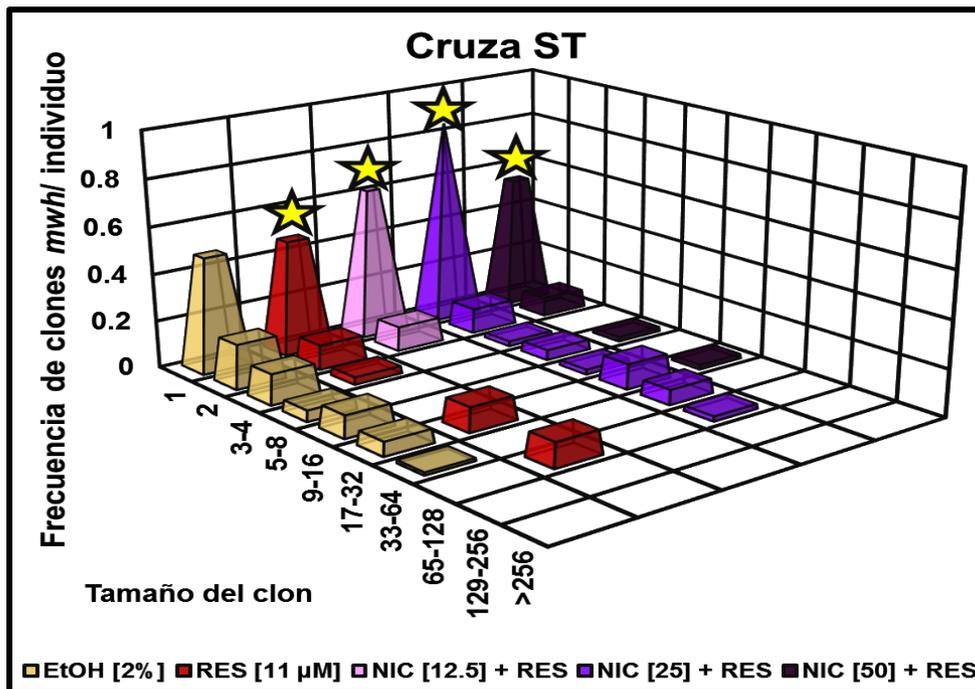


Figura 19. Distribución de clones en los co-tratamientos NIC+RES en la cruza ST ($p < 0.05$).
 ★ = Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo EtOH.

13.- Discusión

13.1.- Tratamientos NIC

Las tres concentraciones de NIC [12.5, 25 y 50 μM] utilizadas fueron determinadas con base en un ensayo previo en el que se determinó la CL_{50} en la cepa Canton S, debido a que hasta donde se sabe no existen diferencias metabólicas entre ambas cepas (Dra. Norma Velázquez-Ulloa Com. Pers).

En la cruce HB (Figura 8) ningún tratamiento de NIC tuvo un efecto genotóxico. Esto puede deberse a que la NIC es metabolizada vía Cyp450s tal como lo indica Li *et al*, (2012) quien además responsabiliza a la isoforma Cyp6g1. Debido a que esta cruce cuenta con una sobreexpresión de Cyp450s en comparación con la cruce ST, se puede inferir que a mayor cantidad de Cyp450s habría un mayor metabolismo de NIC, aunque al mismo tiempo se deberían de producir una mayor cantidad de metabolitos secundarios los cuales podrían generar un desequilibrio y alterar otros procesos celulares. Sin embargo, cabe mencionar que el metabolismo completo de la NIC aún no está claro en *Drosophila melanogaster*.

En cuanto a los resultados obtenidos en la cruce ST (Figura 9), el efecto genotóxico de NIC [12.5 μM] podría ser explicado por los niveles basales de Cyp450s que la cruce presenta. Existen estudios principalmente *in vitro* sobre los efectos de la NIC que avalan el daño genotóxico que puede producir a concentraciones bajas. Se ha demostrado que NIC [1 y 10 μM] es capaz de producir MNs y daño al DNA por medio de la inducción de estrés oxidante en fibroblastos gingivales de humano (Argentin y Cicchetti, 2004) y NIC [1, 10, 100 y 1000 μM] produjo aberraciones cromosómicas e ICH de manera dosis-dependiente en cultivo de linfocitos (Ginzkey *et al.*, 2013).

Si bien los resultados obtenidos con la concentración baja concuerdan con lo anteriormente citado, es importante subrayar que esos resultados fueron obtenidos en un modelo *in vitro*, mientras que el modelo utilizado en este trabajo es *in vivo* por lo que están involucrados el metabolismo, los sistemas de reparación, así como el factor de biodisponibilidad (Kluwe, 1995; Rothfussa *et al*, 2011).

Por un lado, NIC [12.5 μ M] provocó una gran cantidad de clones pequeños en la cruza ST, esto es un indicador de daño tardío en la célula y es típico de compuestos que son previamente bioactivados. Si bien en *Drosophila* no hay reportes que indiquen la formación de algún metabolito derivado de la NIC vía Cyp450s capaz de interactuar con el DNA, se sabe que en humanos el metabolismo de la NIC por medio del CYP2A6 genera nicotina- $\Delta^{1(5)}$ ión también conocido como ión nicotina imino, el cual está reportado como un agente alquilante (Shigenaga *et al.*, 1988). Este tipo de agentes actúan sobre varios sitios del DNA entre los que se encuentran la posición N-7 de la guanina, favoreciendo la ionización y la des ionización que lleva a mutaciones de transición (Wyatt y Pittman, 2003).

Por otro lado, NIC [12.5 μ M] también generó una gran cantidad de clones grandes, que son un indicador de daño temprano en células. Esto podría ser debido a la producción de ROS que generan la NIC (Yamamoto y Casida, 1999; Jain y Flora, 2012; Marriage *et al.*, 2014) sumado a los que produce la propia acción de los Cyp450s (Tang *et al.*, 2012). Es decir, se pudieron haber generado ROS en gran cantidad producto de la NIC antes de ser metabolizada y esto pudo haber alterado el equilibrio REDOX causando daño al DNA por medio de estrés oxidante. Esto concuerda con lo anteriormente citado en los trabajos de Argentin y Cicchetti, (2004) y Ginzkey *et al.*, (2013).

En cuanto a NIC [25 y 50 μ M] en la cruza ST, y el por qué no provocaron genotoxicidad puede ser porque en *D. melanogaster* hay Cyp450s que son inducibles por xenobióticos de manera dependiente a la concentración (Conney, 1986; Li *et al.*, 2012; Mohammed *et al.*, 2017) como es el caso de: Cyp6a2 (inducible por fenobarbital) (Dunkov *et al.*, 1997), Cyp6g1 (fenobarbital y cafeína) (Daborn *et al.*, 2002; Catania *et al.*, 2004) y Cyp12d1 (DDT) (Daborn *et al.*, 2007; Giraud *et al.*, 2010). Además existen estudios que evidencian en *D. melanogaster* una modulación en la expresión de los genes de Cyp6a2 y Cyp6g1 en larvas tanto en la cruza HB como ST (Vázquez-Gómez *et al.*, 2010). Y por último se ha reportado que el Cyp6g1 puede ser inducido por las ROS (Mohammed *et al.*, 2017). Por todo lo anterior, podría pensarse que la NIC a esas concentraciones pueda ser capaz de inducir la expresión de Cyp6g1 y así evitar el daño, sin embargo esto no es algo probado y por lo tanto tendría que demostrarse.

Además, el punto anterior es apoyado por el hecho de que no existen evidencias que demuestren que la NIC [25 y 50 μM] o alguna concentración cercana provoquen genotoxicidad. Solamente existen estudios *in vitro* que demuestran un efecto genotóxico pero a concentraciones mayores, a [500 μM] en linfocitos (Kleinasser *et al.*, 2005) y a [625 $\mu\text{g/mL}$] en células de ovario de hámster chino. Mientras que en estudios *in vivo* a [11.4 mM] usando SMART en ala de *D. melanogaster* en la cruza ST (Gómez-Loza, 2017).

En cuanto a los resultados en la distribución de clones en la cruza HB (Figura 10) se observó que a pesar no haber genotoxicidad en la cruza, si hubo una alteración en la división celular. Siendo el tratamiento de NIC [12.5 μM] solamente diferente al control positivo y NIC [25 y 50 μM] diferentes a ambos controles. Mientras que en la cruza ST (Figura 11) los tres tratamientos resultaron diferentes en comparación con ambos controles.

Estas alteraciones en las distribuciones de los clones podrían deberse a un efecto citotóxico o a uno apoptótico en las células, sin embargo hay que aclarar que la prueba de Kolmogorov-Smirnov no permite discernir si el cambio en la distribución fue positivo o negativo para el desarrollo de las alas, por lo que solamente se puede afirmar que la división celular se vio alterada por el efecto de los tratamientos de NIC.

Existen estudios *in vitro* que indican un efecto citotóxico provocado por la NIC como lo reportado por Yu Chao *et al.*, (2002) quienes encontraron que NIC [2.5 mM] fue citotóxica en fibroblastos de ligamento periodontal de humano, sin embargo esta fue una concentración mucho más alta que la que se usó en ese trabajo. Así mismo Attia, (2007) reportó que la exposición a NIC [10 mg/kg] por periodos de 48 h produjo citotoxicidad en células de médula ósea de ratón, esto concuerda en parte con el diseño experimental de este trabajo porque se aplicó un tratamiento crónico de 48 h a las larvas de tercer estadio hasta la pupación. Mientras que en estudios *in vivo* Gómez-Loza, (2017) reportó que NIC [11.4 mM] produjo una alteración de la división celular por medio de SMART en la cruza ST en ala de *D. melanogaster*, esto también concuerda con lo obtenido salvo que la concentración de NIC usada fue mucho mayor.

En concreto, las referencias que indican un efecto citotóxico provocado por la NIC tanto en estudios *in vitro* e *in vivo* utilizaron concentraciones muy por encima de las usadas en este trabajo aunque los tiempos de exposición a la NIC fueron los mismos. Por lo cual es plausible que se haya generado citotoxicidad, sin embargo hay que tomar en cuenta que a pesar de que existen referencias que apoyan la idea, no es suficiente para achacar este efecto a las concentraciones de NIC usadas, por lo que tienen que hacerse otro tipo de estudios para comprobar esta hipótesis.

En cuanto al efecto apoptótico, se sabe que en *Drosophila* la NIC tiene la capacidad de unirse a los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) de las células Kenyon, esto induce la entrada de iones a la célula y a su vez a las mitocondrias, obteniendo un efecto dosis-respuesta entre los niveles de calcio (Ca^{+2}) y a la concentración de NIC (Campusano *et al.*, 2007; Ivannikov y Macleod, 2013; Leyton *et al.*, 2014). Esto significa que altos niveles de Ca^{+2} dependientes de la concentración de NIC son tóxicos, ya que promueven una hiperpolarización celular que lleva a la apoptosis (Rizzuto *et al.*, 2003; Ivannikov y Macleod, 2013).

Además, hay estudios *in vitro* que indican que la NIC a concentraciones bajas es capaz de provocar apoptosis, sin embargo los resultados son contradictorios. Por un lado Argentin y Cicchetti, (2004) reportaron que NIC [1-10 μ M] indujo apoptosis en fibroblastos gingivales de humano, y Moga *et al.*, (2016) concluyeron que NIC [3.112 y 31.125 μ M] indujo apoptosis en células stem de mesénquima periodontal. Por otro lado, Ginzkey *et al.*, (2013) encontraron que NIC [1, 10, 100 y 1000 μ M] no afectó la frecuencia de apoptosis en linfocitos humanos, por lo que de igual manera habría que determinar si las concentraciones de NIC usadas en este trabajo son capaces de provocar apoptosis.

Por todo lo anterior, se puede concluir que el efecto de la NIC depende del modelo biológico utilizado, los tiempos de exposición, la concentración administrada, el bioensayo usado y el tipo celular.

13.2.- Tratamiento RES

La concentración de RES utilizada en este trabajo se determinó de acuerdo a Asensi *et al*, (2002) quienes reportaron sobre la biodisponibilidad de los polifenoles como el RES, que después de su administración tiene niveles bajos y difícilmente supera [$>11 \mu\text{M}$] en tejidos. Es por eso que concentraciones superiores no se deben de extrapolar a modelos *in vivo*, esto se debe al factor de biodisponibilidad que señala que aunque los estudios *in vitro* muestren una alta eficacia del RES en las células, la distribución en tejidos es muy baja y por lo tanto podría no tener los mismos efectos en estudios *in vivo* (Gambini *et al.*, 2013).

El hecho de que el RES [$11 \mu\text{M}$] no haya resultado ser genotóxico en ningún tipo de clon en la craza HB (Figura 12) concuerda con lo reportado por Sánchez-López, (2013) y Dueñas-García *et al*, (2017). Este resultado en la craza HB siempre se ha replicado en los trabajos que usaron SMART con la misma concentración o una muy cercana de RES.

Esto puede deberse a que el RES podría ser metabolizado en mayor cantidad en esta craza debido a la sobreexpresión de Cyp450s, generando análogos que rápidamente son desechados del organismo. Sin embargo, hay que destacar que no se sabe aún que Cyp450s sea el responsable del metabolismo del RES en *D. melanogaster*, aunque está demostrado que en humanos es metabolizado por las isoformas CYP1A2 y CYP1B1 (Kim *et al.*, 2009).

En cuanto a los resultados obtenidos en la craza ST (Figura 13), estos concuerdan en parte con lo reportado por Dueñas-García *et al*, (2017) quienes usando SMART en ala de *D. melanogaster* y utilizando RES [$11 \mu\text{M}$] no encontraron genotoxicidad en clones pequeños, sin embargo sí detectaron genotoxicidad en clones grandes.

Por otro lado, los resultados de este trabajo no concuerdan con los trabajos de Silva-Calzada, (2013) quien encontró genotoxicidad en clones grandes, y Gómez, (2013) quien reportó genotoxicidad en clones pequeños y gemelos. En ambos trabajos se usó SMART en ala de *Drosophila melanogaster* en la craza ST y RES [$11 \mu\text{M}$].

Como puede observarse, en todos los trabajos usando SMART en la cruza ST no se ha replicado exactamente el mismo resultado utilizando la misma concentración de RES, el único resultado que se replicó fue el de genotoxicidad para clones grandes en la cruza ST en los trabajos de Silva-Calzada, (2013) y Dueñas-García *et al*, (2017), sin embargo este no concuerda con lo obtenido en este trabajo.

Por otra parte, haciendo una comparación de las frecuencias de clones obtenidas a través de SMART en la cruza ST de los trabajos (Silva-Calzada, 2013 y Dueñas-García *et al*, 2017) con las obtenidas en este trabajo, se observó que las frecuencias para todos los tipos de clones generados en el tratamiento RES fueron muy similares en ambos trabajos y en este.

Sin embargo, en este trabajo las frecuencias del EtOH para todos los tipos de clones resultaron más altas a diferencia de los trabajos de (Silva-Calzada, 2013 y Dueñas-García *et al*, 2017), por lo que a la hora de comparar los resultados obtenidos en el tratamiento RES con el control, hubo una menor diferencia entre las frecuencias de clones y por lo tanto el programa SMART 2.1 no lo detectó como genotóxico.

Hay que señalar que esto no se había presentado en estudios previos utilizando SMART más que en el trabajo de García-Huerta, (2012) quien utilizando EtOH 1% encontró genotoxicidad en clones pequeños en la cruza ST, hay que señalar que todos los estudios siempre se han hecho bajo las mismas condiciones experimentales, líneas, protocolo de seguridad y grado del reactivo de EtOH, por lo cual no existe explicación para esto.

Existen estudios con otros modelos que muestran resultados contradictorios sobre si RES [11 μ M] o una concentración cercana es o no genotóxica. En cuanto a modelos *in vitro* los resultados de este trabajo concuerdan con lo reportado por Chen *et al*, (2013) quienes usando células de la línea A549 de adenocarcinoma de pulmón de humano encontraron que RES [1, 5 y 10 μ M] no fueron genotóxicas. Por otro lado, los resultados de este trabajo difieren con Schmitt *et al*, (2002) quienes reportaron que RES [11 μ M] indujo una gran cantidad de MNs en células de linfoma, y con Mitrut *et al*, (2009) quienes encontraron que RES [10 y 20 μ g/mL] fueron genotóxicas en células de adenocarcinoma gástrico, mostrando una inducción de MNs de manera dosis-dependiente.

Una posible razón del efecto contradictorio del RES tanto en modelos *in vitro* e *in vivo* es porque cada antioxidante es un agente redox, por lo tanto podría actuar como pro-oxidante acelerando la lipoperoxidación y/o inducir el daño al DNA en condiciones especiales (Lastra y Villegas, 2007). Hay que tomar en cuenta que debe existir un balance entre los antioxidantes y los radicales libres en las células para evitar el estrés oxidante que lleva a un daño celular (De la Fuente, 2002; Venereo-Gutiérrez, 2002). Por un lado, si hay un déficit de antioxidantes no se puede generar una “protección” suficiente contra los radicales libres en el organismo, y en el caso contrario dosis altas de antioxidantes también generan radicales libres actuando como pro-oxidantes que dañan el DNA (Skibola y Smith, 2000; Halliwell, 2006).

Debido a lo todo lo anterior y a la gran variedad de resultados tanto benéficos como adversos usando la misma concentración de RES en diferentes modelos, es muy probable que el RES [11 μ M] sea un genotóxico débil, y debido a esa razón resulte dañino en algunos estudios y en otros no, además el hecho de que no se haya replicado ningún resultado positivo o negativo en SMART más de dos veces a través de todos los experimentos que se han realizado apoya esta hipótesis.

En cuanto a la distribución de los clones *mwh* tanto en la cruce HB (Figura 14) y ST (Figura 15) la distribución de los clones en el tratamiento RES fue estadísticamente diferente al control negativo EtOH, por lo que también se puede afirmar que la distribución de los clones en el tratamiento RES en ambas cruces se vio alterada, esto concuerda con lo reportado por Silva-Calzada, (2013) y Gómez, (2013) quienes obtuvieron lo mismo usando RES [11 μ M] y EtOH 1% como control negativo.

Una hipótesis para explicar este cambio en la distribución de los clones sería que el RES [11 μ M] pudiera ser citotóxico, debido a que este compuesto puede tener un proceso de auto oxidación generando O_2 y H_2O_2 además de quinonas y semiquinonas que están reportadas como agentes citotóxicos (Sang *et al.*, 2007; Klaus *et al.*, 2010).

Existen estudios *in vitro* que indican un efecto citotóxico por parte del RES a concentraciones cercanas a la usada en este trabajo, como lo reportado por Scott, (2002) quien demostró que los isómeros *cis* y *trans* del RES [5 μ M] disminuyeron el crecimiento

de las células MCF-7 por citotoxicidad. Mientras que Chen *et al*, (2013) observaron que RES [20 μ M] inhibió la proliferación celular en células de la línea A549 de adenocarcinoma humano. Por otra parte, también hay estudios que demuestran un efecto citotóxico del RES pero a concentraciones mucho más altas como lo reportado por Schmitt *et al*, (2002) quienes encontraron que el RES [200 μ M] tuvo un efecto citotóxico en células de linfoma de ratón de las líneas L5178 y V79 de hámster chino.

La segunda hipótesis sería que el RES haya provocado apoptosis en las células. Existen estudios *in vitro* que lo avalan a concentraciones bajas. Aggarwal *et al*, (2004) reportaron que el RES [10 y 100 μ M] activó las caspasas 3 y 9 en células de cáncer de colon de humano de la línea SW480, mientras que Kucinska *et al*, (2014) encontraron que el RES [13.8 μ M] aumentó la actividad de las caspasas 3 y 9 en células Jurkat T de leucemia.

Por otro lado, hay reportes que indican que el RES a concentraciones bajas es capaz de inducir apoptosis por medio de la activación de p53 que es una proteína con un papel importante en la detención del ciclo celular, como lo reportado por She *et al*, (2001) usando RES [20 μ M], Shih *et al*, (2002) usando RES [1-10 μ M] y Hung-Yun *et al*, (2011) utilizando RES [10 μ M].

Finalmente, Surh *et al.*, (1999) encontraron que RES [40-100 μ M] indujo apoptosis por medio de la inhibición de la proteína antiapoptótica Bcl-2. Mientras que Sanjay-Kumar *et al*, (2017) concluyeron que RES [11 μ M] provocó apoptosis en células TRAMP C1 y C3 de próstata de manera independiente a las caspasas 3 y 9.

Por todo lo anterior, se infiere que el RES [11 μ M] pudo haber provocado un efecto citotóxico o apoptótico, pero se requieren realizar análisis de degradación del DNA o citometría de flujo para saber si provocó apoptosis o citotoxicidad.

13.3.- Co-tratamientos NIC + RES

En cuanto a los resultados de los co-tratamientos en la cruza HB (Figura 16), se observa que no hubo variación entre los tratamientos de NIC y los co-tratamientos NIC + RES. Esto pudo deberse a que la expresión de Cyp450s se encuentra a niveles muy altos en esta cruza, y eso podría haber sido suficiente para contrarrestar el efecto de la NIC. Es decir, la NIC pudo haber sido metabolizada eficientemente por los CYP450s por lo cual fue desechada de manera rápida del organismo.

En la cruza ST (Figura 17) se puede apreciar una disminución de alrededor del 35% en cuanto a clones pequeños y una disminución del 100% en clones grandes en el co-tratamiento NIC [12.5 µM] + RES comparándolo con su tratamiento NIC [12.5 µM] que si resultó genotóxico.

Esto concuerda con lo reportado en algunos estudios *in vitro*. Martínez *et al.*, (2000) evidenciaron que RES [30 µM] fue capaz de inhibir la formación de radicales libres del oxígeno derivados del óxido nítrico (NO) en macrófagos. Yan *et al.* (2011) concluyeron que RES [5, 25 y 50 µM] protegió al DNA del daño oxidante provocado por el EtOH en linfocitos humanos y Chen *et al.* (2013) demostraron que RES [1 y 5 µM] disminuyó significativamente el daño provocado por el arsenito de sodio en células de la línea A549 de adenocarcinoma de pulmón. También concuerda con lo reportado en estudios *in vivo*, como el de Silva-Calzada, (2013) quien reportó que RES [43 µM] redujo la frecuencia de manchas pequeñas y totales en co-tratamiento con uretano (URE) en la cruza ST por medio de SMART en ala de *D. melanogaster*.

La disminución estadísticamente significativa podría deberse a que el RES pudo haber actuado como un modulador de la genotoxicidad de la NIC debido a que es un antioxidante. Esto es por la estructura de su molécula que se sabe tiene tres sitios de actividad antioxidante: 3-OH, 5-OH y 4'-OH. La posición 4'-OH es la que tiene la mayor afinidad por los radicales libres (Matsuoka *et al.*, 2002). Además, el RES produce diversos análogos que pueden generar una reducción en la actividad genotóxica de otros compuestos y participar en otras vías (Matsuoka *et al.*, 2002).

Por otro lado, la modulación obtenida con el RES también podría deberse a la protección del daño genotóxico vía sirtuinas, disminuyendo el daño celular provocado por la NIC. Esto coincide en parte con el trabajo de Lin *et al.* (2012) quienes evaluaron la protección del RES contra la teratogénesis inducida por NIC en embriones de ratón encontrando un efecto benéfico del RES [1×10^{-7} y 1×10^{-8} μM]. Además de un posible balance entre agentes oxidantes y antioxidantes.

Por otra parte, en el co-tratamiento de NIC [25 μM] + RES en la cruz ST (Figura 17) se observó que sorpresivamente aumentó la frecuencia de clones pequeños en un 24% y la frecuencia de clones grandes en 100% en comparación con el tratamiento NIC [25 μM] que no fue genotóxico.

En estudios *in vitro* esto concuerda con lo reportado por Fukuhara y Miyata, (1998) que demostraron que el RES [100 μM] puede presentar efectos pro-oxidantes en presencia de iones de metales en transición como el cobre. Ahmad *et al.* (2004) concluyeron que el RES [4 y 8 μM] tuvo efectos pro-oxidantes en co-tratamiento con H_2O_2 aumentando los radicales superóxido en células de leucemia humana y Chen *et al.*, (2013) evidenciaron que el RES [20 μM] en co-tratamiento con arsenito de sodio [144 μM] aumentó la frecuencia de MNs en células de la línea A549 de adenocarcinoma de pulmón humano.

Mientras que en estudios *in vivo* concuerda con lo reportado por Silva-Calzada, (2013) quien reportó que RES [172 μM] en co-tratamiento con URE tuvo un efecto genotóxico, y Sánchez-López, (2013) que concluyó que RES [10 $\mu\text{g/mL}$] fue genotóxico en co-tratamiento con MMS.

La posible razón del porqué ocurrió un aumento en la genotoxicidad en el co-tratamiento NIC [25 μM] + RES podría deberse a un desbalance en el equilibrio REDOX en la célula. Está reportado que el RES puede tener modificaciones en su estructura que pueden alterar la conjugación que pueda tener con otras moléculas y debido a esto disminuye su potencial como antioxidante (Lu *et al.*, 2013).

También se ha observado la participación del grupo 4'-OH del RES en la actividad genotóxica que este pueda presentar debido a la modificación en los sustituyentes de este grupo en especial, además de que el RES puede actuar como homólogo con otros compuestos oxidantes (Matsuoka *et al.*, 2002). Y por otra parte también se sabe que algunos productos del metabolismo del RES pueden elevar su genotoxicidad (Matsuoka *et al.*, 2002; Schmitt *et al.*, 2002).

Otra posible explicación del efecto del RES en este co-tratamiento sería debido a la inhibición de algunos *Cyp450s* permitiendo a la NIC provocar daño. Se sabe que el RES es un potente inhibidor de cinco isoformas en vertebrados: CYP1A1, CYP1B1, CYP3A4, CYP2E1 y CYP3A5 (Revel *et al.*, 2003; Piver *et al.*, 2004^a; Zhou *et al.*, 2005; Mohammadi-Bardbori *et al.*, 2012). Si bien, los estudios de inhibición de *Cyp450s* por parte del RES sólo han sido en humanos, hay que tomar en cuenta que las isoformas CYP3A4 y CYP3A5 de humano son ortólogas al *Cyp6g1* de *D. melanogaster* que es el encargado de metabolizar la NIC en este insecto (FlyBase^b). Sin embargo, esto no explica por qué el RES solamente presentó un efecto pro-oxidante con la concentración intermedia de NIC y no con la concentración baja y alta, por lo que ésta hipótesis es la menos probable.

Finalmente, en el co-tratamiento de NIC [50 µM] + RES (Figura 17) en ninguna crusa se encontró variación en las frecuencias de clones entre este co-tratamiento y su tratamiento de NIC (Figura 9). En este caso la razón podría ser que el RES actuó de manera efectiva contra la formación de ROS de la NIC, o que NIC [50 µM] sea una concentración suficiente para la inducción de *Cyp450s*.

En cuanto a la distribución de los clones *mwh* tanto en la crusa HB (Figura 18) como en la ST (Figura 19) se observó una alteración de la división celular. Esto concuerda con Silva-Calzada, (2013) quién evidenció que RES [11, 43 y 172 µM] alteró la división celular en co-tratamiento con URE usando SMART en ala de *D. melanogaster* en la crusa ST. Así mismo con (Sánchez, 2013) que demostró que RES [10 µg/mL) alteró la división celular en co-tratamiento con metil metano sulfonato utilizando SMART en ala *D. melanogaster* en la crusa HB. Y por último, concuerda con Dueñas-García *et al.*, (2017) quienes reportaron que el RES [11 µM] en co-tratamiento con 4-NQO alteró la división celular tanto en la crusa HB como en la ST.

En el co-tratamiento de NIC [12.5 μ M] + RES en ambas cruza se observó que los clones *mwh* sólo se expresaron hasta la segunda generación celular, tomando en cuenta que el tratamiento de NIC a esa concentración resultó genotóxico en la cruza ST, además de la capacidad del RES de ser un compuesto pro-oxidante en condiciones especiales, es probable que se haya generado citotoxicidad o apoptosis.

Existen estudios *in vitro* que indican que el RES a concentraciones bajas en conjunto con otros compuestos pueden generar o aumentar los eventos de citotoxicidad, como lo reportado por Osman *et al.*, (2012) quienes encontraron que el RES a [63 μ M] aumentó la citotoxicidad de la doxorubicina en células de cáncer de mama. Sin embargo son pocos los estudios que indican un efecto citotóxico del RES en conjunto con otros compuestos a concentraciones bajas por lo que son necesarios otros estudios para medir la citotoxicidad del RES [11 μ M].

Aparte de la capacidad del RES de activar diversas caspasas y a p53, también está demostrado que el RES [25 μ M] es capaz de inhibir el crecimiento y la proliferación de células CaCo-2 a través de la apoptosis, deteniendo el ciclo celular en las fases S y G₂ (Schneider *et al.*, 2000).

Por otro lado en los co-tratamientos NIC [25 μ M] + RES y NIC [50 μ M + RES] los clones lograron expresarse durante más generaciones celulares, y de igual manera en este caso pudo deberse al posible efecto citotóxico o apoptótico de RES [11 μ M].

En concreto, en el caso de los co-tratamientos los efectos observados podrían deberse a que el RES:

- 1) Es capaz de provocar citotoxicidad y genotoxicidad.
- 2) Puede inducir a la apoptosis.
- 3) Puede promover la producción de ROS.
- 4) Es un agente REDOX.
- 5) Es capaz de inhibir ciertas isoformas de Cyp450.

En conclusión, el RES en co-tratamiento pudo haber generado cualquiera de los eventos descritos anteriormente, sumados a la producción de ROS que la NIC puede producir.

14.- Conclusiones

- En la craza HB ninguna concentración de NIC provocó genotoxicidad, sin embargo NIC [25 y 50 μM] promovieron una alteración de la división celular debido presumiblemente a un efecto apoptótico o citotóxico.
- En la craza ST, la concentración de NIC [12.5 μM] fue la única que mostró un efecto genotóxico sobre las células de los discos imaginales de ala. Sin embargo, las tres concentraciones de NIC promovieron una alteración de la división celular en los discos imaginales.
- El RES [11 μM] no resultó genotóxico en ninguna de las dos cruzas. No obstante, alteró la división celular en los discos imaginales del ala de ambas cruzas.
- En la craza HB los co-tratamientos NIC + RES no mostraron aparentemente ningún efecto ya que no variaron en la frecuencia de clones *mwh* con respecto a los tratamientos NIC.
- En la craza ST, el co-tratamiento de NIC [25 μM] + RES resultó genotóxico, pudiendo el RES haber actuado como un pro oxidante junto con la NIC.

15.- Recomendaciones

- Se propone realizar experimentos para cuantificar las ROS que se producen en las larvas tratadas con NIC [12.5, 25 y 50 μM] RES [11 μM] y los co-tratamientos NIC + RES.
- Se requiere medir el efecto apoptótico del RES [11 μM] utilizando marcadores de apoptosis.
- Se sugiere realizar análisis de degradación del DNA o citometría de flujo para comprobar el grado de citotoxicidad del RES [11 μM].

16.- Bibliografía

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

- R.F., Zaveri, J.S., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X.H., Zhong, F.N., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S., Zhu, X., Smith, H.O., Gibbs, R.A., Myers, E.W., Rubin, G.M., Venter, J.C. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 287(5461): 2185-2195.
2. Aagarwal, B. B., Bhardwaj., Aggarwal, R.S., Seeram, N.P., Shishodia, S., Takada, Y. (2004). Role of resveratrol in prevention and therapy cancer; preclinical and clinical studies. *Anticancer Res*. 24: 2783-2840.
 3. Aagarwal, B., Baur, J.A. (2011). Resveratrol and life extension. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1215(1): 138-143.
 4. Ahmad, K.A., Clement, M.V., Pervaiz, S. (2003). Pro-oxidant activity of low doses of resveratrol inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1010: 365-373.
 5. Ahmad, K.A., Clement, M.V., Hanif, I.M., Pervaiz, S. (2004). Resveratrol inhibits drug-induced apoptosis in human leukemia cells by creating an intracellular milieu non permissive for death execution. *Cancer Res*. 64(4): 1452-1459.
 6. Alfaro-Moreno, E., García-Cuéllar, C., Dueñas-González, A. (2000). Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Cancerología*. 46(4): 275-280.
 7. Amri A, Chaumeil J, Sfar S, Charrueau C. (2012). Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? *J Control Release*. 158(2): 182-93.
 8. Amorós-Gibaja, M. (2001). Estudio de mutantes del cromosoma III de *Drosophila melanogaster*, el gen ash-2 como regulador de la diferenciación celular. Tesis para

obtener el grado de Dr. en biología. Facultad de Biología, Universidad de Barcelona.

9. Andriambelason, E., Magnier, C., Haan-Archipof, G., Lobstein, A., Anton, R., Beretz, A., Stoclet, J.C., Andriantsitohaina, R. (1998). Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxion in rat thoracic aorta. *J. Nutr.* 128(12): 2324-2333.
10. Antúnez-Treviño, J.M., Gutiérrez-Jáuregui, N., Flores-García, G.S., Cárdenas-Franco, C., Treviño-Alanís, M. G., Ramírez-Menchaca, H.R., Rivera-Silva, G. (2013). Nicotina y enfermedad periodontal. *Rev. ADM.* 70(6): 292-297.
11. Argentin, G., Cicchetti, R. (2004). Genotoxic and antiapoptotic effect of nicotine on human gingival fibroblasts. *Toxicol. Sci.* 79(1): 75-81.
12. Asensi, M., Medina, I., Ortega, A., Carretero, J., Bano, M.C., Obrador, E., Estrella, J.M. (2002). Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radic. Biol. Med.* 33(3): 387-389.
13. Attia, S.M. (2007). The genotoxic and cytotoxic effects of nicotine in the mouse bone marrow. *Mutat. Res.* 632(1): 29-36.
14. Bajpayee, M., Pandey, A.K., Parmar, D., Dhawan, A. (2005). Current status of short-term tests for evaluation of genotoxicity, mutagenicity and carcinogenicity of environmental chemicals and NCEs. *Toxicol. Mech. Methods.* 15(3): 155-180.
15. Ballinger, S.W., Boudier, T.G., Davis, G.S., Judice, S.A., Nicklas, J.A., Albertini, R.J. (1996). Mitochondrial genome damage associated with cigarette smoking. *Cancer Res.* 56(24): 5692-5697.

16. Barr, J., Sharma, C.S., Sarkar, S., Wise, K., Dong, L., Periyakaruppan, A., Ramseh, G.T. (2007). Nicotine induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor kappa B in rat mesencephalic cells. *Mol. Cell. Biochem.* 297(2): 93-99.
17. Baur, J.A., Sinclair, D.A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 5(1): 493-506.
18. Benowitz, N.L., Jacob, P 3rd. (1985). Nicotine renal excretion rate influences nicotine intake during cigarette smoking. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 234(1): 153-155.
19. Benowitz, N.L., Porchet, H., Sheiner, L., Jacob, P 3rd. (1988). Nicotine absorption and cardiovascular effects with smokeless tobacco use: comparison with cigarettes and nicotine gum. *Clin. Pharmacol. Ther.* 44(1): 23-28.
20. Benowitz, N.L. (1990). Clinical pharmacology of inhaled drugs of abuse: implications in understanding nicotine dependence. *NIDA Res. Monogr.* 99(1): 12-29.
21. Benowitz, N.L., Jacob, P 3rd. (1994). Metabolism of nicotine to cotinine studied by a dual stable isotope method. *Clin. Pharmacol. Ther.* 56(5): 483-493.
22. Benowitz, N.L., Lessov-Schlaggar, C., Swan, G. (2008). Genetic influences in the variation in renal clearance of nicotine and cotinine. *Clin. Pharmacol. Ther.* 84(2): 243-247.
23. Brusick, D. (1988). *Principles of genetic toxicology*. 2^a. Ed. Plenum Press, New York, USA. 284 Pp.
24. Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M.E., Crozier, A. (2002). Plant foods and herbal sources of resveratrol. *Jour. Agric. Food Chem.* 50(1): 3337-3340.

25. Calvo-Carrillo, M.C. (2013). *Toxicología de los alimentos*. McGraw Hill, 1^{ra} ed. México D.F. 468 Pp.
26. Campusano, J.M., Su, H., Jiang, S.A., Sicaeros, B., O'Dowd, D.K. (2007). nAChR-mediated calcium responses and plasticity in *Drosophila* Kenyon cells. *Dev. Neurobiol.* 67(11): 1520-1532.
27. Cashman, J.R., Park, S.B., Yang, Z.C., Wrighton, S.A., Jacob, P., Benowitz, N.L. (1992). Metabolism of nicotine by human liver microsomes: stereoselective formation of *trans*-nicotine N'-oxide. *Chem. Res. Toxicol.* 5(5): 639-646.
28. Castañeda-Partida, M.L., Heres-Pulido, M.E., Dueñas-García, I.E. (2008). *Drosophila melanogaster, un modelo experimental*. UNAM, FES Iztacala. México, D.F. 86 Pp.
29. Castell, J.V. (2005). Metabolismo de fármacos y hepatotoxicidad. *Revista Toxicology* 13(1): 1007-1024.
30. Catalgol, B., Batirel, S., Taga, Y., Ozer, N.K. (2012). Resveratrol: French paradox revisited. *Front. Pharm.* 3(1): 141-143.
31. Catania, F., Kauer, M.O., Daborn, P.J., Yen, J.L., French-Constant, R.H., Schlotterer, C. (2004). World-wide survey of an accord insertion its association with DDT resistance in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Ecol.* 13(8): 2491-2504.
32. Chen, C., Jiang, X., Zhao, W., Zhang, Z. (2013). Dual role of resveratrol in modulation of genotoxicity induced by sodium arsenite via oxidative stress and apoptosis. *Food Chem. Toxicol.* 59(1): 8-17.

33. Clement, M.V., Hirpara, J.L., Chawdhury, S.H., Pervaiz, S. (1998). Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood*. 92(3): 996-1002.
34. Conney, A.H. (1986). Induction of microsomal cytochrome P-450 enzymes: The first Bernard B. Brodie lecture at Pennsylvania State University. *Life Sci*. 39(26): 2493-2518.
35. Croom, E. (2012). Metabolism of xenobiotics of human environments. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci*. 112(1): 31-88.
36. Crowley-Weber, C.L., Dvorakova, K., Crowley, C., Bernstein, H., Garewal, H., Payne, C.M. (2003). Nicotine increase oxidative stress, activates NF-KB and GRP78, induces apoptosis and sensitizes cells to genotoxic/ xenobiotic stresses by a multiple stress inducer deoxycholate: relevance to colon carcinogenesis. *Chem. Biol. Interact*. 145(1): 53-66.
37. Csizar, A., Labinsky, N., Podlutzky, A., Kaminski, P.M., Wolin, M.S., Zhang, C. (2008). Vasoprotective effects of resveratrol and SIRT1: attenuation of cigarette smoke-induced oxidative stress and proinflammatory phenotype alterations. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 294(6): 2721-2735.
38. Daborn, P.J., Yen, J.L., Bogwitz, M.R., Le Goff, G., Feil, E., Jeffers, S., Tijet, N., Perry, T., Heckel, D., Batterman, P., Feyereisen, R., Wilson, T.G., Ffrench-Constant, R.H., Schlotterer, C. (2002). A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science*. 297(5590): 2253-2256.
39. Daborn, P.J., Lumb, C., Boey, A., Wong, W., Ffrench-Constant, R.H., Batterman, P. (2007). Evaluating the insecticide resistance potential for eight *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes by transgenic over-expression. *Insect Biochem. Mol. Biol*. 37(5): 512-519.

40. Danielson, P.B. (2002). The cytochrome p450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr. Drug Metab.* 3(6): 561-597.
41. De La Fuente, L., Frutos, J. (1995). *Toxicología y seguridad química: Evaluación y gestión de riesgo químico*. Comunidad de Madrid. Consejería de Sanidad y Servicios Sociales.
42. De La Fuente, M. (2002). Effects on antioxidants on immune system aging. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56(3): 5-8.
43. Dobrydneva, Y., Williams, R.L., Blackmore, P.F. (1999). *Trans-resveratrol* inhibits calcium influx in thrombin-stimulated human platelets. *Br. J. Pharmacol.* 128(1): 149-157.
44. Doll, R., Peto, R. (1981). The causes of cancer quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.* 66(6): 1191-1308.
45. Donato, M.T. (2009). ¿Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona? [En línea] [Fecha de acceso: 23 de marzo de 2017]. Accesible en: <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/515/533>.
46. Dong, Z. (2003). Molecular mechanism of the chemo preventive effect of resveratrol. *Mutat. Res.* 523(1): 145-150.
47. Dreher, D., A.F. Junod. (1996). Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur. J. Cancer.* 32(1):30-38.
48. Dueñas, I.E., Heres, M.E., Castañeda, L., Graf, U. (2002). Easy raising of *Drosophila melanogaster* on a medium consisting of mashed potato flakes and preservative solution. *DIS.* 84(1): 166.

49. Dunkov B.C., Guzov V.M., Mocelin, G., Shotkoski F., Brun, A., Amichot, M., Ffrench-Constant, R.H., Feyereisen, R. (1997). The *Drosophila* cytochrome P450 gene Cyp6a2: Structure, localization, heterologous expresion, and induction by phenobarbital. *DNA Cell Biol.* 16(11): 1345-1356.
50. Erhardt, S., Hajos, M., Lindberg, A., Engberg, G. (2000). Nicotine-induced excitation of locus coeruleus neurons is blocked by elevated levels of endogenous kynurenic acid. *Synapse.* 37(2): 104-108.
51. Favaron, F., Lucchetta, M., Odorizzi, S., Pais da Cunha, A.T., Sella, L. (2009). The role of grape polyphenols on trans-resveratrol against activity Botrytis cinerea and of fungal laccase of the solubility of putative grape PR proteins. *Journal of plant pathology.* 91(3): 579-588.
52. Finkel, T., Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature.* 408(6809): 239-247.
53. FlyBase^a (2017). [En línea] 28 de mayo de 2017 [Fecha de acceso: 28 de mayo de 2017] Accesible en: <http://flybase.org/reports/FBgn0010383.html>.
54. FlyBase^b (2017). [En línea] 04 de junio de 2017 [Fecha de acceso: 04 de junio de 2017] Accesible en: <http://flybase.org/reports/FBgn0025454.html>.
55. Foti-Cuzzola, V., Ciurleo, R., Giacoppo, S., Marino, S., Bramanti, P. (2011). Role of resveratrol and its analogues in the treatment of neurodegenerative diseases: focus on recent discoveries. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 10(7): 849-862.
56. Frei, H., Würigler, F.E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.* 203(4): 297-308.

57. Frei, H., Würigler, F.E. (1995). Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 334(2): 247-258.
58. Frölich, A., Würigler, F.E. (1990) Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing spot test: dependence on genotype-controlled metabolic capacity. *Mutat. Res.* 244(3): 201-208.
59. Fukuhara, K., Miyata, N. (1998). Resveratrol as a new type of DNA-cleaving agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8(22): 3187-3192.
60. Gambini J, López R, Olaso G, Inglés M, Abdelazida K, Alamia M, Bonet V, Borrás C, Viña J. (2013). Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas. *Geriatría y Gerontología.* 48(2): 79-88.
61. García-Huerta, E. (2012). Evaluación del potencial antigenotóxico del resveratrol en co-tratamiento con MMS, en el bioensayo SMART en ala de *Drosophila melanogaster* (cruza estándar). Tesis de para obtener el título de licenciatura en biología. FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.
62. Gaytán, J.C. (2006). Evaluación ecotoxicológica del estradiol y sus metabolitos primarios liberados al ambiente, a través de la actividad ganadera. Tesis para obtener el título de doctorado en química. UAEH. México. 82 Pp.
63. Ginzkey, C., Friehs, G., Koehler, C., Hackenberg, S., Hagen, R., Kleinsasser, N.H. (2013). Assessment of nicotine-induced DNA damage in a genotoxicological test battery. *Mutat. Res.* 751(1): 34-39.
64. Giraud, M., Unnithan C., Le Goff, G., Fayereisen, R. (2010). Regulation of cytochrome P450 in *Drosophila*: Genomic insights. *Pestic. Biochem. Physiol.* 97(2): 115-122.

65. Gómez, S. (2013). Evaluación del efecto genotóxico del resveratrol en la prueba de mutación y recombinación somática en ala de *Drosophila melanogaster* cruza estándar (CE). Tesis para obtener el título de licenciatura en biología. FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.
66. Gómez-Loza, B. (2017). Efecto modulador del resveratrol sobre la genotoxicidad de la nicotina evaluada con la prueba SMART en *Drosophila melanogaster*. Tesis para obtener el título de licenciatura en biología. FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.
67. Graf, U., Würigler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B., Kale, P. G. (1984). Somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6(2): 153-188.
68. Graf, U., Abraham, S.K., Guzmán, J.R., Würigler, F.E. (1998). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 402(1): 203-209.
69. Guengerich, P., Chun F., Kim, J., Gillam, D. (2003). Cytochrome P450 1B1: A target for inhibition in anticarcinogenic strategies. *Mutat. Res.* 523(1): 173-182.
70. Guerrero S. J., Valle B. M., Aguirre E. J. (2005). La respuesta SOS en *Escherichia coli*. *Rev. Esp. Cien. Quim-Bio.* 8(1): 99-105.
71. Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2(141): 312-322.
72. Heres-Pulido, M.E., Dueñas-García, I.E., Castañeda-Partida, L., Santos-Cruz, L.F., Vega-Contreras, V., Rebollar-Vega, R., Gómez-Luna, J.C., Durán-Díaz, A. (2010). Genotoxicity studies of organically grown broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and its interactions with urethane, methyl methanesulfonate and 4-nitroquinolone-1-oxide genotoxicity in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.* 48(1): 120-128.

73. Arinç, E., Schenkman, J.B., Hodgson, E. (1991). Insect cytochrome P450. *In molecular aspects of monooxygenases and bioactivation of toxic compounds*. Ed. Springer US. New York, USA. 75-79.
74. Hukkanen, J. Jacob, P 3rd, Benowitz, N.L. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharma. Rev.* 57(1): 79-115.
75. Hung-Yun, L., Heng-Yuan, T., Davis, F.B., Davis, P.J. (2011). Resveratrol and apoptosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1215(1): 79-88.
76. Imai, S., Armstrong, C.M., Kaeberlein, M., Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature.* 403(6771): 795-800.
77. Ivannikov, M.V., Macleod, G.T. (2013). Mitochondrial free Ca²⁺ levels and their effects on energy metabolism in *Drosophila* motor nerve terminals. *Biophys. J.* 104(11): 2353-2361.
78. Izzotti, A., Calin, G.A., Arrigo, P., Steele, V.E., Croce, C.M., De Flora, S. (2009). Downregulation of microRNA expression in the lungs of rats exposed to cigarette smoke. *FASEB. J.* 23(3): 806-812.
79. Jang, M., Cai, L., Udenai, G.O., Slowing, K.B., Thomas, C.F., Beecher, C.W., Fong, H.H., Farnsworth, N.R., Kinghom, A.D., Mehta, R.G., Moon, R.C., Pezzuto, J.M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science.* 275(5297): 218-220.
80. Jang, J.H., Surh, Y.J. (2001). Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Mutat. Res.* 498(2): 181-190.

81. Jain, A., Flora, S.J. (2012). Dose related effects of nicotine on oxidative injury in young, adult and old rats. *J. Environ. Biol.* 33(2): 233-238.
82. Johnson, G.K., Guthmiller, J.M. (2007). The impact of cigarette smoking on periodontal disease and treatment. *Periodontol.* 44(1): 178-194.
83. Kasdallah-Grissa, A., Mornagui, B., Aouani, E., Hammami, M., El May, M., Gharbi, N. (2007). Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *Life. Sci.* 80(11): 1033-1039.
84. Kim, D.H., Ahn, T., Jofung, H.C., Pan, J.G., Yun, C.H. (2009). Generation of the human metabolite piceatannol from the anticancer-preventive agent resveratrol by bacterial cytochrome P450 BM3. *Drug Metab. Dispos.* 37(5): 932-936.
85. Klaassen, C.D., Watkins, J.B., Casarett y Doull, (2005). *Fundamentos de toxicología*. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. 560 Pp.
86. Klaus, V., Hartmann, T., Gambini, J., Graf, P., Stahl, W., Hartwig, A., Klotz, L.O. (2010). 1,4-Naphtoquinones as inducers of oxidative damage and stress signaling in HaCat human keratinocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 496(2): 93-100.
87. Kleinsasser NH, Sassen AW, Semmler MP, Harréus UA, Licht AK, Richter E. (2005). The tobacco alkaloid nicotine demonstrates genotoxicity in human tonsillar tissue and lymphocytes. *Toxicol Sci.* 86(2): 309-317.
88. Kluwe, W.M. (1995). The complementary roles of *in vitro* and *in vivo* tests in genetic toxicology assessment regulatory toxicology and pharmacology. *Regulatory toxicology and pharmacology.* 22(3): 268-272.

89. Kucinska, M., Piotrowska, H., Luczak, M.W., Pietrasik, J.M., Ksiazek, K., Wozniak, M., Wierzchowski, M., Dudka, J., Jäger, W., Murias, M. (2014). Effects of hydroxylated resveratrol analogs on oxidative stress and cancer cell death in human acute T cell leukemia cell line: pro oxidative potential of hydroxylated resveratrol analogs. *Chem. Biol. Interact.* 209(1): 96-110.
90. Lastra, A.C., Villegas, I. (2007). Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem. Soc. Trans.* 35(5): 1156-1160.
91. Leshner, A.I. (2001). Nicotine addiction. Research Report Series. National Institute on Drug Abuse. NIH Publication Number 01-4342.
92. Leyton, V., Goles, N.I., Fuenzalida-Urbe, N., Campusano, J.M. (2014). Octopamine and dopamine differentially modulate the nicotine-induced calcium response in *Drosophila* mushroom body Kenyon cells. *Neurosci. Lett.* 560(1): 16-20.
93. Li, X., Schuler, M., Berenbaum, M., (2007). Molecular mechanism of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.* 52(1): 231-253.
94. Li, X., Bai, S., Cass, B.N. (2012). Accord insertion in the 5' flanking region of *cyp6g1* confers nicotine resistance in *Drosophila melanogaster*. *Gene.* 502(1): 1-8.
95. Lin, J.H., Lu, A.Y. (1998). Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin. Pharmacokinet.* 35(5): 361-390.
96. 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 prevent nicotine-induced teratogenesis in cultured mouse embryos. *Reprod. Toxicol.* 34(3): 340-346.

97. Lu, L., Zhu, S., Zhang, H., Zhang, S. (2013). Improvement of antioxidative activity of resveratrol by elongating conjugated chain: A DFT theoretical study. *Computational and theoretical chemistry*. 1019(1): 39-47..
98. Malhotra, R., Kapoor, A., Grover, V., Kaushai, S. (2010). Nicotine and periodontal tissues. *J Indian Soc. Periodontol*. 14 (1): 72-79.
99. Marriage, T.N., King, E.G., Long, A.D., MacDonald, S.J. (2014). Fine-mapping nicotine resistance loci in *Drosophila* using a multiparent advanced generation inter-cross population. *Genetics*. 198(1): 45-57.
100. Martin, R.A., Rodríguez, G.I., Rubio, C., Revert, C., Hardisson, A. (2004). Efectos tóxicos del tabaco. *Revista de toxicología*. 21(2): 64-71.
101. Martínez, J., Moreno, J.J. (2000). Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem. Pharmacol*. 59(7): 865-870.
102. Martins, L.A., Coelho, B.P., Behr, G., Pettenuzzo, L.F., Souza, I.C., Moreira, J.C., Borojevic, R., Gottfried, C., Guma, F.C. (2013). Resveratrol induces pro-oxidant effects and time-dependent resistance to cytotoxicity in activated hepatic stellate cells. *Cell Biochem. Biophys*. 68(2): 247-257.
103. Matsuoka, A., Furuta, A., Ozaki, M., Fukahara, K., Miyata, N. (2001). Resveratrol, a natural occurring polyphenol, induces sister chromatid exchanges in a Chinese hamster lung (CHL) cell line. *Mutat. Res*. 494(1): 107-113.
104. Matsuoka, A., Takeshita, K., Furuta, A., Ozaki, M., Fukuhara, K., Miyata, N. (2002). The 4'-hydroxyl group is responsible for the *in vitro* cytogenetic activity of resveratrol. *Mutat. Res*. 521(1): 29-35.

- 105.** Mattivi, F., Reniero, F., Korhammer, S. (1995) Isolation, characterization and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers. *J. Agric.Food Chem.* 43(7): 1820-1823.
- 106.** Mayhar-Roemer, M., Katsen, A., Mestres, P., Roemer, K. (2001). Resveratrol induces colon tumor cell apoptosis independently of p53 and preceded by epithelial differentiation, mitochondrial proliferation and membrane potential collapse. *Int. J. Cancer.* 94(5): 615-622.
- 107.** Mayor-Oxilia, R. (2010). Estrés Oxidante y Sistema de Defensa Antioxidante. *Rev. Inst. Med. Trop.* 5(1): 23-29.
- 108.** McGehee, D.S. (2006). Nicotinic and opioid receptor interactions in nicotine addiction. *Mol. Interv.* 6(6): 311-314.
- 109.** Messina, E.S., Tyndale, R.F., Sellers, E.M. (1997). A major role of CYP2A6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282(3): 1608-1614.
- 110.** Miklos, G.L. Rubin, G.M. (1996). The role of the genome project in determining gene function: Insights from model organisms. *Cell.* 86(4): 521-529.
- 111.** Miller, E.C., Miller, J.A. (1981). Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer.* 47(10): 2327-2345.
- 112.** Mitrut, P., Burada, F.L., Aurelia, E., Scorei, R., Badea, D., Genunche, A., Dumitres, C., Rogo, Z., Mădălina, M. (2009). The genotoxicity study of resveratrol in primary gastric carcinoma cell cultures. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 50(3): 429-433.

- 113.** Moga, M., Bianca-Bosca, A., Soritău, U., Baciut, M., Lucaciu, O., Virag, P., Ilea, A., Dîrzu, N., Septimiu-Câmpian, R. (2016). Nicotine citotoxicity on the mesenchymal stem cells derived from human periodontium. *Romanian Biotechnological Letters*. 21(4): 11763-11772.
- 114.** Mohammadi-Bardbori, A., Bengtsson, J., Ranuug, U., Wincent, E. (2012). Quercetin, resveratrol and curcumin are indirect activators of the aryl hydrocarbon receptor (AHR). *Chem. Res. Toxicol.* 25(9): 1878-1884.
- 115.** Mohammed, B.R., Simon, M.K., Opara, M.N., Jegede, O.C., Agbede, R.I.S., Finn, R.D. (2017). Understanding the mechanisms involved in the regulation of cytochrome P450 gene expression in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Entomol. Ornithol. Herpetol.* 6(1): 1-6.
- 116.** Namasivayam, N. (2011). Chemoprevention in experimental animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1215(1): 60-71.
- 117.** NCBI. (2016). [En línea] 26 de diciembre de 2016. [Fecha de acceso: 26 de diciembre de 2016] Accesible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=drosophila+melanogaster>.
- 118.** OMIM (2016). [En línea] 27 de diciembre de 2016 [Fecha de acceso: 27 de diciembre de 2016] Accesible en:
http://omim.org/search?index=entry&sort=score+desc%2C+prefix_sort+desc&start=1&limit=10&search=drosophila+homologs.
- 119.** Osman, M., Abdel, M., Hadeel, M., Bayoumi, S., Zoheir, A., Mohamed, F. (2012). Modulation of doxorubicin cytotoxicity by resveratrol in human breast cancer cell line. *Cancer cell Int.* 4(1): 12-47.

- 120.** Pandey, U.B., Nichols, C.D. (2011). Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol. Rev.* 63(2): 411-436.
- 121.** Park, S.B., Jacob, P., Benowitz, N.L., Cashman, J.R. (1993). Stereoselective metabolism of (S)-(-) nicotine in humans: formation of trans- (S)-(-)- Nicotine N'-oxide. *Chem. Res. Toxicol.* 6(6): 880-888.
- 122.** Patterson, F., Benowitz, N.L., Shields, P., Hawk, L., Tyndale, R., Lerman, C. (2003). Toward personalized therapy for smoking cessation: A randomized placebo-controlled trial of bupropion. *Clin. Pharmacol. Ther.* 84(3): 320-235.
- 123.** Paul, H. (2010). An introduction to reactive oxygen species measurement of ROS in cells. BioTek instruments Inc. 10(1): 1-13.
- 124.** ^aPiver, B., Berthou, F., Dreano, Y., Lucas, D. (2004). Inhibition of CYP3A4, CYP1A1 and CYP2E1 activities by resveratrol and other non-volatile red wine components. *Toxicol. Lett.* 125(1): 83-91.
- 125.** ^bPiver, B., Fer, M., Vitrac, X., Merillon, J.M., Dreano, Y., Berthou, F., Lucas, D. (2004). Involvement of cytochrome P450 1A2 in the biotransformation of trans-resveratrol in human liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 68(4): 773-782.
- 126.** Primo-Yúfera, E. (1995). *Química orgánica básica y aplicada*. Ed. Reverté Barcelona, España. 878 Pp.
- 127.** Quillardet, P., De Bellecombe, C., Hofnung, M. (1985). The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: validation study with 83 compounds. *Mutat Res.* 147(1): 79-95.
- 128.** Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin. Interv. Aging.* 2(1): 219-236.

- 129.** Ramos, M.P. (1992). *Drosophila como sistema para detectar agentes genotóxicos. Serie los pequeños manuales*, Facultad de Ciencias, UNAM. 50 Pp.
- 130.** Reither, L.T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., Bier, E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* 11(6): 1114-1125.
- 131.** Repetto-Jiménez, M., Repetto-Kuhn, G. (2009). *Toxicología fundamental*. 4ª Edición. Madrid, España. 620 Pp.
- 132.** Revel, A., Raani, H., Younglai, E., Xu, J., Rogers, I., Han, R., Savouret, J.F., Caper, R.F. (2003). Resveratrol, natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects lung from DNA damage and apoptosis caused by benzo[a]pyrene. *J. Appl. Toxicol.* 23(1): 255-261.
- 133.** Rizzuto, R., Pinton, P., Ferrari, D., Chami, M., Szabadkai, G., Magalhães, P.J., Di Virgilio, F., Pozzan, T. (2003). Calcium and apoptosis: facts and hypotheses. *Oncogene.* 22(53): 8619-8627.
- 134.** Rodríguez-Arnaíz, R. (1991). Construcción de dos bases de datos para las pruebas mutagénicas (SLRLT y SCLT) de *Drosophila melanogaster*. Memorias del III Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Mutágenos y Carcinógenos Ambientales. Metepec, Puebla.
- 135.** Robert, E., King, J., Bomser, A., David, B. (2006). Bioactivity of resveratrol. *Comprehensive reviews in food science and food safety.* 5(1): 65-70.
- 136.** Rothfussa, A., Masamitu, H., Czichc, A., Marilyn, A.J., Burlinsone, B., Sheila, G., Shuichi, H., Kirklandh, D., Heflich, R.H., Howej, J., Madoka, N., O'Donovan, M., Plappert-Helbig, U., Priestley, C., Recio, L., Schuler, M., Uno, Y., Martus, H.J. (2011). Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: Combination of acute tests and integration into standard toxicity testing. *Mutat. Res.* 723(2): 108-120.

- 137.** Rotondo, S., Rajtar, G., Manarini, S., Celardo, A., Rotillo, D., De Gaetano, G., Evangelista, V., Cerletti, C. (1998). Effect of *trans*-resveratrol, a natural polyphenolic compound on human polymorphonuclear leukocyte function. *Br. J. Pharmacol.* 123(8): 1691-1699.
- 138.** Rubin, G.M., Yandell, M.D., Wortman, J.R., Gabor-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., Lemaître, 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.* 287(5461): 2204-2215.
- 139.** Safe, S., Wargovich, M.J., Lamartiniere, C.A., Mukhtar, H. (1999). Symposium on mechanisms of action of naturally occurring anticarcinogens. *Toxicol. Sci.* 52(1): 1-8.
- 140.** Sánchez-López, J.M. (2013). Evaluación de la posible actividad moduladora del resveratrol hacia el MMS, con SMART en ala de *Drosophila melanogaster* cruza bioactivación elevada. Tesis para obtener el grado de licenciatura en biología. FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.
- 141.** Sang, S., Yang, I., Buckley, B., Ho., C.T., Yang, C.S. (2007). Autoxidative quinone formation *in vitro* and metabolite formation *in vivo* from tea polyphenol (-)-epigallocatechin -3-gallate: studied by real-time mass spectrometry combined with tandem mass ion mapping. *Free Radic. Biol. Med.* 43(3): 362-371.

- 142.** Sanjay-Kumar, Erdal, E., James, A.S.III., Scissum-Gumm, K., Saldanha, S.N., Singh, U.P., Manne, U., Ponnazhagan, S., Mishra, M.K. (2017). Resveratrol induces mitochondria mediated, caspase-independent apoptosis in murine prostate cells. *Oncotarget*. 8(13): 20895-20908.
- 143.** Scott, M.D. (2002). *Toxicological summary for trans-resveratrol*. National Institute of environmental sciences. 501(36): 1-64 Pp.
- 144.** Schmitt, E., Lehmann, L., Metzler, M., Stopper, H. (2002). Hormonal and genotoxic activity of resveratrol. *Toxicol. Lett.* 136(2): 133-142.
- 145.** Schneider, Y., Vincent, F., Duranton, B., Badolo, L., Gosse, F., Bergmann, C., Seiler, N., Raul, F. (2000). Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. *Cancer Lett.* 158(1): 85-91.
- 146.** Sellers, E.M., Kaplan, H.L., Tyndale, R.F. (2000). Inhibition of cytochrome P450 2A6 increase nicotine's oral bioavailability and decreases smoking. *Clin. Pharmacol. Ther.* 68(1): 35-43.
- 147.** Shakibaei M, Harikumar K, Aggarwal B. (2009). Resveratrol addiction: to die or not to die. *Mol. Nutr Food Res.* 53(1):115-128.
- 148.** Sharma, S., Stutzman, J.D., Keloff, G.J., Steele, V.E. (1994). Screening potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res.* 54(22): 5848-5855.
- 149.** She, Q.B., Bode, A.M., Ma, W.Y., Chen, N.Y., Dong, Z.G. (2001). Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis in mediated extracellular-signal regulated protein kinases and p38 kinase. *Cancer Res.* 61(4): 1604-1610.

- 150.** Shigenaga, M.K., Trevor, A.J., Castagnoli, N. Jr. (1988). Metabolism-dependent covalent binding of (S)-[5-3H] nicotine to liver and lung microsomal macromolecules. *Drug Metab. Dispos.* 16(3): 397- 402.
- 151.** Shih, A., Davis, F.B., Lin, H.Y., Davis, P.J. (2002). Resveratrol induces apoptosis in thyroid cancer cell lines via MAPK – and P53 – dependent mechanism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87(3): 1223 – 1232.
- 152.** Silva-Calzada, J. (2013). Efecto modulador del resveratrol con el promutágeno uretano con SMART en ala de *Drosophila melanogaster*, cruza estándar (CE). Tesis para obtener el grado de licenciatura en biología. FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.
- 153.** Skibola, C.F., Smith, M.T. (2000). Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic. Biol. Med.* 29(4): 375-383.
- 154.** Soleas, G.J., Diamandis, E.P., Goldberg, D.M. (1997). Resveratrol: A molecule whose time has come? And gone? *Clin. Biochem.* 30(1): 91-113.
- 155.** Suenaga F, Hatsushika K, Takano S, Ando T, Ohnuma Y, Ogawa H, Nakao A. (2008). A possible link between resveratrol and TGF- β : Resveratrol induction of TGF- β expression and signaling. *FEBS Letters.* 582(5):586-90.
- 156.** Surh, Y.J., Hurh, Y.J., Kang, J. Y., Lee, E., Kong, G., Lee, S. J. (1999). Resveratrol, an antioxidant present in red wine, induces apoptosis in human promyelocitic leukemia (HL-60) cells. *Cancer Lett.* 140(2): 1-10.
- 157.** Tang, Y., Gao, C., Shi, Y., Zhu, L., Hu, X., Wang, D., Lu, Y., Yang, X., Liu, L., Yao, P. (2012). Quercetin attenuates ethanol-derived microsomal oxidative stress: implication of haem oxygenase-1 induction. *Food Chem.* 132(4): 1769-1774.

- 158.** Teaf, C., Middendorf, P. J. (2003). *Mutagenesis and Genetic Toxicology. Principles of toxicology: Environmental and industrial applications*. Ed. P. L. Williams, R. C. James & S. M. Roberts. Hoboken, N.J, USA. 239-265 Pp.
- 159.** Toloï, T., Stocco, B., Toledo, K., Salvador, M., Paulo, M., Koyama, N., Regina, M., (2012). Dose-dependent effect of resveratrol on bladder cancer cells: Chemoprevention and oxidative stress. *Maturitas*. 72(1): 72-78.
- 160.** Trivedi, A. H., Dave, B. J., Adhvaryu, S. G. (1990). Assesment of genotoxicity of nicotine employing *in vitro* mammalian test system. *Cancer Lett.* 54(1): 89-94.
- 161.** Vázquez, C.B., Bautista, P.M., Segura, C.D., Barral, C.J. (2008). *Farmacología general, principios básicos*. 1ª. Ed. UNAM FES-I. Tlalnepantla de Baz, México. 71-83.Pp.
- 162.** Vázquez-Gómez, G., Sánchez-Santos, A., Vázquez-Medrano, J., Quintanar-Zúñiga, R., Monsalvo-Reyes, A.C., Piedra-Ibarra, E., Dueñas-García, I.E., Castañeda-Partida, L., Graf, U., Heres-Pulido, M.E. (2010). Sulforaphane modulates de expression of *Cyp6a2* and *Cyp6g1* in larvae of the ST and HB crosses of the *Drosophila* wing spot test and is genotoxic in the ST cross. *Food Chem Toxicol.* 48(1): 3333-3339.
- 163.** Venereo-Gutiérrez, J.R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev. Cub. Med. Mil.* 31(2): 126-133.
- 164.** Vogel, E.W. (1991). Genotoxic chemicals. An introduction into basic principles of genetic toxicology. Sylvius Lab, Holanda. 66 Pp.
- 165.** Vogel, E.W., Graf, U., Frei, H., Nivard, M.J. (1999). The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. *IARC. Sci. Pub.* 146(1): 427-470.

- 166.** Xu, C., Li, C., Kong, A. (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch. Pharm. Res.* 28(1): 249-268.
- 167.** Würgler, F.E., Sobels, F.H., Vogel, E.W. (1977). *Drosophila* as assay system for detecting genetic changes. Handbook of mutagenicity test procedures. Elsevier Science. Amsterdam, Holland. 335-373.
- 168.** Wyatt, M.D., Pittman, D.L. (2006). Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chem. Res. Toxicol.* 19(12): 1580-1594.
- 169.** Yamamoto, T., Pierce, W.M., Hurst Jr., Chen, H.E., Wadell, W.J. (1990). Ethyl carbamate metabolism: *in vivo* inhibitors and *in vitro* enzymatic systems. *Drug Metab. Dispos.* 18(3): 276-280.
- 170.** Yamamoto, I., Casida, J.E. (1999). Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor. Tokyo, Japan. Springer.
- 171.** 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. *Mutat. Res.* 721(2): 171-177.
- 172.** Yang, J., McCart, C., J-Woods, D., Terhzas, S., G-Greenwood, K., Ffrench-Constant, R., Dow, J. (2007). A *Drosophila* systems approach to xenobiotic metabolism. *Physiol. Genomics.* 30(3): 223-231.
- 173.** Yang, Y.M., Noh, K., Han, C.Y., Kim, S.G. (2010). Transactivation of genes encoding for phase II enzymes and Phase III transporters by phytochemical antioxidants. *Molecules.* 15(9): 6332-6348.

- 174.** Yu Chao, C., Fu-Mei, H., Kuo-Wei, T., Li-Chiu, Y., Ming-Yung, C. (2002). Mechanisms of cytotoxicity of nicotine in human periodontal ligament fibroblast cultures *in vitro*. *J. Periodontal Res.* 37(4): 279-285.
- 175.** Zhou, S., Chan, E., Li, X., Huang, M. (2005). Clinical outcomes and management of mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4. *Ther. Clin. Risk Manag.* 1(1): 3-13.
- 176.** Zijlstra, M., Li, E., Sajjadi, F., Subramani, S., Jaenisch, R. (1989). Germ-line transmission of a disrupted beta-2-microglobulin gene produced by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature.* 342(1): 435-438.

17.- Anexo 1

Tabla 2. Resultados completos obtenidos para la cruce HB en el ensayo en ala de *D. melanogaster* con el programa SMART 2.1.

Tratamiento	Número de individuos	Número de clones por individuo diagnóstico estadístico												
		Clones Pequeños (1-2 células) m=2		Clones Grandes (> 2 células) m=5		Clones Gemelos m=5		Clones Totales m=2		Clones <i>mwh</i>				
A. Controles negativos.														
Agua Milli-Q	61	0.66	(36)		0.07	(4)		0	(0)		0.72	(44)		44
EtOH [2%]	60	0.60	(40)	-	0.08	(5)	-	0	(0)	-	0.68	(41)	-	40
B. Control positivo: URE [20 mM]														
Agua Milli-Q	61	0.66	(40)		0.07	(4)		0	(0)		0.72	(44)		44
URE [20 mM]	23	2.52	(58)	+	0.39	(9)	+	0.17	(4)	+	3.09	(71)	+	71
C. Agua Milli-Q vs NIC [12.5, 25 y 50 µM]														
Agua Mili-Q	61	0.66	(40)		0.07	(4)		0	(0)		0.72	(44)		44
NIC [12.5 µM]	60	0.68	(41)	-	0.05	(3)	-	0.02	(1)	-	0.75	(45)	-	42
NIC [25 µM]	60	0.65	(39)	-	0.03	(2)	-	0	(0)	-	0.68	(41)	-	41
NIC [50 µM]	60	0.77	(46)	-	0.08	(5)	-	0	(0)	-	0.85	(51)	-	51
D. EtOH [2%] vs RES [11 µM].														
EtOH [2%]	60	0.60	(36)		0.08	(5)		0	(0)		0.68	(41)		40
RES [11µM]	60	0.73	(44)	-	0.07	(4)	-	0.02	(1)	-	0.82	(49)	-	48
E. Co-tratamientos: EtOH [2%] vs NIC + RES [11µM].														
EtOH [2%]	60	0.60	(36)		0.08	(5)		0	(0)		0.68	(41)		40
NIC [12.5 µM] + RES	67	0.54	(36)	-	0	(0)	-	0.04	(1)	-	0.75	(45)	-	42
NIC [25 µM] + RES	59	0.68	(40)	-	0.07	(4)	-	0	(0)	-	0.68	(41)	-	41
NIC [50 µM] + RES	57	0.63	(36)	-	0.05	(3)	-	0	(0)	-	0.85	(51)	-	51
F. Co-tratamientos: RES [11 µM] vs NIC + RES.														
RES [11 µM]	60	0.73	(44)		0.07	(4)		0.02	(1)		0.82	(49)		48
NIC [12.5 µM] + RES	67	0.54	(36)	-	0	(0)	-	0.04	(1)	-	0.75	(45)	-	42
NIC [25 µM] + RES	59	0.68	(40)	-	0.07	(4)	-	0	(0)	-	0.68	(41)	-	41
NIC [50 µM] + RES	57	0.63	(36)	-	0.05	(3)	-	0	(0)	-	0.85	(51)	-	51
G. Co-tratamientos: NIC [12.5 µM] vs NIC [12.5 µM] + RES [11 µM].														
NIC [12.5 µM]	60	0.68	(41)		0.05	(3)		0.02	(1)		0.75	(45)		42
NIC [12.5 µM] + RES	67	0.54	(36)	-	0	(0)	-	0.04	(1)	-	0.75	(45)	-	42
H. Co-tratamientos: NIC [25 µM] vs NIC [25 µM] + RES [11 µM].														
NIC [25 µM]	60	0.65	(39)		0.03	(2)		0	(0)		0.68	(41)		41
NIC [25 µM] + RES	59	0.68	(40)	-	0.07	(4)	-	0	(0)	-	0.68	(41)	-	41
I. Co-tratamientos: NIC [50 µM] vs NIC [50 µM] + RES [11 µM].														
NIC [50 µM]	60	0.77	(46)		0.08	(5)		0	(0)		0.85	(51)		51
NIC [50 µM] + RES	57	0.63	(36)	-	0.05	(3)	-	0	(0)	-	0.85	(51)	-	51

*Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988) por medio de una prueba estadística de una cola. Donde: m = factor de multiplicación para evaluar los resultados: - = Negativo, + = Positivo ($p < 0.05$).

Tabla 3. Comparación y análisis de la distribución acumulada del tamaño de clones *mwh* de los controles y tratamientos para la cruz HB. Resultados con base a la prueba K-S ($p < 0.05$).

Experimento	Control vs tratamiento		p - level	Diagnóstico
Agua Milli-Q vs EtOH	Agua Milli-Q	EtOH [2%]	$p < 0.005$	+
Agua Milli-Q vs URE	Agua Milli-Q	URE [20 mM]	$p < 0.001$	+
Agua Milli-Q vs NIC	Agua Milli-Q	NIC [12.5 μ M]	$p > 0.10$	ns
	Agua Milli-Q	NIC [25 μ M]	$p < 0.005$	+
	Agua Milli-Q	NIC [50 μ M]	$p < 0.005$	+
URE [20 mM] vs NIC	URE [20 mM]	NIC [12.5 μ M]	$p < 0.001$	+
	URE [20 mM]	NIC [25 μ M]	$p < 0.001$	+
	URE [20 mM]	NIC [50 μ M]	$p < 0.005$	+
EtOH vs RES	EtOH [2%]	RES [11 μ M]	$p < 0.005$	+

Dónde: ns = No significativo, + = Significativo.

Tabla 4. Resultados completos obtenidos para la cruce ST en el ensayo en ala de *D. melanogaster* con el programa SMART 2.1.

Tratamiento	Número de individuos	Número de clones por individuo diagnóstico estadístico												
		Clones Pequeños (1-2 células) m=2		Clones Grandes (> 2 células) m=5		Clones Gemelos m=5		Clones Totales m=2		Clones <i>mwh</i>				
A. Controles negativos.														
Agua Milli-Q	40	0.73	(29)		0.03	(1)		0	(0)		0.75	(30)		30
EtOH [2%]	88	0.66	(58)	-	0.33	(29)	+	0.01	(1)	-	1	(88)	-	88
B. Control positivo.														
Agua Milli-Q	40	0.73	(29)		0.03	(1)		0	(0)		0.75	(30)		30
URE [20 mM]	28	1.21	(34)	+	0.11	(3)	+	0.04	(1)	-	1.36	(38)	+	38
C. Agua Milli-Q vs NIC [12.5, 25 y 50 µM].														
Agua Mili-Q	40	0.73	(29)		0.03	(1)		0	(0)		0.75	(30)		30
NIC [12.5 µM]	44	1.16	(51)	+	0.43	(19)	+	0	(0)	-	1.59	(70)	+	70
NIC [25 µM]	41	0.66	(27)	-	0	(0)	-	0.02	(1)	-	0.68	(28)	-	28
NIC [50 µM]	21	0.67	(14)	-	0.1	(2)	-	0.05	(1)	-	0.81	(17)	-	17
D. EtOH [2%] vs RES [11 µM].														
EtOH [2%]	88	0.66	(58)		0.33	(29)		0.01	(1)		1	(88)		88
RES [11µM]	99	0.58	(57)	-	0.05	(5)	-	0.04	(4)	-	0.67	(66)	-	66
E. Co-tratamientos: EtOH [2%] vs NIC + RES [11µM].														
EtOH [2%]	88	0.66	(58)		0.33	(29)		0.01	(1)		1	(88)		88
NIC [12.5 µM]+ RES	40	0.73	(29)	-	0	(0)	-	0	(0)	-	0.73	(29)	-	29
NIC [25 µM] + RES	49	0.96	(47)	+	0.27	(13)	-	0	(0)	-	1.22	(60)	-	59
NIC [50 µM] + RES	53	0.62	(33)	-	0.04	(2)	-	0	(0)	-	0.66	(35)	-	35
F. Co-tratamientos: RES [11 µM] vs NIC + RES.														
RES [11 µM]	99	0.58	(57)		0.05	(5)		0.04	(4)		0.67	(66)		66
NIC [12.5 µM]+ RES	40	0.73	(29)	-	0	(0)	-	0	(0)	-	0.73	(29)	-	29
NIC [25 µM] + RES	49	0.96	(47)	+	0.27	(13)	+	0	(0)	-	1.22	(60)	+	59
NIC [50 µM] + RES	53	0.62	(33)	-	0.04	(2)	-	0	(0)	-	0.66	(35)	-	35
G. Co-tratamientos: NIC [12.5 µM] vs NIC [12.5 µM] + RES [11 µM].														
NIC [12.5 µM]	44	1.16	(51)		0.43	(19)		0	(0)		1.59	(70)		70
NIC [12.5 µM]+ RES	40	0.73	(29)	↓	0	(0)	↓	0	(0)	-	0.73	(29)	↓	29
H. Co-tratamientos: NIC [25 µM] vs NIC [25 µM] + RES [11 µM].														
NIC [25 µM]	41	0.66	(27)	-	0	(0)	-	0.02	(1)	-	0.68	(28)	-	28
NIC [25 µM] + RES	49	0.96	(47)	+	0.27	(13)	+	0	(0)	-	1.22	(60)	+	59
I. Co-tratamientos: NIC [50 µM] vs NIC [50 µM] + RES [11 µM].														
NIC [50 µM]	21	0.67	(14)	-	0.1	(2)	-	0.05	(1)	-	0.81	(17)	-	17
NIC [50 µM] + RES	53	0.62	(33)	-	0.04	(2)	-	0	(0)	-	0.66	(35)	-	35

*Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würigler (1988) por medio de una prueba estadística de una cola. Donde: m = factor de multiplicación para evaluar los resultados: (-) = Negativo, (+) = Positivo, (↓) = Diferencia significativa hacia abajo ($p < 0.05$).

Tabla 5. Comparación y análisis de la distribución acumulada del tamaño de clones *mwh* de los controles y tratamientos para la cruz ST. Resultados con base a la prueba K-S ($p < 0.05$).

Experimento	control vs tratamiento		p - level	Diagnóstico
Agua Milli-Q vs EtOH	Agua Milli-Q	EtOH [2%]	$p < 0.005$	+
Agua Milli-Q vs URE	Agua Milli-Q	URE [20 mM]	$p < 0.001$	+
Agua Milli-Q vs NIC	Agua Milli-Q	NIC [12.5 μ M]	$p < 0.001$	+
	Agua Milli-Q	NIC [25 μ M]	$p < 0.001$	+
	Agua Milli-Q	NIC [50 μ M]	$p < 0.001$	+
URE [20 mM] vs NIC	URE [20 mM]	NIC [12.5 μ M]	$p < 0.005$	+
	URE [20 mM]	NIC [25 μ M]	$p < 0.005$	+
	URE [20 mM]	NIC [50 μ M]	$p < 0.001$	+
EtOH vs RES	EtOH [2%]	RES [11 μ M]	$p < 0.005$	+

Donde: ns = No significativo, + = Significativo.

18.- Anexo 2

18.1.- *Drosophila melanogaster*

En la caracterización de un organismo como modelo biológico está implícito el supuesto de que, al conocer su biología, éste pueda al menos en parte explicar la de otros seres vivos. Al estudiar procesos como el desarrollo y compararlo en diferentes organismos se puede encontrar que existen genes altamente conservados en organismos muy distantes desde el punto de vista evolutivo (Miklos y Rubin, 1996).

D. melanogaster (Figura 20) es un organismo cosmopolita que comparte los mismos ambientes con el hombre (Würgler *et al.*, 1977), debido que cuenta con un genoma completamente secuenciado es un excelente modelo para realizar estudios referentes a procesos genéticos (mutaciones puntuales, pérdida de cromosomas, no disyunción, recombinación, deleciones, inserciones, translocaciones, inducción de genes letales, etc.) (Würgler *et al.*, 1977; Zijlstra, 1989; Vogel *et al.*, 1999) por eso ha sido empleado como organismo modelo en la genética (Rodríguez-Arnaiz, 1991; Ramos, 1992).

Además, desempeña un papel importante dentro de la TG y ha servido para investigar una gran diversidad de agentes químicos, mutagénicos y recombinogénicos (Würgler *et al.*, 1977). Cuenta con una gran cantidad de mutantes con los que se puede realizar diferentes protocolos, además de ofrecer la posibilidad de realizar pruebas tanto en células somáticas como germinales (Vogel *et al.*, 1999). También presenta la ventaja de poseer las enzimas dependientes del Cyp450s para activar metabólicamente una gran cantidad de promutágenos y precarcinógenos, y estas funciones son equivalentes a las que realiza la fracción microsomal de hígado humano (Arinç *et al.*, 1991).

Otras ventajas que presenta como modelo biológico son es un organismo pequeño y es un eucarionte holometábolo. Además es posible realizar experimentos con el organismo intacto, es decir *in vivo* (Rodríguez-Arnaiz, 1991; Ramos, 1992). Esto representa diversas ventajas tomando en cuenta que aspectos cruciales como las interacciones con el ambiente o los contactos célula-célula no pueden entenderse cuando se trabaja con modelos *in vitro* (Rodríguez-Arnaiz, 1991; Ramos, 1992).

Tabla 6. Taxonomía de *D. melanogaster*

Reino	<i>Animalia</i>
Phylum	<i>Arthropoda</i>
Clase	<i>Insecta</i>
Orden	<i>Dípera</i>
Suborden	<i>Brachycera</i>
Familia	<i>Drosophilidae</i>
Subfamilia	<i>Drosophilinae</i>
Género	<i>Drosophila</i>
Subgénero	<i>Sophophora</i>
Especie	<i>D. melanogaster</i>

(Meigen, 1830).



Figura 20. Ejemplar de *D. melanogaster*

En *D. melanogaster* existe un dimorfismo sexual (Figura 21) que consiste en que la hembra es de mayor tamaño que el macho y presenta 8 segmentos abdominales, el macho también tiene los 8 segmentos con la diferencia de que los últimos tres segmentos se encuentran fusionados y melanizados (Castañeda *et al.*, 2008).

Otra diferencia es que los machos presentan en la articulación basal del tarso del primer par de patas unas estructuras denominadas peines sexuales que son un grupo de aproximadamente diez cerdas las cuales ayudan al macho a sujetar a la hembra durante la cópula (Castañeda *et al.*, 2008).



Figura 21. Dimorfismo sexual en *D. melanogaster* (hembra: izquierda, macho: derecha). Tomado de: <https://insolitanaturaleza.blogspot.mx/2013/06/mosca-del-vinagro-o-mosca-de-la-fruta.html>.

18.2.- Ciclo de vida

El ciclo de vida de *D. melanogaster* (Figura 22) ofrece una gran ventaja en la investigación científica ya que 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 condiciones de $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ y 65 % de HR hasta dos semanas a 21 °C (Dueñas *et al.*, 2001). El ciclo inicia con la ovoposición de la hembra, donde una hembra puede depositar entre 600 y 800 huevos en sus 40-60 días de vida. Después de 24 h eclosionan las larvas de 1er estadio que pasan por dos estadios más de 24 y 48 h respectivamente (Castañeda *et al.*, 2008).

Durante la fase larvaria la ingesta de alimento es continua, llegando a consumir entre 3 y 5 veces su propio peso corporal incrementándolo de 0.5 a 2 mg (Castañeda *et al.*, 2008). A los 5 días la larva entra en pupa y se inicia la metamorfosis, y las estructuras adultas se formarán principalmente a través de la reorganización de los discos imaginales (Amorós, 2001).

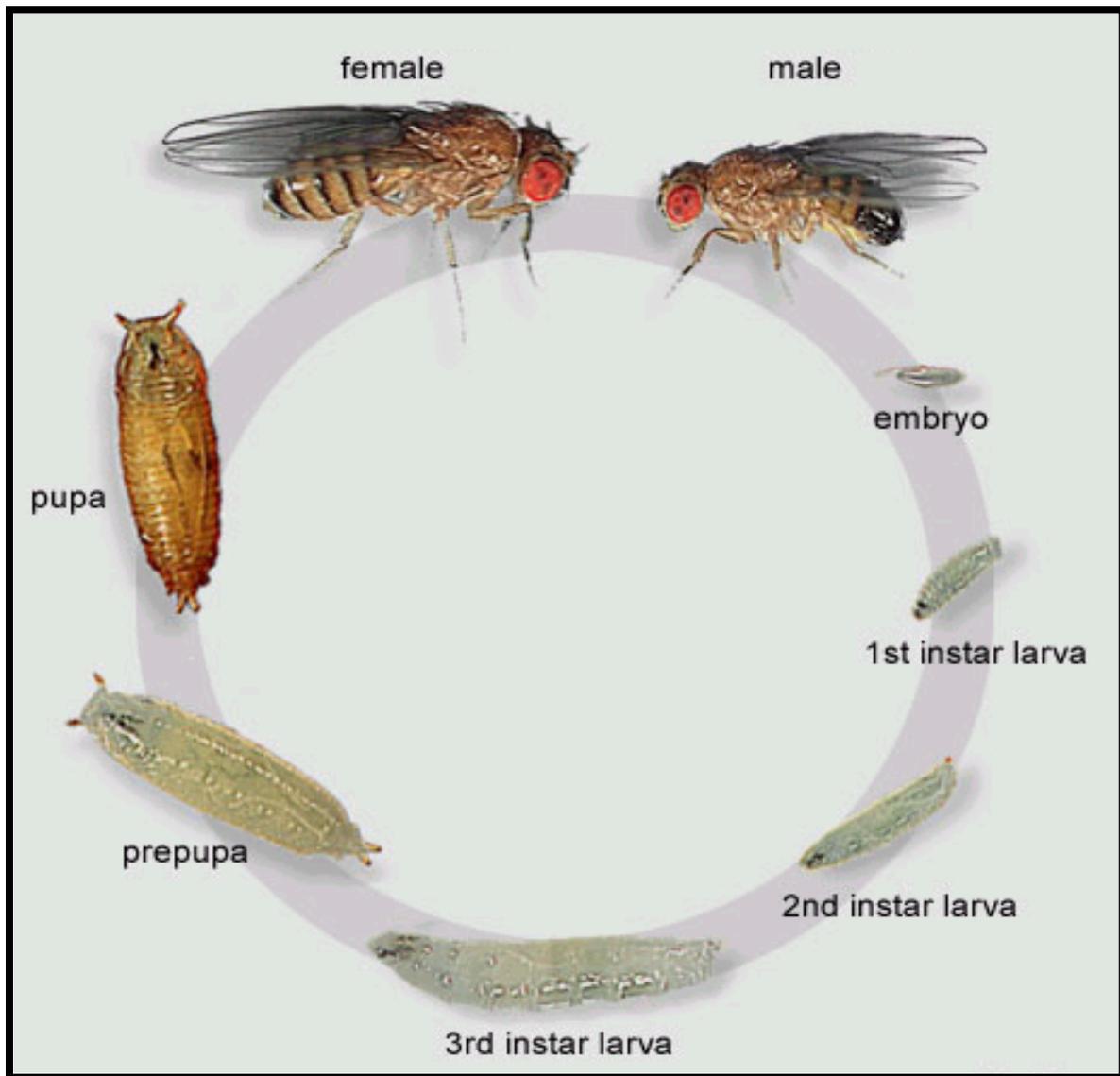


Figura 22. Ciclo de vida de *D. melanogaster* tomado de: <https://pendientedemigracion.ucm.es/info/genetica/grupod/Genenzima/Genenzima.htm>

18.3.- Cromosomas de *D. melanogaster*

D. melanogaster es un organismo eucarionte pluricelular con cuatro pares de cromosomas que se dividen en: los cromosomas sexuales Y (submetacéntrico) y X (acrocéntrico), los cromosomas 2 y 3 (metacéntricos) y el cromosoma 4 que tiene forma de un punto (Figura 23) (Castañeda *et al.*, 2008).

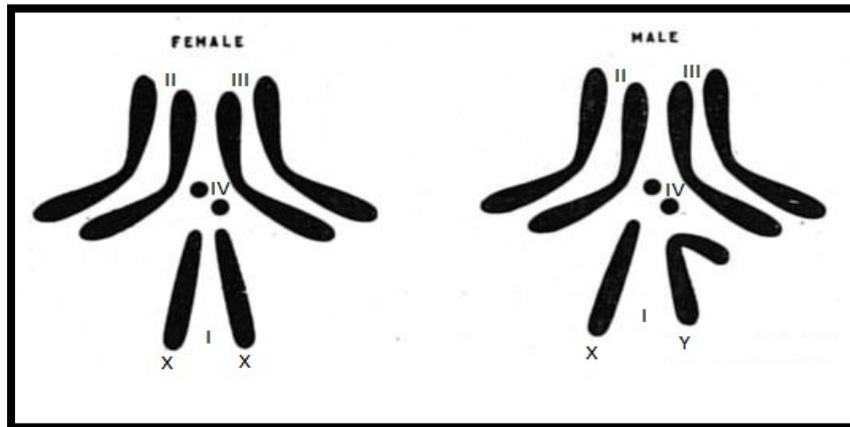


Figura 23. Cromosomas de *D. melanogaster*. Tomado de: https://en.wikisource.org/wiki/A_Critique_of_the_Theory_of_Evolution/III#/media/File:Critique_of_the_Theory_of_Evolution_Fig_052.jpg

Por último, otra ventaja de *D. melanogaster* como modelo biológico es que cuenta con un genoma totalmente secuenciado (Adams *et al.*, 2000), que codifica 17,250 genes en cuatro cromosomas de los cuales tres de ellos llevan la mayor parte el genoma (NCBI, 2016). Se han determinado 177 genes que son ortólogos de 289 genes humanos (Rubin *et al.*, 2000) y se han encontrado 548 secuencias únicas que son complementarias (Reither *et al.*, 2001).

Se han encontrado 714 genes que codifican enfermedades en humanos (Reither *et al.*, 2001) y que se han compilado en el sitio; Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) al compararlos con el genoma completo de *Drosophila* se obtuvo que de 911 *loci* humanos de enfermedades, 666 *loci* de *Drosophila* eran complementarios (Reither *et al.*, 2001).

Además, la identidad global a nivel de nucleótidos o de secuencia de proteínas entre *Drosophila* y los mamíferos es de alrededor del 40% de homologías, sin embargo para los dominios funcionales puede ser de entre el 80% y el 90% (Pandey, 2011).

19.1.- Prueba de Mutación y Recombinaciones Somáticas (SMART)

Los bioensayos con *D. melanogaster* han resultado ser de los más sensibles y de amplio rango en la detección de daño genético inducido, permitiendo detectar efectos a nivel somático (carcinogénesis), germinal (mutagénesis) y/o a lo largo del desarrollo embrionario (teratogénesis) (Gaytán, 2006). Además de que la variabilidad genética con respecto al MX es un fenómeno bien conocido en *Drosophila*, y como consecuencia de ello la inducción de daño genético por genotoxinas que requieren ser transformadas, muestra ser dependiente del fenotipo en esta especie (Frölich y Würigler, 1990).

Una de las pruebas que se han implementado con este organismo para la detección de genotoxinas, tanto de acción directa como indirecta es la prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART) (Gaytán, 2006).

SMART ha sido reconocido como ideal para realizar investigación (Vogel *et al.*, 1999) debido a que los tratamientos se hacen *in vivo* y porque en el tejido graso de las larvas así como en los túbulos de malpigio se presentan las funciones enzimáticas que se efectúan en hepatocitos humanos (Graf *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2007). SMART determina la genotoxicidad de agentes químicos, por medio del uso de marcadores genéticos recesivos que afectan los discos imaginales, y se expresan debido a la pérdida de heterocigosis, de modo que el daño se induce en las células de las larvas y se manifiesta en el cuerpo diferenciado del adulto, esto permite una detección sencilla del cambio genético producido (Graf *et al.*, 1984; Heres *et al.*, 2010).

Los marcadores genéticos utilizados son llamados: multiple wing hairs (*mwh*) (Figura 24) y flare (*flr³*) (Figura 25), además se puede cuantificar el tamaño de una mancha y ésta nos proporcionará información sobre la temporalidad del evento genotóxico, reconociéndose de esta manera:

- 1) manchas grandes, producidas por el daño temprano en la división de las células del disco imaginal de las larvas.
- 2) manchas pequeñas producidas por un daño tardío. Por lo que esta prueba permite determinar varios eventos genéticos como: aneuploidías mutaciones puntuales, deleciones y recombinación somática (Graf *et al.*, 1984; Heres *et al.*, 2010).

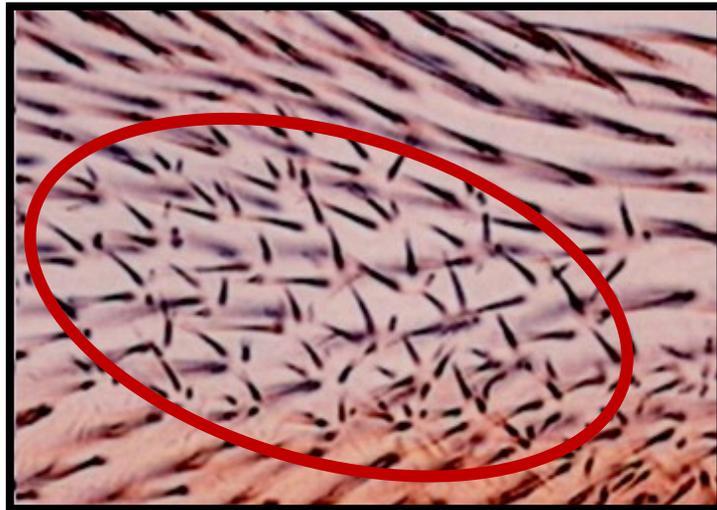


Figura 24. Marcador *mwh*

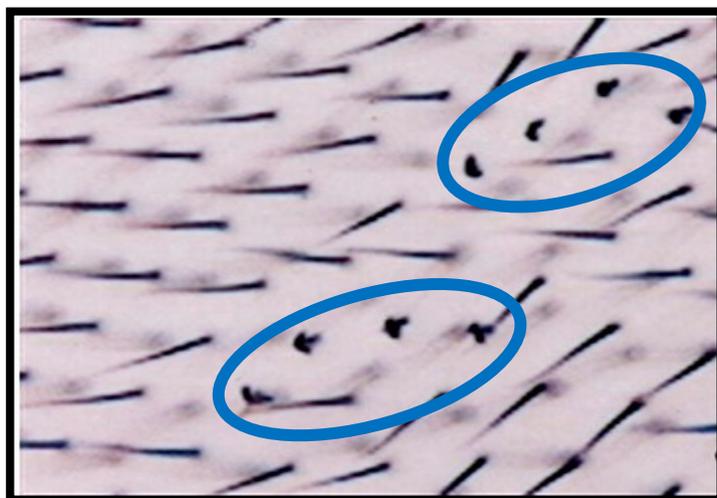


Figura 25. Marcador *flr³*

SMART hace uso de tres cepas mutantes con marcadores recesivos que son:

- Ceba *mwh/mwh* (multiple wing hair). Porta una mutación autosómica recesiva ubicada en el brazo izquierdo (RL) del cromosoma 3 a 0.3 unidades de mapa. En homocigosis total tiene una expresión fenotípica de tricomas múltiples en vez de uno solo como sucede con la cepa silvestre (Graf *et al.*, 1984).
- Ceba *flr³/TM3 Bd^{ser}* (flare) que presenta una mutación autosómica recesiva que se localiza en el RL del cromosoma 3 a 38.8 unidades de mapa. La expresión fenotípica son tricomas mal formados o en forma de rosetas 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^{ser}*) el cual se expresa fenotípicamente por la presencia de muescas en el ala (Graf *et al.*, 1998).
- Ceba Oregon-flare (*ORR(1);ORR(2); flr³/TM3 Bd^{ser}*) presenta mutaciones en los cromosomas 1 y 2 de la cepa Oregon OR (R) resistente a DDT que provoca la inducción constitutiva de una proteína inductora de los genes *Cyp6a8* y *Cyp6a9* del cromosoma 1 y *Cyp6a2* del cromosoma 2, esto le confiere altos niveles de *Cyp450s*.

Con las 3 cepas anteriores se realizan las cruces utilizando machos de la cepa *mwh* y hembras de las cepas Oregon flare. Para realizar la cruce HB se cruzan machos con fenotipo *mwh/mwh* con hembras vírgenes de fenotipo (*ORR(1);ORR(2); flr³/TM3 Bd^{ser}* y como resultado de tal cruce obtendremos en la primera generación organismos trans-heterocigotos de fenotipo silvestre: *ORR(2); mwh flr³/ mwh flr³* organismos con fenotipo Serratia: *ORR(2); mwh flr³/ TM3 Bd^{ser}* (Figura 26).

Y para realizar la cruce ST se cruzan machos con fenotipo *mwh/mwh* con hembras vírgenes de fenotipo *flr³/TM3 Bd^{ser}* como resultado de tal cruce obtendremos en la primera generación organismos *trans*-heterocigotos de fenotipo silvestre *mwh flr³/ mwh flr³* y organismos de fenotipo Serratia: *mwh flr³/ TM3 Bd^{ser}* (Figura 26).

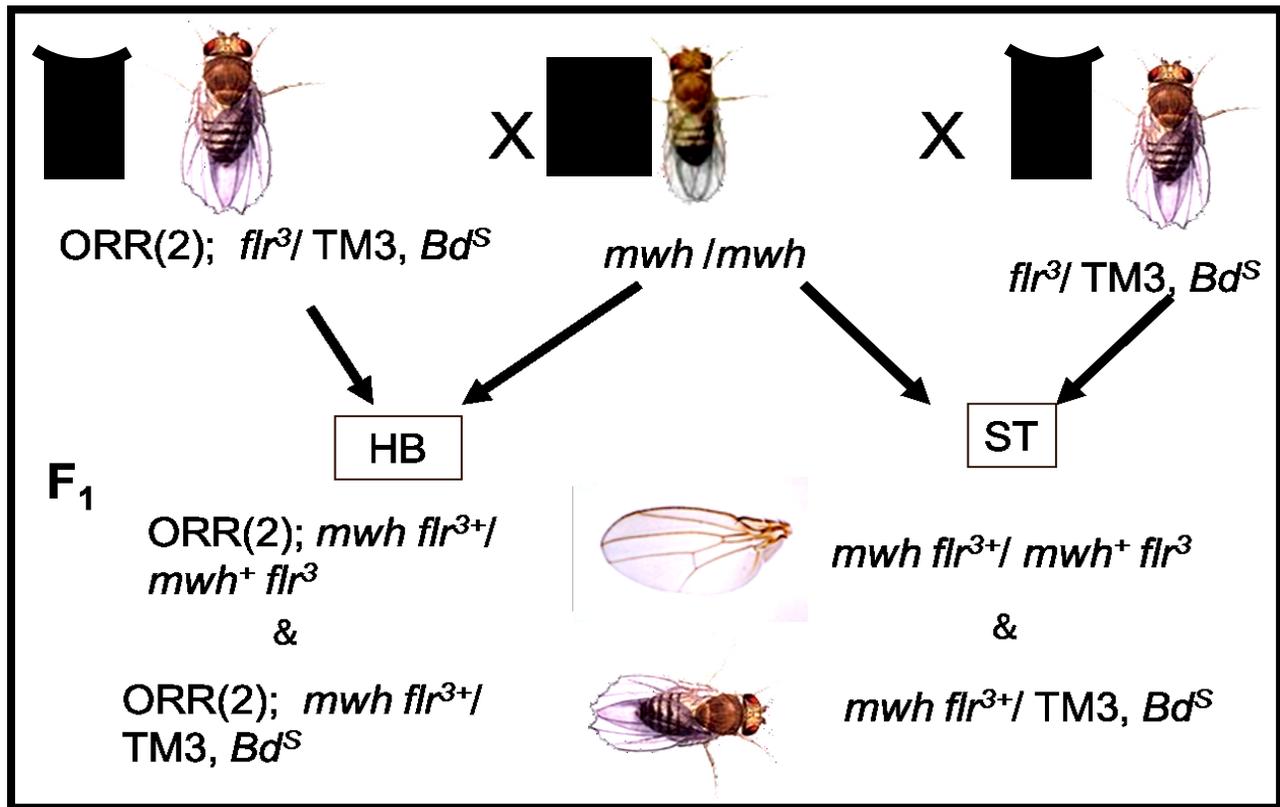


Figura 26. Obtención de las cruces HB y ST

Por último, SMART permite reconocer distintos tipos de clones de los marcadores genéticos *mwh* y *flr³* generados por la pérdida de heterocigosis de los mismos. En caso de que no haya ocurrido dicha pérdida, se obtiene la expresión de un tricoma normal (Figura 27). En cambio, si ocurre un evento de no disyunción (Figura 28) obtendremos como resultado una mancha o clon *mwh* pequeña. En cuanto a las manchas grandes, no es posible saber específicamente que evento la generó ya que pueden deberse a un evento de mutación puntual (Figura 29), delección (Figura 30) o recombinación distal al centrómero (Figura 31). Por último, las manchas gemelas sólo son posibles debido a un evento de recombinación cercana al centrómero (Figura 32).

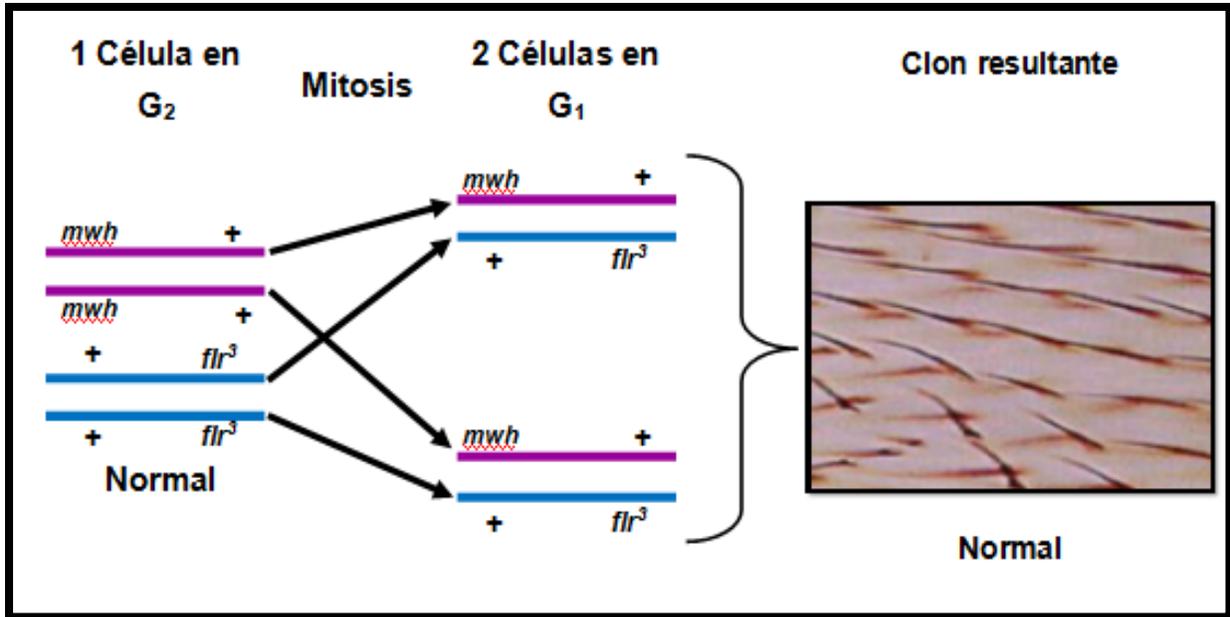


Figura 27. Evento genético que genera células normales.

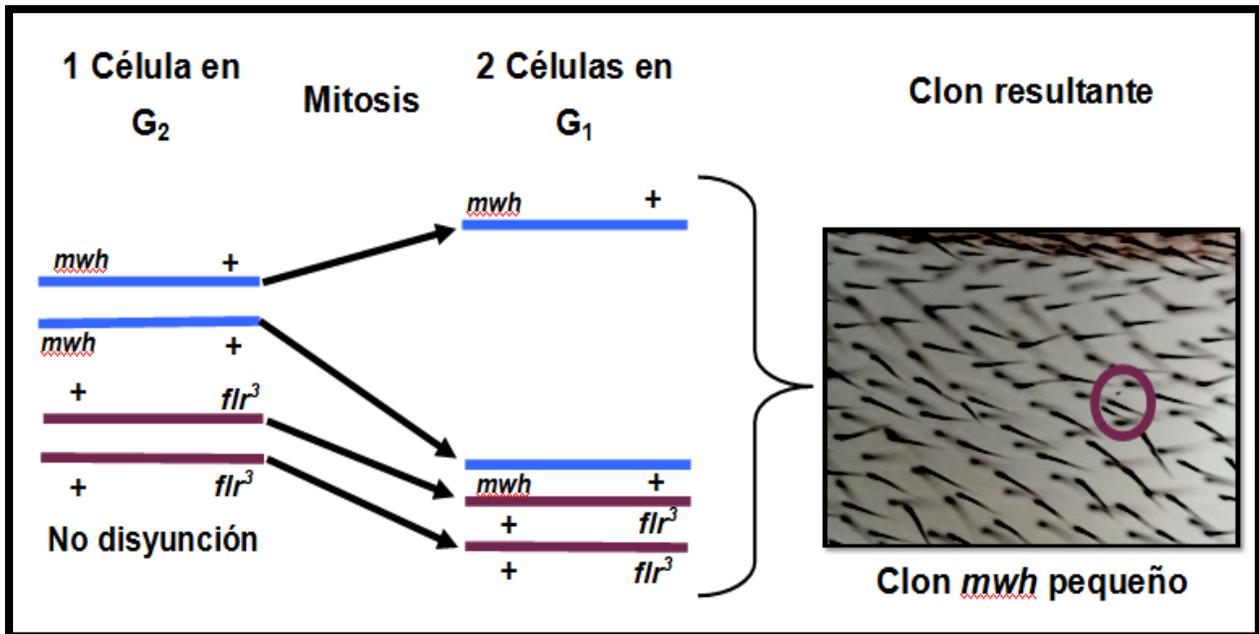


Figura 28. Evento genético (no disyunción) que genera pérdida de heterocigosis de los marcadores *mwh* y *flr*³.

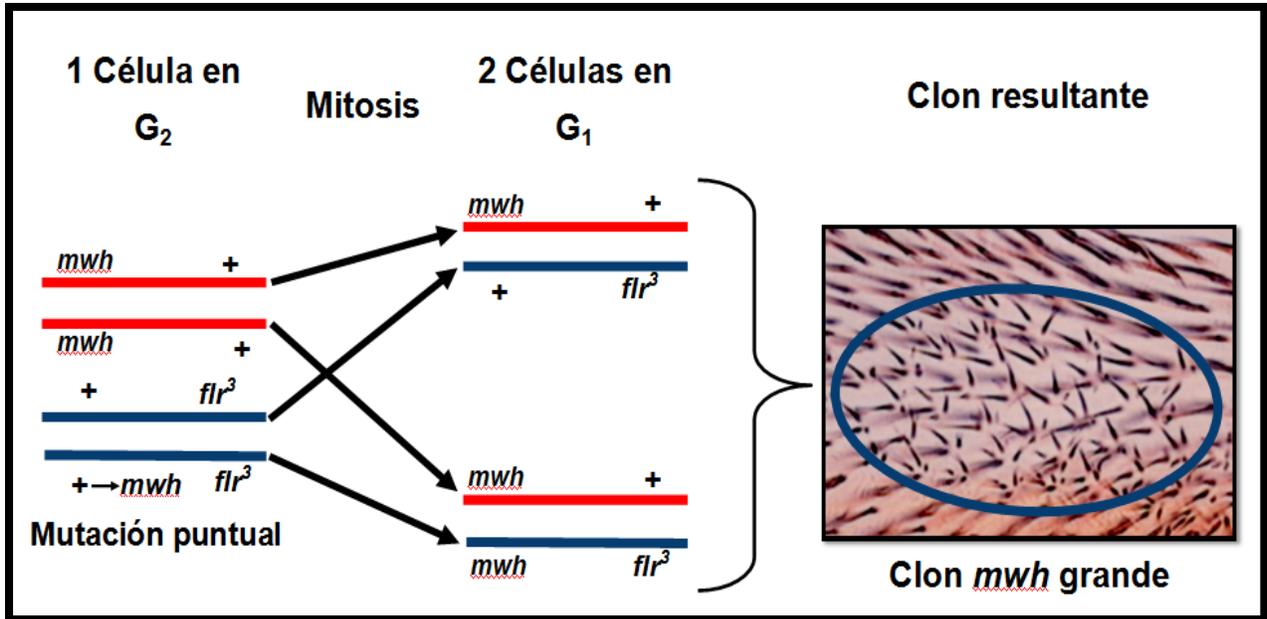


Figura 29. Evento genético (mutación puntual) que genera pérdida de heterocigosis de los marcadores *mwh* y *flr³*.

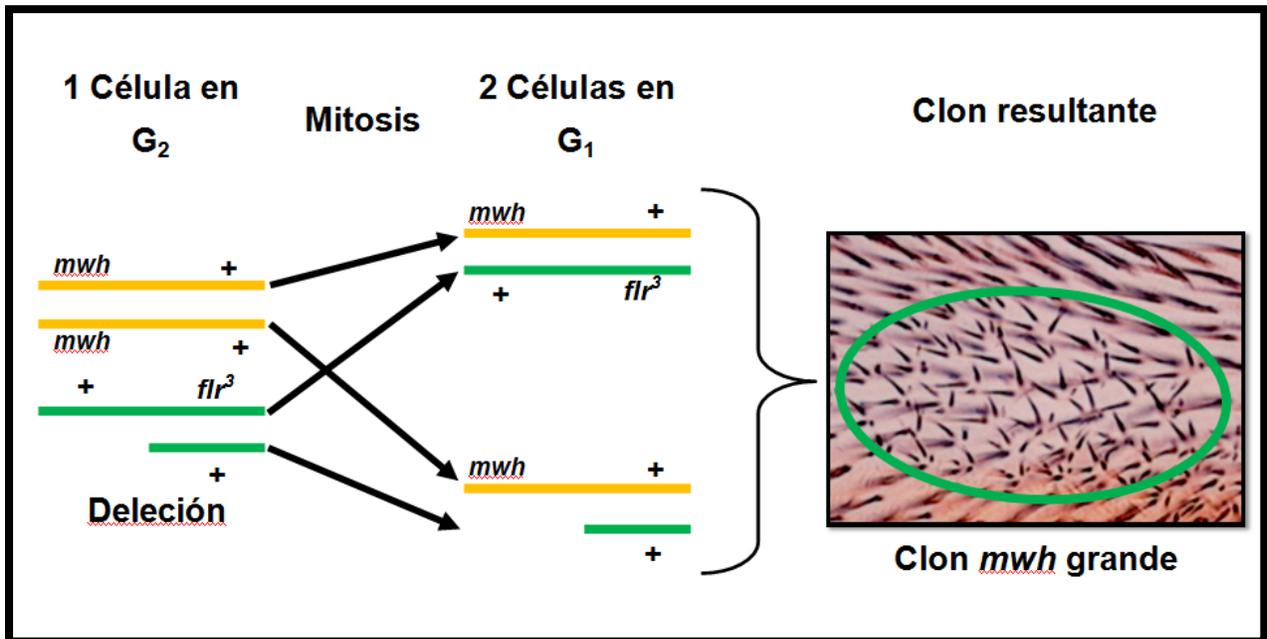


Figura 30. Evento genético (delección) que genera pérdida de heterocigosis de los marcadores *mwh* y *flr³*.

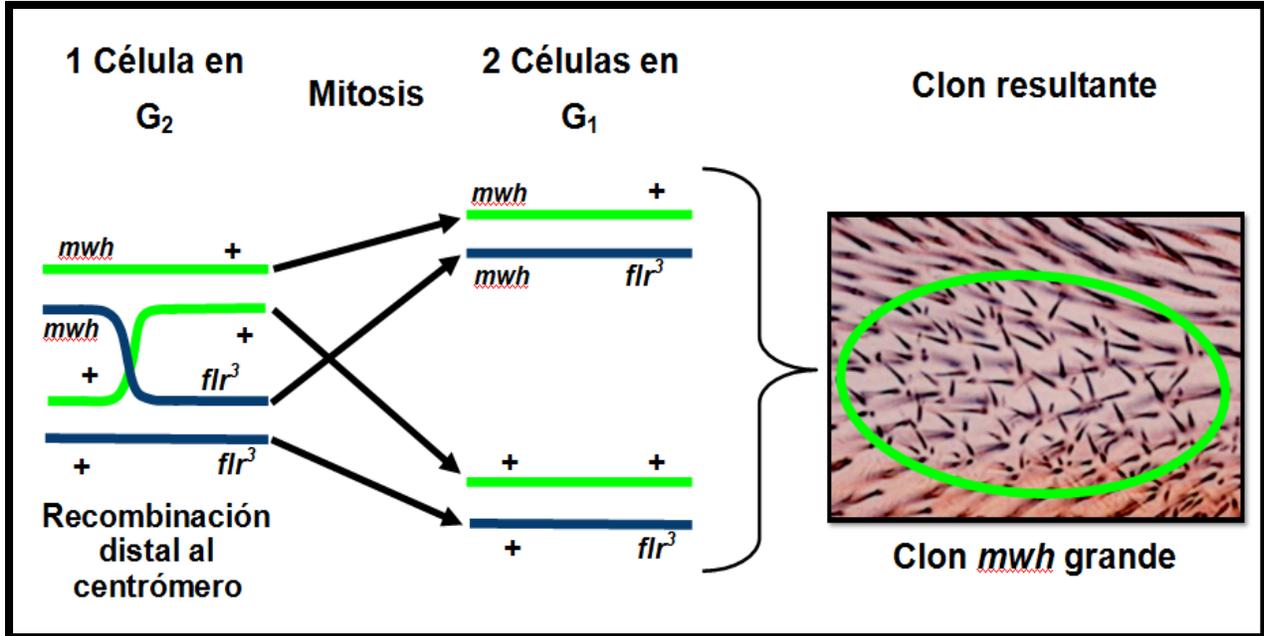


Figura 31. Evento genético (recombinación distal al centrómero) que genera pérdida de heterocigosis de los marcadores *mwh* y *flr*³.

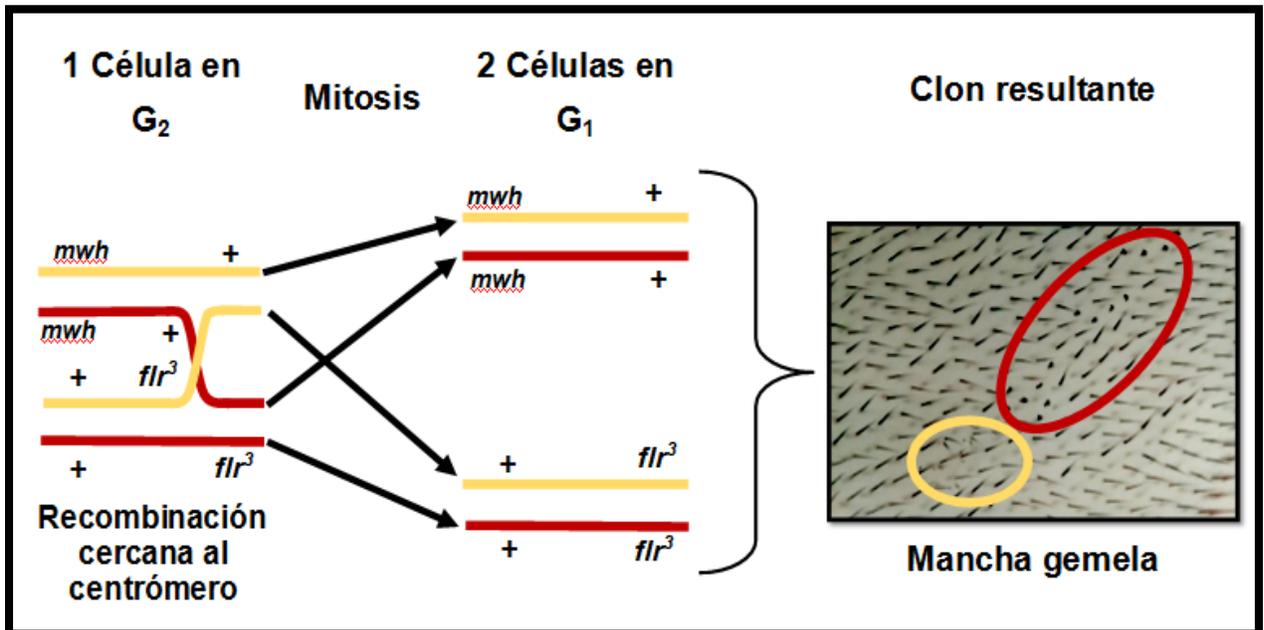


Figura 32. Evento genético (recombinación cercana al centrómero) que genera pérdida de heterocigosis de los marcadores *mwh* y *flr*.

