



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Efecto del resveratrol en tratamiento y co-tratamiento con nicotina en SMART en ala de *Drosophila melanogaster*, cruce de bioactivación elevada (BE)”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

Juan Carlos Estrada Guzmán

DIRECTORA DE TESIS:

M. en C. Irma Elena Dueñas García



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“La mayoría de la gente dice que el intelecto es lo que hace a un gran científico. Están equivocados: es el carácter”

-Albert Einstein.

Dedicatorias

Para las tres personas más importantes que tengo en primer lugar a mi madre por todo su apoyo incondicional y su comprensión, en segundo lugar, a mi hermano por estar en los buenos y malos momentos, por escucharme y apoyarme y a mi padre por ser un hombre que ha sido un buen guía y excelente consejero, gracias a los tres por estar en todas las etapas de mi vida.

También esto no sería posible si no fuera por mi pequeña y hermosa novia Elizabeth.

Agradecimientos

A mi **madre Raquel**: por ser la mujer más importante en mi vida, por enseñarme a seguir adelante pese a todo, por tu cálido amor, por tu comprensión, por tu paciencia y por las veces que hemos reído. Además, por educarme y corregirme en los momentos que eran necesarios, aunque con maneras muy especiales y ortodoxas y sobre todo por tu compañía que siempre me ofreces al igual que todos los consejos dados día a día.

A mi **padre Juan**: por enseñarme a ser un mejor hombre a través de sus valores y principios, por nunca rendirme a pesar de las circunstancias y que tan cansado puedo estar, por enseñarme lo importante de la palabra paciencia y gracias por tu amor.

A mi **hermano Mauricio**: por su apoyo y la compañía que me has dado, por las veces que platicamos y recibo una retroalimentación y crítica, sumado a las tantas veces de ir a jugar juntos y por todas las peleas.

A mi **novia Elizabeth**: la mujer que con el tiempo se ha vuelto especial e importante por el apoyo que siempre me ha dado, por siempre decirme que no me rinda y que ya falta poquito, por su compañía, las experiencias vividas y por su amor.

A mi **amiga Gema**: por ser una buena amiga, por los momentos vividos y por su buena amistad.

Y a los demás integrantes de mi familia, que sin mencionarlo gracias por su apoyo y que saben que son importantes para mí.

¡Gracias a todas las personas importantes de mi vida, en verdad gracias!

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**: por volverse literalmente mi segunda casa, el permitirme ser parte de esta gran casa de estudios por arroparme como alumno por mucho tiempo, gracias por brindarme una formación académica, por darme la posibilidad de entender y poder desarrollar la carrera de Biología y por último por dejarme desarrollarme como atleta a través de sus instalaciones.

A la **Maestra Irma Elena Dueñas**: por aceptarme y ser mi tutora, por apoyarme, por sus consejos, por su confianza y sus aportes para poder terminar este proyecto por volverme más amena la estancia del laboratorio por medio de su humor.

A las **Maestras María Eugenia Heres y Laura Castañeda**: por su apoyo, por sus consejos, por contestar siempre mis dudas, las atenciones que tuvieron conmigo y también por convertir mi estancia en el laboratorio muy buena.

Al **Maestro Luis Felipe Santos Cruz**: por toda la ayuda, la asesoría y el apoyo en el proyecto del servicio social y tesis, por el tiempo que se tomó para poder explicarme y enseñarme en todos los momentos que lo necesite.

Al **Maestro Ángel Durán Durán**: por su apoyo y asesoría en el análisis estadístico de los resultados del servicio social y tesis.

A mis sinodales, la **Doctora Ana María García Bores**, al **Doctor Elías Piedra Ibarra** y al **Doctor Martín Palomar Morales**: por la atención brindada y el aporte para una mejor tesis todo a través de sus correcciones y sugerencias.

Índice

<u>Índice de tablas</u>	I
<u>Índice de figuras</u>	II
<u>Lista de abreviaturas</u>	IV
<u>Resumen</u>	1
<u>Introducción</u>	2
<u>Tabaquismo</u>	2
<u>Nicotina (NIC)</u>	5
<u>Resveratrol (RES)</u>	10
<u>Antecedentes NIC</u>	14
<u>Inducción de ERO</u>	14
<u>Inducción de la apoptosis</u>	14
<u>Supresión de la apoptosis</u>	15
<u>Efecto genotóxico</u>	16
<u>Antecedentes RES</u>	17
<u>Efecto no genotóxico</u>	17
<u>Supresión de la proliferación celular</u>	18
<u>Inducción de la proliferación celular</u>	18
<u>Actividad pro-oxidante</u>	19
<u>Activación de sirtuinas</u>	20
<u>Efecto genotóxico del RES en co-tratamiento con NIC</u>	20
<u>Justificación</u>	21
<u>Hipótesis</u>	22
<u>Objetivos</u>	22
<u>Objetivo general</u>	22
<u>Objetivos particulares</u>	22
<u>Materiales y métodos</u>	22
<u>Materiales químicos</u>	22
<u>Materiales biológicos</u>	23
<u>Prueba de toxicidad</u>	23
<u>Cultivo y propagación de las cepas de <i>D. melanogaster</i></u>	23
<u>Colecta de huevos y recuperación de larvas</u>	24
<u>Diseño experimental</u>	24
<u>Análisis estadístico de los datos</u>	25
<u>Prueba SMART en ala de <i>D. melanogaster</i>, Cruza BE</u>	25
<u>Cultivo y propagación de las cepas de <i>D. melanogaster</i></u>	25
<u>Producción de la craza BE</u>	25
<u>Colecta de huevos y recuperación de larvas</u>	26
<u>Diseño experimental</u>	26
<u>Diseción y montaje de las alas</u>	27

<u>Análisis de laminillas y análisis estadístico de los datos</u>	27
<u>Resultados</u>	29
<u>Prueba de toxicidad</u>	29
<u>A. Tratamientos NIC al compararse con su testigo agua MiliQ</u>	30
<u>B. Co-tratamientos NIC-RES y el tratamiento RES con su testigo EtOH 1%</u>	31
<u>C. Comparación del porcentaje de mortalidad entre cepas</u>	32
<u>D. Interacciones concentración-cepa (flare vs Oregon-flare)</u>	33
<u>Prueba SMART en ala de <i>D. melanogaster</i></u>	36
<u>Testigo solvente EtOH 1% y el testigo positivo DMN</u>	39
<u>Tratamientos NIC</u>	41
<u>Co-tratamiento RES-NIC 0.40 μM + 470 μM vs el tratamiento NIC 470 μM</u>	42
<u>Co-tratamiento RES-NIC 0.40 μM + 940 μM vs el tratamiento NIC 940 μM</u>	44
<u>Co-tratamiento RES-NIC 0.40 μM + 1880 μM vs el tratamiento NIC 1880 μM</u>	45
<u>Co-tratamiento RES-NIC 0.40 μM + 3760 μM vs el tratamiento NIC 3760 μM</u>	47
<u>Tratamiento RES vs el testigo solvente EtOH 1%</u>	48
<u>Co-tratamientos RES-NIC</u>	50
<u>Discusión</u>	54
<u>Prueba de toxicidad</u>	54
<u>Prueba SMART en ala de <i>D. melanogaster</i></u>	57
<u>Testigo positivo DMN</u>	58
<u>Testigo solvente EtOH 1%</u>	59
<u>Tratamientos NIC</u>	62
<u>Tratamiento RES</u>	66
<u>Co-tratamientos RES-NIC</u>	68
<u>Conclusiones</u>	75
<u>Literatura citada</u>	76
<u>Anexo I. <i>D. melanogaster</i></u>	99
<u>Anexo II. Prueba SMART en ala de <i>D. melanogaster</i></u>	103

Índice de tablas

<u>Tabla I.</u> Tratamientos y co-tratamientos utilizados en la prueba de toxicidad.....	24
<u>Tabla II.</u> Tratamientos y co-tratamientos utilizados para la prueba SMART.....	27
<u>Tabla III.</u> Medidas descriptivas de los porcentajes de mortalidad de cada tratamiento NIC y el testigo agua MiliQ.....	30
<u>Tabla IV.</u> Medidas descriptivas de los porcentajes de mortalidad de cada co-tratamiento NIC-RES y el testigo EtOH 1%.....	31
<u>Tabla V.</u> Medidas descriptivas de los porcentajes de mortalidad de cada cepa.....	33
<u>Tabla VI.</u> Medidas descriptivas de los porcentajes de mortalidad de cada cepa con sus respectivos tratamientos y co-tratamientos.....	35
<u>Tabla VII.</u> Resultados de la prueba SMART en ala de <i>D. melanogaster</i> cruza BE. Frecuencias de clon/individuo de los tratamientos y co-tratamientos crónicos con un periodo de 48h.....	37
<u>Tabla VIII.</u> Resultados del análisis de la distribución acumulada del tamaño de clones mwh en <i>D. melanogaster</i> cruza BE.....	38

Índice de figuras

Figura 1. <u>Proceso por el cual el tabaquismo ocasiona cáncer</u>	4
Figura 2. <u>Estructura química de la nicotina</u>	5
Figura 3. <u>Vía metabólica de la NIC en humanos con sus principales metabolitos primarios y secundarios</u>	9
Figura 4. <u>Estructura química de los isómeros del resveratrol</u>	12
Figura 5. <u>Principal vía de biosíntesis del RES en la naturaleza</u>	13
Figura 6. <u>Cultivo y mantenimiento de las cepas y la cruce BE</u>	21
Figura 7. <u>Preparaciones permanentes de los tratamientos y co-tratamientos</u>	23
Figura 8. <u>Porcentaje de mortalidad de los tratamientos, los co-tratamientos y testigos negativos</u>	32
Figura 9. <u>Porcentaje de mortalidad de las cepas Flare y Oregon-Flare tratadas con NIC y en co-tratamiento con RES</u>	33
Figura 10. <u>Porcentaje de mortalidad de la interacción concentración-cepa de los tratamientos, los co-tratamientos y testigos negativos</u>	36
Figura 11. <u>Frecuencia de clones pequeños, grandes, gemelos y totales de los testigos negativos agua MiliQ y EtOH 1% y el testigo DMN</u>	40
Figura 12. <u>Distribución de las frecuencias acumuladas del tamaño de clones <i>mwh</i> por individuo de los testigos negativos y el positivo</u>	40
Figura 13. <u>Frecuencia de clones pequeños, grandes, gemelos y totales por individuo de los tratamientos de NIC</u>	41
Figura 14. <u>Distribución de las frecuencias acumuladas del tamaño de clones <i>mwh</i> por individuo de los tratamientos NIC</u>	42
Figura 15. <u>Frecuencia de clones pequeños, grandes, gemelos y totales del tratamiento NIC 470 μM y el co-tratamiento RES-NIC 0.40 μM + 470 μM</u>	43
Figura 16. <u>Distribución de las frecuencias acumuladas del tamaño de clones <i>mwh</i> por individuo del tratamiento NIC 470 μM y su respectivo co-tratamiento RES-NIC</u>	43
Figura 17. <u>Frecuencia de clones pequeños, grandes, gemelos y totales del tratamiento NIC 940 μM y el co-tratamiento RES-NIC 0.40 μM + 940 μM</u>	44
Figura 18. <u>Distribución de las frecuencias acumuladas del tamaño de clones <i>mwh</i> por individuo del tratamiento NIC 940 μM y su respectivo co-tratamiento RES-NIC</u>	45
Figura 19. <u>Frecuencia de clones pequeños, grandes, gemelos y totales del tratamiento NIC 1880 μM y el co-tratamiento RES-NIC 0.40 μM + 1880 μM</u>	46

Figura 20. <u>Distribución de las frecuencias acumuladas del tamaño de clones mwh por individuo del tratamiento NIC 1880 μM y su respectivo co-tratamiento RES-NIC.</u>	46
Figura 21. <u>Frecuencia de clones pequeños, grandes, gemelos y totales del tratamiento NIC 3670 μM y el co-tratamiento RES-NIC 0.40 μM + 3760 μM.</u>	47
Figura 22. <u>Distribución de las frecuencias acumuladas del tamaño de clones mwh por individuo del tratamiento NIC 3670 μM y su respectivo co-tratamiento RES-NIC.</u>	48
Figura 23. <u>Frecuencia de clones pequeños, grandes, gemelos y totales del testigo EtOH 1% y el tratamiento RES 0.40 μM.</u>	49
Figura 24. <u>Distribución de las frecuencias acumuladas del tamaño de clones mwh por individuo del testigo EtOH 1% y el tratamiento RES.</u>	49
Figura 25. <u>Frecuencia de clones pequeños, grandes, gemelos y totales por individuo de los co-tratamientos de RES-NIC.</u>	52
Figura 26. <u>Frecuencia de clones pequeños, grandes, gemelos y totales por individuo de los co-tratamientos de RES-NIC.</u>	52
Figura 27. <u>Distribución de las frecuencias acumuladas del tamaño de clones mwh por individuo del testigo EtOH 1% y los co-tratamientos RES-NIC.</u>	53
Figura 28. <u>Distribución de las frecuencias acumuladas del tamaño de clones mwh por individuo del tratamiento RES y los co-tratamientos RES-NIC.</u>	53
Figura 29. <u>Ciclo de vida de <i>D. melanogaster</i>.</u>	101
Figura 30. <u>Los discos imaginales en el proceso de metamorfosis dan lugar a las estructuras en los adultos de <i>D. melanogaster</i>.</u>	102
Figura 31. <u>Dimorfismo sexual presente en <i>D. melanogaster</i>.</u>	103
Figura 32. <u>Marcadores genéticos recesivos que se expresan en las alas de <i>D. melanogaster</i>.</u>	105
Figura 33. <u>Eventos genéticos detectados por la prueba SMART a través del daño genético.</u>	107
Figura 34. <u>Eventos genéticos detectados por la prueba SMART a través del daño genético.</u>	108

Lista de Abreviaturas

8-OH-dG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

α 9nAChR: Isoforma α 9 del receptor nicotínico de acetilcolina

Akt: Serina/treonina kinasa

Bcl2: Linfoma de células B

BE: Cruza de bioactivación elevada

BT474: Línea celular tumoral humana de cáncer de mama luminal B

CAM6: Línea celular tumoral murina de cáncer de mama luminal B

CE: Cruza estándar

DMN: Dimetilnitrosamina

D.S.S.H.E.U.: Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos

ERK 1/2: Quinasas reguladas por señal extracelular

ERO: Especies reactivas de oxígeno

EtOH: Etanol

HepG2: Células de hepatocarcinoma humano

HL-60: Línea celular de leucemia promielocítica humana

HNPC: Células progenitoras neuronales humanas

HPMC: Células mesoteliales peritoneales humanas

HSC: Células estrelladas hepáticas activadas

HT-29: Células de adenocarcinoma colorrectal

HUVECs: Células endoteliales de la vena umbilical humana

LGALS3: Galectina-3

MAPK: Proteína quinasas activadas por mitógenos

MUL1: La proteína ligasa 1 de ubiquitina E3 mitocondrial

nAChRs: Receptores colinérgicos nicotínicos de acetilcolina

NIC: Nicotina

Nrf2/ARE: Vía del factor de transcripción redox nuclear y por los elementos de respuesta antioxidante

PI3K: Fosfatidilinositol-3-kinasa

PKC: Proteína quinasa C

RES: Resveratrol

RL: Radicales libres

STAT3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3

SMART: Prueba de mutación y recombinación somática

TTC3: La proteína 3 de repetición de tetratricopéptidos

UGT: Uridina Difosfato-Glucuronosil Transferasa

Resumen

La epidemia del consumo del tabaco es un problema severo a nivel mundial, debido a las elevadas tasas de mortalidad provocadas por las enfermedades derivadas del tabaquismo. Uno de los principales compuestos del tabaco y causante a su adicción es la nicotina (NIC), sustancia altamente tóxica debido en parte a sus propiedades oxidantes, mediante la generación de radicales libres (RL) y especies reactivas de oxígeno (ERO). Para combatir los efectos negativos de la NIC se han empleado diferentes compuestos con propiedades antioxidantes, tales como el resveratrol (RES), que es capaz de disminuir el daño oxidativo al estar involucrado en la detención de las reacciones en cadena de los RL. Por consiguiente, se evaluó el posible efecto quimioprotector del RES en co-tratamiento con NIC empleando la prueba SMART en ala de *D. melanogaster*, craza de bioactivación elevada (BE). Para esto, larvas de 72 ± 4 h se expusieron a tratamientos crónicos de NIC 470, 912, 1880, 3670 y 11280 μ M, RES 0.40 μ M, co-tratamientos RES-NIC, testigos disolventes agua MiliQ y etanol (EtOH 1%) y el positivo dimetilnitrosamina (DMN) 0.076 μ M. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y en tres experimentos independientes. Las 1498 alas de individuos transheterocigotos se analizaron a 40x, y los datos recolectados fueron analizados por el programa SMART PC versión 2.1, basado en la prueba estadística Kastenbaun-Bouman, la prueba de U de Mann-Whitney y Kolmogorov-Smirnov con el software STAT-Graphics versión 7.0. Los resultados indicaron que la NIC no fue genotóxica, pero a 11280 μ M ocasionó alta toxicidad y a todas las concentraciones alteró la distribución de clones *mwh*, estos resultados permiten inferir que la NIC tuvo un efecto apoptótico o antiapoptótico. El RES a 0.40 μ M no resultó ser genotóxico, pero sí alteró la división celular, quizá debido a su efecto antiproliferativo y proliferativo. Por otra parte, la interacción RES-NIC resultó ser genotóxica solo para los co-tratamientos 0.40 μ M + 470 μ M y 0.40 μ M + 3760 μ M, tal vez debido a un desbalance en la señalización redox. No obstante el co-tratamiento 1880 + 0.40 μ M tuvo una reducción en el daño, daño reflejado por la tasa de mutación espontánea de los individuos y a su vez no afecto la división celular, en cambio los demás co-tratamientos si alteraron la división celular. Se concluye que la interacción RES-NIC presentó un resultado positivo sobre el daño oxidativo como negativo al producir genotoxicidad en *D. melanogaster*.

Palabras clave: genotoxicidad, apoptosis, proliferativo, *Drosophila melanogaster*, SMART

Introducción

Hoy en día el control de tabaco y su consumo es un problema de orbe mundial, volviéndose en una prioridad por las graves consecuencias que genera a la salud pública (OMS, 2015). En respuesta a la globalización de la epidemia del tabaquismo la Organización Mundial de la Salud (OMS) promovió el Convenio Marco de la OMS para el Control del Tabaco (C.M.C.T.), el cuál entró en vigor en el año 2005, basado en evidencias científicas que protegen el derecho a la salud de las personas. El C.M.C.T. tiene como objetivos principales conceder un marco nacional e internacional para la aplicación de medidas de control del tabaco, a fin de reducir el consumo y la exposición al humo de éste y originar una protección a las generaciones presentes y futuras de los efectos nocivos sobre su consumo (C.M.C.T., 2003; OMS, 2015).

Tabaquismo

El tabaquismo está clasificado como una enfermedad crónica sistemática que pertenece al grupo de las adicciones, dicha enfermedad es clasificada por la OMS, como un trastorno mental y de comportamiento a causa del frecuente consumo de tabaco. La OMS en su International Classification of Diseases (The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders, 1993) y por la Asociación Estadounidense de Psiquiatría en su Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5, 2014). Las enfermedades derivadas del tabaquismo son la segunda causa de muerte a nivel mundial, las cuales incluyen enfermedades cardiovasculares, como son hipertensión arterial y arteriopatía coronaria; enfermedades respiratorias como la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), asma, neumonía y tuberculosis; y en otros niveles también afecta el sistema nervioso; además genera problemas de fertilidad, daño a la piel y sobretodo una de las enfermedades más importantes debido a su mortalidad, como lo es el cáncer (Zinser, 2014; OMS, 2015).

El cáncer es una alteración biológica y genética de las células, que ocasionan que se dividan anormalmente (crecimiento descontrolado); generándose el proceso de carcinogénesis. El desarrollo del proceso comienza con la fase de iniciación en donde

ocurren múltiples mutaciones genéticas en una célula o varias células, lo que genera una perturbación en sus características y un daño reflejado en la regulación de su ciclo celular, la siguiente fase es la de promoción en que existe una etapa de crecimiento tisular, que favorece la formación de agregados que dan pauta a un nódulo o tumor benigno o maligno. En la última fase del proceso la progresión, la cual implica la diseminación de la enfermedad por medio del mecanismo de metástasis; de tal forma que las células tumorales malignas, penetran en los vasos sanguíneos y linfáticos, lo que les confiere poder viajar en la circulación sanguínea y llegar a tejidos normales de otra parte del cuerpo o por medio del mecanismo de invasión que consta en la migración directa a tejidos y órganos alrededor (Sánchez, 2013; OMS, 2018).

Se tiene reportado que el humo del tabaco, generado por su combustión contiene de 4,000 a 4,800 compuestos diferentes (Ruíz *et al.*, 2004; Carretero, 2005), de los cuales al menos 60 de ellos son carcinógenos (Carretero, 2005; Alexandrov *et al.*, 2016) y 16 de estos están en el tabaco sin quemar (Hecht, 2003). Además, el Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos (D.S.S.H.E.U.) informa que cuenta con co-carcinógenos que pueden aumentar el efecto de los cancerígenos (D.S.S.H.E.U., 2014). Los efectos cancerígenos de algunos compuestos del tabaco se deben en gran medida al daño al DNA que provocan, más aún si no se repararan de manera adecuada y eficiente, incrementan la presencia de mutaciones que son un factor muy importante en el proceso de carcinogénesis (Ferrís *et al.*, 2004; Alexandrov *et al.*, 2016). Algunos de los daños provocados al DNA por los cancerígenos que se encuentran en el humo de tabaco son en generar mutaciones genéticas por medio de sustitución de bases, así como la formación de aductos sobre determinadas bases nitrogenadas del DNA (Alexandrov *et al.*, 2016), dichos daños si no son reparados causarían errores en la replicación del DNA y en la codificación de genes, más aún si la mutación ocurre en un oncogén o en un gen supresor de tumores, ocasionaría una alteración en el mecanismo de la proliferación celular y cáncer (D.S.S.H.E.U., 2014).

A su vez en el desarrollo de cáncer participan de forma decisiva los cambios o las alteraciones epigenéticas causadas por el tabaquismo ya que es capaz de inducir

alteraciones duraderas en la metilación del DNA, encontrándose regiones metiladas en más de 7.000 genes asociados a las enfermedades provocadas por el tabaco (Joehanes *et al.*, 2016).

La metilación del DNA está involucrada en reprimir la expresión de genes supresores de tumores en consecuencia, el silenciamiento de estos genes favorece la carcinogénesis, la progresión del tumor y la acumulación de mutaciones (Benlloch, 2008). Es necesario señalar que el tabaquismo ocasiona cambios en la expresión génica que corresponden con las enfermedades conocidas derivadas de éste, ya que se alteran los niveles de expresión de genes relacionados con la muerte celular, tumorigenesis, proliferación, cáncer, la vía de señalización del metabolismo xenobiótico y metabolismo xenobiótico por medio de la vía Cyp450s (Figura 1) (Charlesworth *et al.*, 2010).

El tabaquismo está relacionado con varios tipos de cáncer como son el de laringe, cavidad oral, faringe, esófago, hígado, cervix, páncreas, vejiga, riñón y pulmón, el cuál destaca (Alexandrov *et al.*, 2016), puesto que provoca al menos 1.31 millones de muertes al año, esto supone casi seis millones de muertes anuales en el mundo y la mayoría de las cuales se producen en países de ingresos bajos y medios. De persistir las tendencias actuales, en 2030 se llegará a más de ocho millones. El 80% de las muertes prematuras ocurrirán en dichos países. Paradójicamente, el consumo de tabaco es la principal causa de mortalidad prevenible a nivel mundial (OMS, 2009).

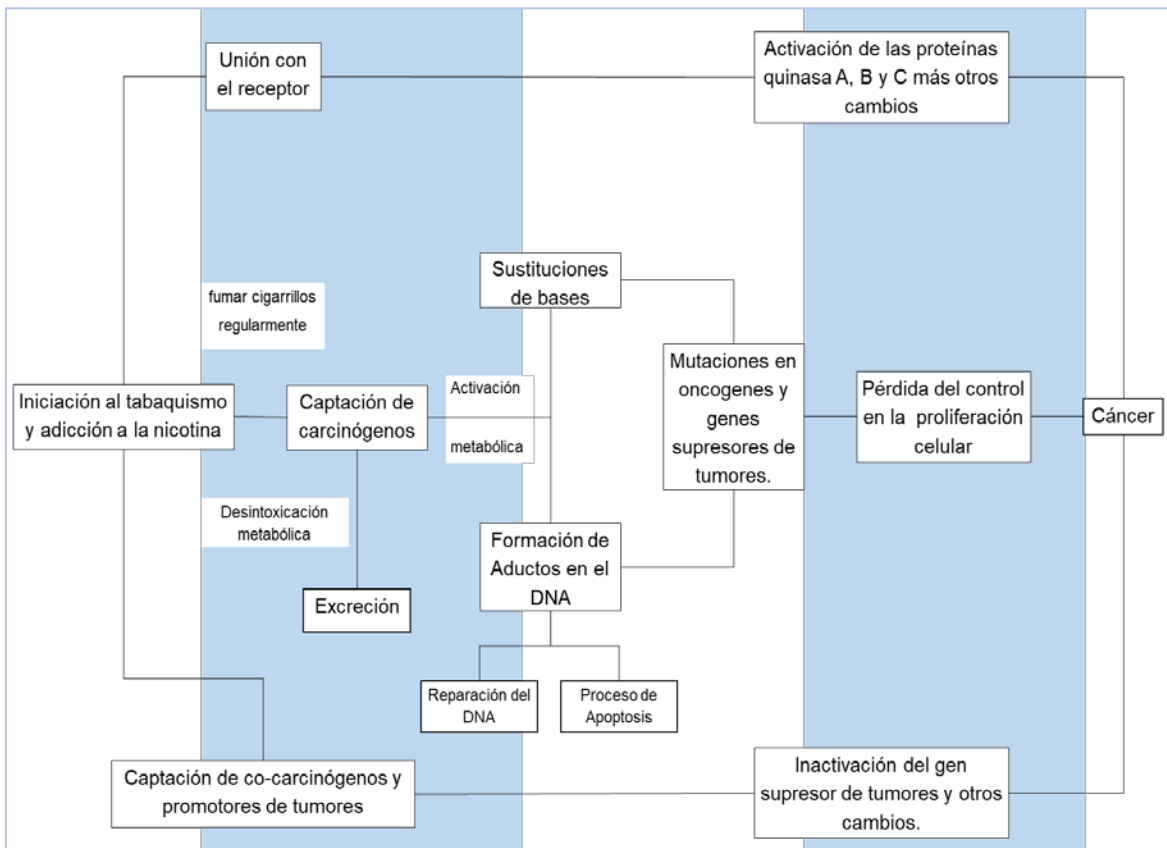


Fig. 1 Procesos por los cuales el tabaquismo ocasiona cáncer.
(Modificado de D.S.S.H.E.U., 2014).

El tabaco es el producto vegetal que se obtiene de las hojas y tallos secos fermentados de varias plantas del género *Nicotiana*, en especial de *N. tabacum*. Aparte, el Comité Científico sobre Riesgos de Salud Emergentes y Recientemente Identificados de la Unión Europea (C.C.R.S.E.R.I.) argumenta que al tabaco comercial se le añaden aditivos, estas son sustancias que ayudan a la protección contra la degradación, actúan como material adherente o relleno y para mantener la humedad, así mismo saborizantes y químicos que modifican las propiedades del tabaco con el fin de tener una experiencia más agradable al fumar (C.C.R.S.E.R.I., 2010). Cabe señalar que el género *Nicotiana* contiene una de las drogas conocidas más poderosas, la nicotina (NIC), que se sabe causa el desarrollo de la adicción al tabaco (Benowitz, 2010;

Picciotto y Kenny, 2012) por actuar como un reforzador positivo directo en humanos (Perez y Perez, 2007).

Nicotina (NIC)

La nicotina, 3-(1-metil-2-pirrolidinil) piridina, es una amina terciaria compuesta por un anillo de piridina y otro de pirrolidina (Figura 2) (Ciolino *et al.*, 1999; Osorio, 2010). El anillo de piridina tiene como precursor el ácido nicotínico y el anillo de pirrolidina se origina desde la L-ornitina y L- arginina (Kato y Hashimoto, 2004; Shoji y Hashimoto, 2011). Tiene una consistencia de un líquido oleoso, incoloro y que por el proceso de oxidación del aire puede tener un color que va de amarillo a café (Ramos, 2014).

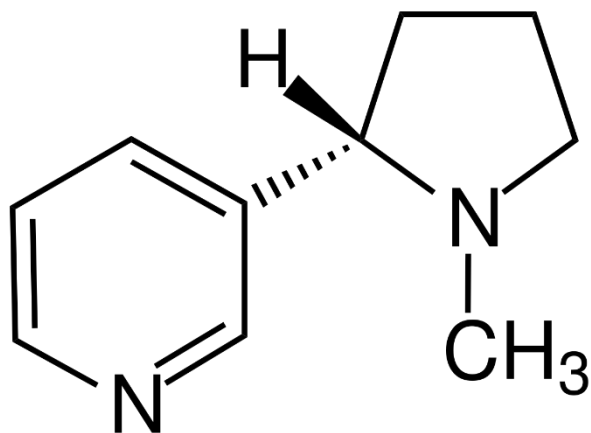


Fig. 2 Estructura química de la nicotina (Tomado de Ramos, 2014).

La NIC es un alcaloide que se presenta de forma natural y en concentraciones bajas en algunas plantas de la familia Solanaceae como son *S. lycopersicum*, *S. tuberosum*, *S. melongena* y *Capsicum annuum* (Siegmond *et al.*, 1999) y en concentraciones altas en la planta del tabaco. La NIC corresponde al 90-95% de alcaloides totales en la especie *N. tabacum* y el porcentaje restante lo conforman los alcaloides secundarios como nornicotina, anatabina y anabasina (Shoji y Hashimoto, 2011); así mismo la NIC constituye cerca del 5% del peso de la planta y 3% del peso del tabaco seco. Se sintetiza exclusivamente en las zonas de mayor actividad de las raíces y es transportada por medio del xilema de manera sistémica a través de la savia para ser almacenada en

vacuolas centrales de las hojas verdes, en una mayor concentración en hojas intermedias y maduras (Baeta de Oliveira *et al.*, 2011; Shoji y Hashimoto, 2011), depositándose en forma de sales que son solubles en agua al reaccionar con ácidos orgánicos (Shoji y Hashimoto, 2011; Ramos, 2014).

La NIC se considera una droga psicoactiva y un potente reforzador conductual que es capaz de producir una severa adicción, en dosis bajas es psicoestimulante, mejora la capacidad mental y la concentración del individuo y a dosis altas tiene un efecto sedante al actuar como depresor (Picciotto y Mineur, 2014).

El mecanismo de acción de la NIC se ejerce una vez que es absorbida rápidamente por los alvéolos pulmonares por medio de la práctica por fumar. Rápidamente pasa al torrente sanguíneo encontrándose concentraciones elevadas de NIC en sangre arterial lo que permite que sea transportada en tan solo 8 a 10 segundos al cerebro (Matta *et al.*, 2007) al ser capaz de atravesar la barrera hematoencefálica por medio de difusión pasiva y más importante a través de un transportador de alta capacidad y baja afinidad que se comporta como un antiportador de protones independiente de sodio (Cisternino *et al.*, 2012). Mediante la unión selectiva con los receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs), dicha unión se da gracias por su semejanza química con la acetilcolina. La NIC actúa como un “agonista específico”, de esta manera afecta el sistema nervioso central y periférico (Pozuelos *et al.*, 2000).

Los nAChRs son proteínas transmembrana conformados por subunidades α , β , γ , δ y ϵ que conforman canales iónicos activados por ligando, lo que propicia la entrada de iones Ca^{2+} , Na^{+} y K^{+} a las neuronas provocando la liberación de neurotransmisores como la dopamina, serotonina, norepinefrina, vasopresina, glutamato, ácido γ -aminobutírico (GABA) y acetilcolina (López y García, 2003; Ramos, 2014). Los nAChRs están en todo el cerebro, pues se han localizado en el tálamo, ganglios basales, corteza cerebral, área tegmental ventral, hipocampo y cerebelo (Grybko *et al.*, 2010; Turner *et al.*, 2011).

El efecto de la NIC en el cerebro humano a través del sistema mesolímbico dopaminérgico es gracias a la activación de las neuronas dopaminérgicas ubicadas en el segmento ventral del cerebro medio en el área ventral tegmental conectadas con el núcleo accumbens, corteza cerebral y sistema límbico, causan un incremento de las interacciones glutamato-GABA-dopamina-acetilcolina (Mansvelder *et al.*, 2003; Markou, 2008). La NIC desensibiliza los nAChRs y provoca una reducción en la transmisión de neuronas GABAérgicas (Mansvelder *et al.*, 2002). Asimismo, estimula las terminales glutaminérgicas, libera glutamato y provoca un aumento en la liberación de dopamina en el núcleo accumbens y la corteza frontal (Markou, 2008) y el área tegmental ventral (Mansvelder *et al.*, 2002); lo cual significa en una estimulación y cambios permanentes en la vía de recompensa cerebral meso-accumbens favoreciendo a que se desarrolle una dependencia a la NIC (Mansvelder *et al.*, 2002).

En *D. melogaster* la NIC actúa en alguno de los sistemas de neurotransmisores (similares a los de mamíferos), como es la vía dopaminérgica que presenta una función en las respuestas de comportamiento (Bainton *et al.*, 2000).

La NIC es metabolizada por los pulmones, riñones y principalmente por el hígado por medio de la vía enzimática Cyp450s (fase I del metabolismo xenobiótico) y por una aldehído deshidrogenasa (Pozuelos *et al.*, 2000; Osorio, 2010) y es degradada como metabolitos primarios a 2'-hidroxicotina, cotinina, cotinina N-1-óxido, ión nocotinaimino, nornicotina y norcotinina (Benowitz *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010; Osorio, 2010) a través de una C-oxidación y una N-oxidación (Tricker, 2003) y en metabolitos secundarios como cotinina N-glucorónido, trans-3'-hidroxicotinina-O-glucorónido y cotinina-3'-O-glucorónido (Benowitz *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010) por medio de una N-glucuronidación y una O-glucuronidación (Tricker, 2003). La oxidación de la NIC no solo depende de la vía Cyp450s sino también de la forma 3 de monooxigenasa que contiene flavina hepática (FMO3) encargada de degradarla a nicotina N-1-óxido (Tricker, 2003; Benowitz *et al.*, 2009). Cabe señalar que la NIC puede no estar en la fase I del metabolismo xenobiótico y ser conjugada directamente

por medio de la enzima glucuroniltransferasa (UGT) para obtener nicotina N- β -glucorónido (Benowitz *et al.*, 2009).

El primer paso en la ruta principal del metabolismo de la NIC es por medio de la oxidación del anillo de pirrolidina para pasar al ion nicotina $\Delta^{1' (5)}$ -amino (Benowitz *et al.*, 2009) principalmente por las isoformas de las enzimas CYP2A6 y CYP2B6 codificadas por el gen *CYP2A6*. La isoforma CYP2A6 es la encargada del 80% de la degradación de la NIC al metabolito cotinina (Osorio, 2010; Ramos, 2014; Tanner *et al.*, 2015). Cabe resaltar que la enzima CYP2A6 presenta homología en *D. melanogaster*, para este insecto la CYP6G1 es la encargada de metabolizar la NIC (Li *et al.*, 2012; Highfill *et al.*, 2017). Posteriormente, la oxidación del ion nicotina $\Delta^{1' (5)}$ -amino por la aldehído oxidasa (Cashman *et al.*, 1992; Benowitz *et al.*, 2009), tiene como resultado el metabolito cotinina el cual sufre una trans-3'-hidroxilación para pasar a ser trans-3'-hidroxicotinina (Brown *et al.*, 2005) y finalmente la trans-3'-hidroxicotinina pasa por el proceso de O-glucuronidación para producir trans-3'-hidroxicotinina-O-glucorónido para finalmente ser excretada por medio de la orina (Figura 3) (Meger *et al.*, 2002).

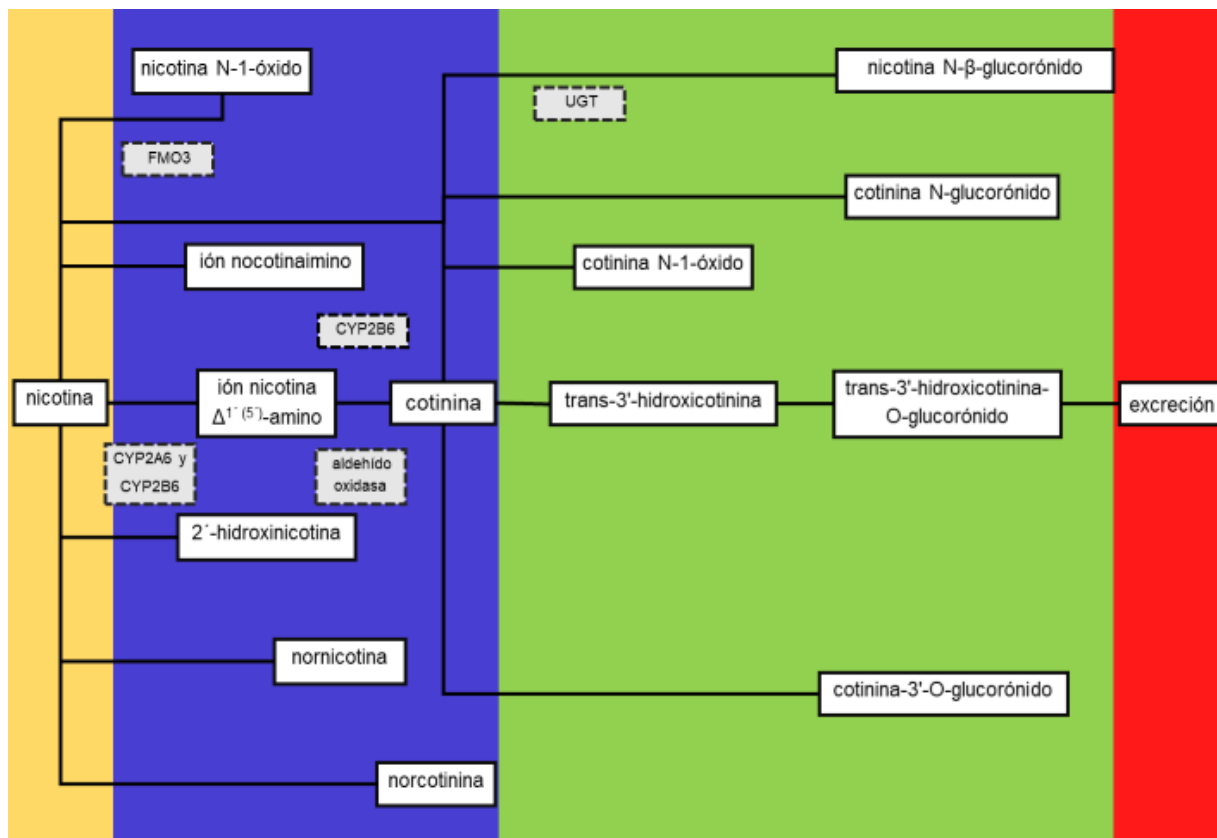


Fig. 3 Vía metabólica de la NIC en humanos con sus principales metabolitos primarios y secundarios. En azul ■ fase I, en verde ■ fase II del metabolismo xenobiótico y en violeta las principales enzimas que metabolizan a la NIC (Basado en la información de Tricker, 2003; Benowitz *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010 y Osorio, 2010).

La forma en como la NIC provoca daño es a través de la inducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Barr *et al.*, 2007). Las ERO son moléculas derivadas del oxígeno molecular (O_2), el cual cuenta con una configuración electrónica única; dichas ERO a través de su reducción química parcial son capaces de producir daños oxidativos. Las ERO abarcan iones de oxígeno, radicales libres (RL) y otras moléculas que no son RL (Carrillo *et al.*, 2016). Los RL son cualquier molécula o átomo que contienen en su estructura uno o más electrones desapareados en su último orbital, esto se manifiesta en que sean muy reactivos con otras moléculas por la necesidad de ceder o tomar un electrón, confiriéndoles inestabilidad, poder oxidante y una vida media muy corta (San-Miguel y Martín, 2009). Los radicales que destacan por su importancia

biológica son el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), el radical hidroperóxido (HO_2^{\cdot}), el óxido nítrico (NO^{\cdot}), el radical dióxido de nitrógeno (NO_2^{\cdot}), el radical peróxido lípido (LO_2^{\cdot}), el radical piróxido (RO_2^{\cdot}) y el radical alcoxilo (RO^{\cdot}); y para los no radicales son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno singlete (1O_2) (Martínez, 2005; Buonocore *et al.*, 2010; Birben *et al.*, 2012).

Las ERO se producen por el metabolismo de sustancias exógenas como endógenas, de orgánulos celulares como las mitocondrias, de enzimas vía Cyp450s y otras enzimas (Buonocore *et al.*, 2010). Las ERO tiene un papel fundamental a niveles bajos o moderados sobre algunas respuestas celulares como la inducción de genes de defensa y la movilización de los sistemas de transporte de iones (Gupta *et al.*, 2014). Sin embargo, el incremento de ERO puede generar daños a las estructuras celulares los cuales provocarían una desregulación de las vías sensibles al redox celular (Bonekamp *et al.*, 2009) y a la oxidación de muchas biomoléculas entre ellas los lípidos, al causar el proceso de peroxidación lipídica (Barrera *et al.*, 2012); en el DNA provocan la degradación oxidativa de las nucleobases y favorecen la formación del 8-OH-dG, el cual es uno de los principales productos de oxidación del ADN ; en proteínas se oxidan las cadenas laterales de todos los residuos de aminoácidos específicamente los de cisteína y metionina (Buonocore *et al.*, 2010; Cadet *et al.*, 2012).

Un aumento de ERO afecta el equilibrio redox lo que provoca estrés oxidativo en células y tejidos. Principalmente, el estrés oxidativo se produce cuando hay un desequilibrio entre los agentes oxidantes y antioxidantes. Ya sea por el aumento de dichos oxidantes o por la disminución de los agentes antioxidantes (Birben *et al.*, 2012; Cadet *et al.*, 2012). El estrés oxidativo tiene como consecuencia el provocar una proliferación celular anormal, provoca una adaptación celular en la síntesis de enzimas antioxidantes y proteínas de choque térmico, causar lesiones celulares, senescencia e inducción a la apoptosis (Asimov, 2015).

Resveratrol (RES)

El resveratrol, (3,5,4-trihidroxiestilbena) es un tipo de polifenol natural con estructura de estilbena. Este compuesto de dos anillos fenólicos unidos por un doble enlace estireno, el cual le confiere tener las dos formas isoméricas *trans* y *cis* en la naturaleza (Figura 4) (Gambini *et al.*, 2013).

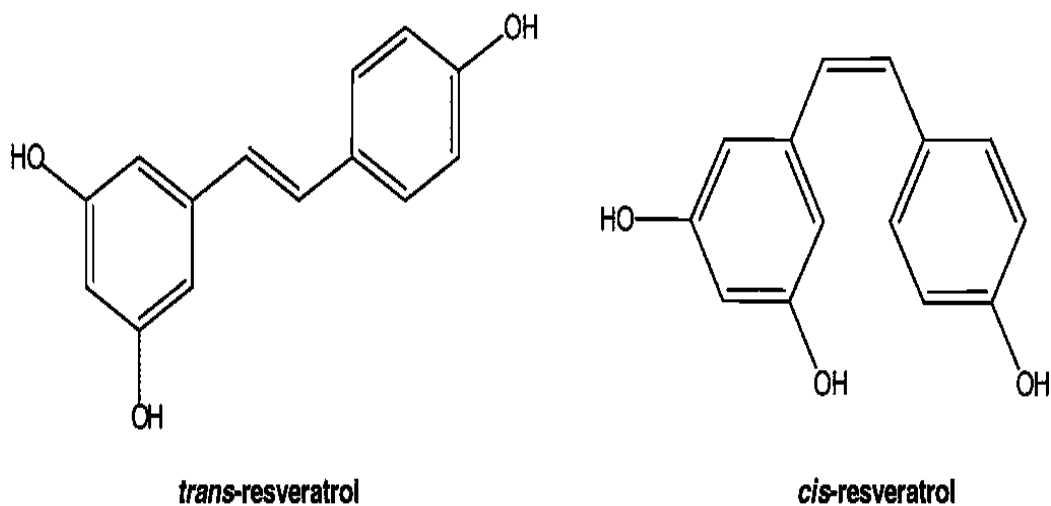


Fig. 4 Estructura química de los isómeros *trans*-resveratrol y *cis*-resveratrol. (Tomado de Gambini *et al.*, 2013).

El RES se sintetiza mediante la ruta de biosíntesis de los flavonoides (Ávalos y Pérez-Urria, 2009); primero la L-fenilalanina y la L-tirosina pierden el grupo amino por medio de desaminación no oxidativa, la L-fenilalanina a través de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) generándose el ácido cinámico y la L-tirosina por medio de la tirosina amonio liasa (TAL) produce ácido *p*-cumárico. El ácido cinámico a su vez es hidrolizado gracias a la enzima cinamato-4-hidroxilasa a ácido *p*-cumárico, el cual finalmente sufre una conjugación con una molécula de coenzima A para pasar a ser *p*-cumaril-CoA mediante la CoA-ligasa. El *p*-cumaril-CoA sufre una condensación con 3 moléculas de malonil-CoA, para dar lugar a una tetracetona, y después ocurre la ciclación de la tetracetona lineal, con liberación de cuatro moléculas de CO₂ a través de la enzima estilbena sintasa, que origina como producto final el *trans*-resveratrol (Figura 5) (King *et al.*, 2006; Ávalos y Pérez-Urria, 2009; Lucas, 2009; Pannu y Bhatnagar, 2019).

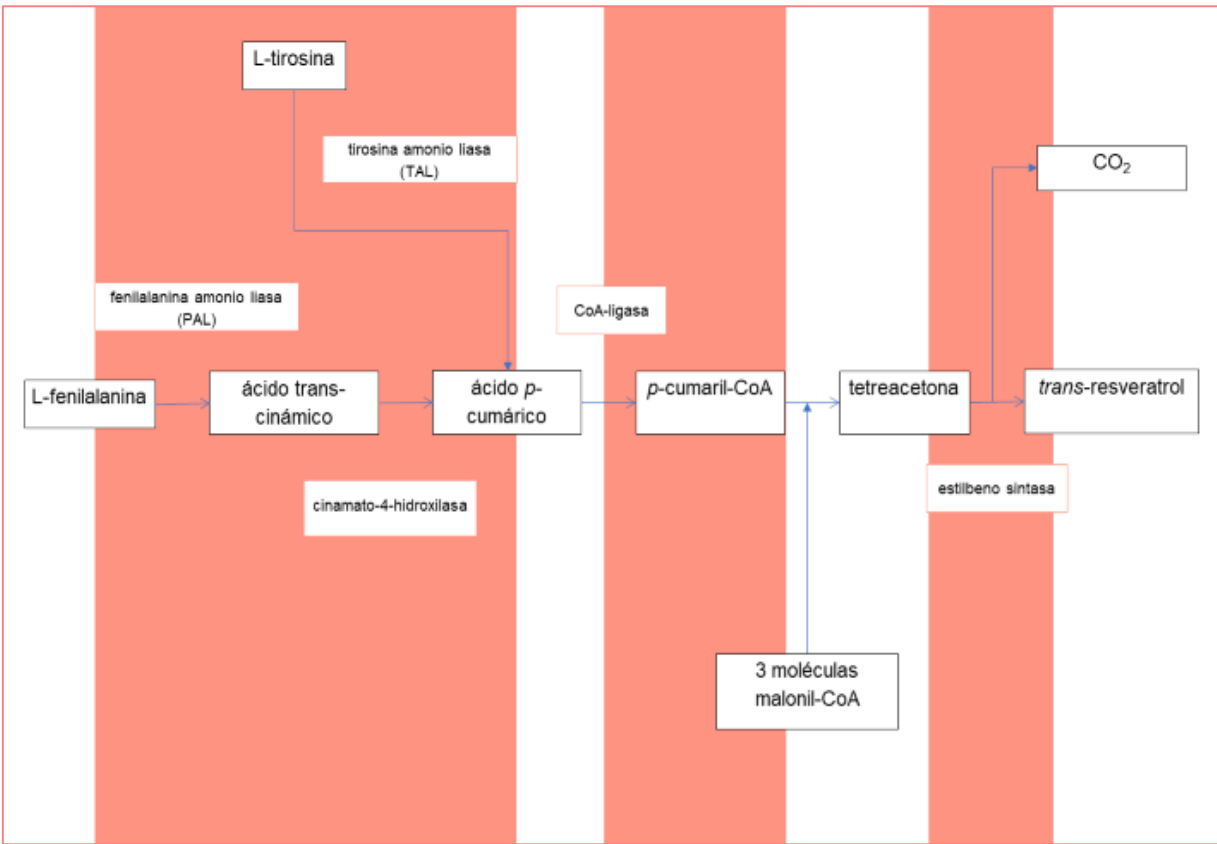


Fig. 5 Principal vía de biosíntesis del RES en la naturaleza
(Modificado de Ávalos y Pérez-Urria, 2009)

El RES es una fitoalexina polifenólica con propiedad antioxidante, antitumoral, antiinflamatoria, antiteratogénica y antiproliferativa. Es sintetizado por las plantas en respuesta al estrés, lesión, infecciones por patógenos invasores, radiación UV, iones de metales pesados y sales (Paul *et al.*, 1999; Gambini *et al.*, 2013; Pannu y Bhatnagar, 2019). Se presenta de forma natural en al menos 72 especies de plantas, entre las más importantes las pertenecientes a la familia Vitaceae (Yang *et al.*, 2009), en plantas del género *Eucalyptus*, en algunas especies de pinos y bayas, en las raíces y tallos de *Polygonum cuspidatum*, en la hierba *Arachis hypogaea* (King *et al.*, 2006; Gambini *et al.*, 2013), en arbustos del género *Vaccinium* (Lyons *et al.*, 2003; Rimando *et al.*, 2004) en frutos mediterráneos como *Phoenix dactylifera* L, *Fragaria vesca* y *Lycopersicon lycopersicon* L. (Sebastià *et al.*, 2017) y en otros frutos como *Syzygium cumini* L., *Artocarpus heterophyllus* y *Morus rubra* (Shrikanta *et al.*, 2013).

La ingesta del RES ocurre de forma oral, tiene una tasa alta de absorción de aproximadamente del 70%, pero con una baja biodisponibilidad debido a su rápida metabolización, pues llega a presentar una vida media en plasma de 9.2 horas (Walle *et al.*, 2004; Kaldas *et al.*, 2010). El RES es absorbido por el intestino por medio de difusión pasiva y a través con la unión de transportadores de membrana (Kaldas *et al.*, 2010; Gambini *et al.*, 2015). Una vez en el torrente sanguíneo los metabolitos del RES y el RES libre pasan al hígado. El RES libre ingresa al hígado por medio de la unión a ácidos grasos por su alta afinidad al hígado, también al unirse a la albúmina y a lipoproteínas de baja densidad (Gambini *et al.*, 2015; Pannu y Bhatnagar, 2019).

El RES es metabolizado en el hígado mediante la fase II del metabolismo xenobiótico, lo cual es degradado a metabolitos los cuales son 2 formas isómericas de resveratrol monoglucurónido, dihidroresveratrol-monoglucurónido, resveratrol monosulfato y dihidroresveratrol-monosulfato a través reacciones de conjugación como la glucuronidación y la sulfatación (Walle *et al.*, 2004; Kaldas *et al.*, 2010; Gambini *et al.*, 2015) para finalmente ser eliminados por medio de la orina (Gambini *et al.*, 2013; 2015; Pannu y Bhatnagar, 2019).

El efecto antioxidante del RES se debe a la eliminación de RL, ERO y gracias a su poder reductor (Gülçin, 2010). En específico, gracias a sus tres grupos hidroxilo en especial el grupo 4'-hidroxilo el cual es el más reactivo. Las ERO que puede eliminar son, el $O_2^{\cdot-}$, el $\cdot OH$, el NO^{\cdot} , el NO_2^{\cdot} y el radical triclorometil-peroxilo (CCl_3OO^{\cdot}). Debido a su potencial redox es capaz reducir el $O_2^{\cdot-}$ y el $\cdot OH$ formando el radical fenoxilo de resveratrol. A esto se suma la eliminación de radicales de timidina, guanositriptofanilo, timidilo y guanosilo (Mahal y Mukherjee, 2006).

En medios acuosos, el trans-resveratrol elimina eficazmente radicales, como el radical $\cdot OH$ es por medio del mecanismo de transferencia secuencial de protones y electrones (SEPT en donde: $RES + \cdot OH \rightarrow RES^+ + OH^- \leftrightarrow RES (-H)^{\cdot} + H_2O$), y se oxida a semiquinona. Con respecto al radical hidroperoxilo ($\cdot OOH$) es mediante el mecanismo de transferencia del átomo de hidrógeno (HAT en donde: $RES + \cdot OH \rightarrow RES (-H)^{\cdot} + H_2O$), y se oxida por la abstracción de los átomos H de los anillos fenólicos (Luga *et*

al., 2012). Así mismo el potencial antioxidante del polifenol se debe a la reducción de la peroxidación lipídica (Gülçin, 2010; Mikstacka *et al.*, 2010) y la hemólisis oxidativa (Mikstacka *et al.*, 2010).

Antecedentes NIC

Inducción de ERO

Se tienen reportes en donde se demuestra la inducción de la producción de ERO por parte de la NIC como lo encontrado por Crowley-Weber *et al.* (2003) en donde la NIC a una concentración 0.8 mM fue capaz de incrementar la producción de ERO en especial el H₂O₂ en la línea celular de colon HCT-116. A concentraciones bajas de NIC 0.1, 1 y 10 µM Barr *et al.* (2007) reportaron un aumento en la generación de ERO de manera concentración-dependiente en células mesencefálicas de rata. Lin *et al.* (2012) encontraron que la NIC 1 mM genera inducción de estrés oxidativo, lo que originó un aumento el nivel de peroxidación de lípidos en embriones de ratón cultivados. Bodas *et al.* (2016) reportaron que la NIC 5 mM aumenta significativamente los niveles de ERO intracelular, en cultivo de células epiteliales bronquiales humanas.

Kim *et al.* (2016) reportaron un aumento en la generación de ERO en células epiteliales tubulares humanas tratadas con NIC en un rango de 50-400 µM de una manera concentración-dependiente. Así mismo, Lan *et al.* (2016) encontraron que la NIC 0.01 y 0.1 µM estimula la generación de ERO lentamente, mientras a concentraciones 1 y 10 µM aumenta rápidamente en el cultivo celular de podocitos humanos. Por último, Marinucci *et al.* (2018) demostraron que la NIC 0.1 ó 1 µM induce a la acumulación intracelular del H₂O₂ y de manera paralela ocasiono una reducción en la actividad enzimática de la Catalasa (CAT), Glutación peroxidasa (GPx) y Superóxido dismutasa 1 (SOD1).

Inducción de la apoptosis

Se tienen bastantes informes en donde indican la capacidad de la NIC de causar la inducción del proceso apoptótico, esta activación puede deberse mediante la activación

vía caspasas. Se ha indicado el incremento de la actividad de las caspasa-3 (CASP 3) y caspasa-7 (CASP 7) en células epiteliales bronquiales humanas, empleando una concentración de NIC a 5 mM (Bodas *et al.*, 2016). También se tiene que la NIC provoca apoptosis en células epiteliales tubulares humanas “células HK-2” a 200 y 400 μ M (Kim *et al.*, 2016) y en los podocitos de la capsula de Bowman de los riñones a 0.1, 1 y 10 μ M de manera concentración-dependiente (Lam *et al.*, 2016) por medio de la vía de señalización NF- κ B; dicha apoptosis se reflejó en el aumento de la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax y en la inhibición de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Kim *et al.*, 2016; Lam *et al.*, 2016) y además promovió la activación de la CASP 3 (Lam *et al.*, 2016).

Cao *et al.* (2017) encontraron que a concentraciones 10 y 50 μ M la NIC disminuye la viabilidad celular y aumenta la apoptosis de las HUVECs mediante la ubiquitinación y degradación de Akt por medio de la proteína TTC3 y la proteína mitocondrial MUL1. Jalili *et al.* (2017) reportaron que la NIC a 2.5 mg/kg de peso/día desencadenó apoptosis en células renales y hepáticas de ratones machos BALB/c al aumentar la expresión de los genes *Casp2*, *Casp3* y *Bax* sumado a una fragmentación del DNA. Recientemente, Marinucci *et al.* (2018) reportaron que la NIC 0.1 y 1 μ M promovió una disminución en la viabilidad celular, y aumento en el proceso apoptótico mediante la desensibilización de NF- κ B y la activación de la CASP 3.

Supresión de la apoptosis

Referente al poder antiapoptótico de la NIC, Haiqiang *et al.* (2003) demostraron que la NIC 1 μ M puede estimular potentemente la fosforilación endógena de Bcl2 en su sitio Ser70 por medio de la cascada de señales descendente en una línea celular de cáncer de pulmón de células pequeñas SCLC NCI-H69. A una concentración baja de NIC 0.5 μ M se tiene reporte de su efecto antiapoptótico, pues hay una disminución en la apoptosis debido a la activación de la GTPasa Ras responsable de la sobreexpresión de la MAP quinasa la cual provoca un reingreso al ciclo celular. Además, Ras genera la activación vía descendente de PI3K la cual a su vez previene y suprime la activación de la apoptosis en células epiteliales de pulmón de ratón (Chu *et al.*, 2005).

Cuccina et al. (2012) reportan una disminución en la apoptosis provocada por la NIC 1 μM por medio de la activación de las vías PI3K/Akt y PKC/ERK1/2 en dos líneas celulares de cáncer colorrectal humano (células Caco-2 y HCT-8). Además, la NIC en un rango de 0.1-1 mM también provocó un incremento en la proliferación celular de manera concentración-dependiente. Guha et al. 2014 demuestran un efecto protector de la NIC a 1-100 μM sobre la apoptosis de manera concentración-dependiente, generado al estimular inhibidor estauro-esporina (STS) a través de la vía STAT3/LGALS3 en la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Por último, Jalili et al. (2017) reportaron que la NIC a 2.5 mg/kg de peso/día tuvo un efecto en la supresión de la apoptosis en las células del corazón y pulmón de ratones machos BALB/c, al reportar la disminución de la expresión de genes involucrados en la apoptosis como son *P53*, *Bcl-2*, *Casp2* y *Casp3*.

Efecto genotóxico

La NIC, es capaz de generar genotoxicidad en células de la amígdala palatina y en linfocitos periféricos a 0.5, 1, 2 y 4 mM, en células de la glándula parótida (mini cultivos de órganos) a 2 mM y 4 mM y en una línea celular epitelial primaria de glándulas salivales a 100 y 1000 μM , con inducción de daño al DNA, reflejado en las roturas de una sola hebra que sufrió el DNA (Kleinsasser *et al.*, 2005; Ginzkey *et al.*, 2010, 2014). Así mismo, Ginzkey et al. (2014) encontraron genotóxica la NIC 10 μM al generar la formación de micronúcleos, y a concentraciones 1, 10, 100 y 1000 μM produjo aberraciones cromosómicas “numéricas y estructurales” de forma concentración-dependiente.

Con el uso de SMART en ala de *D. melanogaster* cruza CE se ha reportado la genotoxicidad de la NIC (Gómez, 2017) con una concentración alta de NIC 11.4 mM, lo que resulta en un incremento en la frecuencia de clones pequeños y totales. Por último, Magaña (2017) utilizando NIC a 12.5 μM , resultó positiva al incrementar la frecuencia de clones pequeños, grandes y totales.

Debido al incremento del estrés oxidativo, la reducción de la longevidad y la pérdida de funcionalidad que generan las ERO (Zorrilla, 2002), en la actualidad ha aumentado el consumo de antioxidantes en la dieta. Los principales efectos benéficos de los antioxidantes están relacionados con la reducción del daño por estrés oxidativo y protección de la degradación de las mitocondrias (Zorrilla, 2002). Un antioxidante es una molécula que en concentraciones bajas es capaz de evitar o retardar la oxidación de un sustrato oxidable actuando como donador de electrones gracias a sus propiedades reductoras. En la reacción de oxidación se pueden generar RLs que generan reacciones en cadena lo que significa que cuando un radical roba un electrón, se forma un segundo radical que a su vez ejerce la misma acción en otra molécula y así sucesivamente. El antioxidante funciona al prevenir o romper esta cadena al quitar intermedios del radical o estabilizando radicales lo que conlleva a su oxidación (Gupta *et al.*, 2014; Burton y Ingold, 2015). De tal forma que diferentes antioxidantes reaccionan con diferentes ERO a tasas variables y en lugares diferentes, protegiendo diferentes objetivos moleculares (Burton y Ingold, 2015).

En los últimos años ha cobrado gran interés el consumo de antioxidantes provenientes del metabolismo secundario de las plantas, tales como los polifenoles. Estos presentan diversas propiedades biológicas entre las que destacan actividad antiradical, antimicrobiana, antiproliferativa, anticancerígena, antimutagénica, antiteratogénica y antioxidante (Hernández y Prieto, 1999).

Antecedentes RES

Efecto no genotóxico

Se tienen reportes en donde se demuestra que el RES no presenta un efecto genotóxico como lo encontrado por Türkez y Şişman, quienes en el 2012 emplean la prueba de aberraciones cromosómicas (CA) y el ensayo de intercambio de cromátides hermanas (SCE) no encontraron efecto genotóxico en linfocitos periféricos humanos, ya que no provoca un aumento en la frecuencia de SCE espontáneas por metafase y ni aberraciones cromosómicas a concentraciones bajas (10, 15 y 25 μM) como altas

(40, 75 y 100 μM). Yan et al. (2012) con el uso del ensayo cometa *in vitro* demuestran que el RES a concentraciones 5, 25 y 50 μM no indujo daño al DNA de los linfocitos periféricos humanos. Por otro lado, Abraham et al. (2016) empleando una prueba de micronúcleos *in vivo* e *in vitro* encuentran que el RES 0.05, 0.5 y 5 μM no es tóxico porque no generó un aumento en la frecuencia de micronúcleos. También se ha reportado el efecto no genotóxico del RES en la prueba SMART en ala de *D. melanogaster* cruza CE ya que Gómez (2017), encuentra un incremento en clones pequeños y totales, pero sin presentar diferencias significativas.

Supresión de la proliferación celular

Referente al poder antiproliferativo del RES, Zhou et al. (2009) reportaron que el RES a 12.5-100 μM disminuyó la viabilidad celular y además provocó la supresión de la síntesis de DNA en células de carcinoma hepático y de mama humano. Al igual que lo encontrado por Fernández et al. (2012) en donde demuestran una baja proliferación celular causada por el RES a 10-100 μM en líneas celulares de leucemia aguda humana (JURKAT E.6 y THP-1) y a causa de una baja viabilidad se produjo la detención del ciclo celular en la fase S. También se ha demostrado que el RES a concentraciones que oscilan entre 0.5-10 μM reduce la proliferación celular y a una concentración de 10 μM genera la activación de varios genes apoptóticos dependientes de p53 que incluyen *P53*, *C-FOS*, *C-JUN*, *P21* (*waf1 /Cip1*), *PIG3* y *BAD* en una línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231) (Chin *et al.*, 2014). Finalmente, Heo et al. (2018) reportan el efecto antiproliferativo del RES en la línea celular de melanoma (A375SM) a concentraciones muy bajas (10^{-2} , 10^{-1} , 1, 5 y 10 μM), esto a través de la expresión de genes reguladores del ciclo celular como *P21*, *P27*; por otro lado, también ocasionó apoptosis a 10 μM por una alta expresión de la proteína p53 provocando un incremento del factor pro-apoptótico bax.

Inducción de la proliferación celular

Se tienen informes en donde indican la capacidad del RES de ocasionar un incremento en la proliferación celular. Mikula et al. (2012) demostraron que el RES 0.1, 0.5 y 1 μM

generó un incremento en la tasa proliferativa de células mesoteliales peritoneales humanas jóvenes (HPMC) lo que significó que dichas células retardaran su entrada a la senescencia y una concentración de 0.5 μM provoca una detención celular en la fase S. Igualmente Kumar et al. (2016) encontraron a concentraciones bajas de RES 1, 10 y 20 μM provoca un aumento en la proliferación de células progenitoras neurales esto a través por la fosforilación de las quinasas (ERK) y p38 MAP-quinasa. Mientras Luengo et al. (2017), encontraron que el RES 1 y 10 μM generó un aumento en la proliferación celular en una línea celular de adenocarcinoma colorrectal (células HT-29). Por último, Andreani et al. (2017) reportaron que el tratamiento *in vivo* del RES 1 $\mu\text{g}/1\text{mL}$ incrementó la proliferación de cáncer de mama asociada con la baja expresión de la proteína Er α y una alta expresión de la proteína $\Delta 16\text{HER2}$. Así mismo de forma *in vitro* el RES a 10, 20 y 30 μM también aumentó la proliferación en líneas celulares tumorales CAM6 y BT474.

Actividad pro-oxidante

El RES es distinguido por sus propiedades antioxidantes, sin embargo, existe bastante información del efecto pro-oxidante del RES. Por una parte, al incubar células de leucemia promielocítica humana (HL-60) con H_2O_2 , se desencadena la apoptosis y se acidifica el medio citosólico. El RES a una concentración de 8 μM generó un incremento en la concentración de $\text{O}_2^{\cdot-}$ intracelular y también contrarresta la acidificación del medio citosólico, inhibe la actividad de la CASP 3 y la caspasa-9 (CASP 9) y la fragmentación del DNA inducida por el H_2O_2 (Ahmad *et al.*, 2003). De igual manera Low et al. (2010) encontraron en células de leucemia humana que el RES 10, 20 y 30 μM generó estrés oxidativo al inducir altos niveles de $\text{O}_2^{\cdot-}$ mitocondrial, lo que provocó la disminución del potencial transmembrana y la disminución de la viabilidad celular. Igualmente, Martins et al. (2014) reportaron el incremento del estrés oxidativo producido por el RES 0.1, 1, 10 y 50 μM , gracias a la generación de especies reactivas de manera concentración-dependiente sumado por una reducción de la actividad antioxidante de SOD en células estrelladas hepáticas activadas (HSC). Por otro lado, Mikula et al. (2014) encontraron que concentraciones bajas de RES 0.5 y 10 μM tuvieron un efecto pro-oxidante debido

al incremento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial y a su vez hubo un aumento de ERO en las HPMC. Por último, Pignitter et al. (2016) reportan el efecto pro-oxidante del RES 1 y 10 μM y sus metabolitos conjugados mediante la prueba de la actividad antioxidante total *in vitro* ya que fueron capaces de generar la peroxidación del ácido linoleico.

Activación de sirtuinas

Referente a la activación y promoción de las sirtuinas por parte del RES, se sabe que en *D. melanogaster* en la cepa Canton-S el RES es capaz de aumentar la actividad enzimática de Sir2 por medio de la desacetilación de proteínas reflejándose un incremento en la vida útil (Wood *et al.*, 2004). También se ha demostrado que el RES activa a las sirtuinas, en específico SIRT5 de humanos a 0.2 mM (Gertz *et al.*, 2012) y Sirtuina-1 desacetilasa dependiente de NAD (SIRT1) de humanos a 200 μM (Lakshminarasimhan *et al.*, 2013) a través de la estimulación de la deacetilación de péptidos y sustratos de proteínas dependientes de SIRT5 y SIRT1 (Gertz *et al.*, 2012; Lakshminarasimhan *et al.*, 2013). Lin et al. (2012) demostraron en un modelo de rata que la interacción RES-NIC $1 \times 10^{-8} \mu\text{M} + 1 \text{ mM}$ y $1 \times 10^{-7} \mu\text{M} + 1 \text{ mM}$ incrementó la expresión génica de la SIRT1 y enzimas antioxidantes como SOD1, la superóxido dismutasa 2 (SOD2), glutatión peroxidasa 1 (GPx-1), La glutatión peroxidasa 4 (GPx-4) y una disminución en CASP 3. Liu et al. (2012) demostraron que el RES 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ aumenta la interacción de la lámina A con la SIRT1, lo que conlleva a la activación de la sirtuina y un aumento en su actividad desacetilasa en células madre adultas (ASC) de ratones *Zmpste24 - / -*. Finalmente, Desquiret et al. (2013) encontraron que el RES 1 y 5 μM tiene la capacidad de activar a SIRT3 por medio del incremento de la actividad del complejo mitocondrial I generando la oxidación de NADH en células HepG2.

Efecto genotóxico del RES en co-tratamiento con NIC

Recientemente Gómez, (2017) reportó el efecto genotóxico de la interacción RES-NIC empleando dos concentraciones de RES 0.40 y 11 μM , los co-tratamientos que resultaron genotóxicos fueron RES-NIC (0.40 $\mu\text{M} + 1.9 \text{ mM}$) y RES-NIC (11 $\mu\text{M} + 0.456$,

1.9 y 3.8 mM) por el incremento en la frecuencia de todos los tipos de clon al compararse con sus testigos en SMART en ala de *D. melanogaster* cruza CE. De igual manera, Magaña (2017) utilizando la misma cruza encontró genotóxico el co-tratamiento RES-NIC 11 μ M + 25 μ M por el aumento de la frecuencia de clones pequeños, grandes y totales en relación con sus testigos. Carmona (2018) estudió la cruza BE y encontró que los co-tratamientos RES-NIC 11 μ M + 0.94 y 3.8 mM fueron genotóxicos.

Justificación

El consumo de tabaco por tiempos prolongados incrementa el riesgo de desarrollar muchos problemas de salud, causa daño a casi todos los órganos del cuerpo y ocasiona enfermedades cardíacas, accidentes cerebrovasculares y diversos tipos de cánceres. El tabaco y el humo del tabaco contienen muchas sustancias químicas y partículas, entre ellas la NIC. Dicho alcaloide es la sustancia que causa la adicción al tabaco, se considera como un carcinógeno indirecto, con potencial de conducir a la carcinogénesis, agente apoptótico e inducir genotoxicidad por medio de la generación de RL y ERO lo cual genera estrés oxidativo y daño al DNA. Es por lo que se buscan métodos alternativos que puedan contrarrestar los efectos negativos de la NIC.

Uno de los más importantes es el consumo de antioxidantes en la dieta, ya que son capaces de detener o limitar el daño oxidativo de diferentes compuestos. Uno de los que destaca más en la actualidad es el RES por su alta capacidad antioxidante y efectos antienvjecimiento a través de la activación de sirtuinas. Aunque cabe señalar que el RES también ha presentado citotoxicidad y un efecto pro-oxidante *per se* y en co-tratamiento con diferentes compuestos. Por ende, los reportes previos sobre los efectos benéficos del RES no muestran resultados claros y en algunos casos son contradictorios; por consiguiente, es necesario realizar más estudios *in vivo*, como lo es la prueba SMART, con la finalidad de presentar resultados confiables que ayuden aclarar la capacidad benéfica del RES sobre los efectos nocivos producidos por la NIC.

Hipótesis

Debido a que se han reportado efectos antioxidantes del RES empleando concentraciones bajas y por su participación en la eliminación de RL y ERO. Además, la NIC genera daño por medio de la generación de ERO, se espera que el RES en co-tratamiento con la NIC disminuya los efectos genotóxicos provocados por esta última.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el posible efecto quimioprotector del RES sobre la toxicidad y genotoxicidad de la NIC en co-tratamiento empleando SMART en ala de *D. melanogaster*, cruza BE.

Objetivos particulares

Establecer la concentración toxica de los tratamientos de la NIC y en co-tratamiento con el RES en las cepas flare y Oregon R(R)-flare³ de *D. melanogaster*.

Comprobar el daño genotóxico de la NIC a las concentraciones 470, 940, 1880, 3760 y 11280 μM en la cruza BE.

Determinar el efecto del RES a 0.40 μM en tratamiento y co-tratamiento con NIC a 470, 940, 1880, 3760 y 11280 μM en la cruza BE.

Materiales y métodos

Materiales químicos

- ❖ RES (CAS No. 501-36-0 Sigma-Aldrich® 99% de pureza, St. Louis, MO, USA).
- ❖ NIC (CAS No. 54-11-5 Sigma-Aldrich® 99% de pureza, St. Louis, MO, USA).
- ❖ DMN (CAS No. 3632-1g Sigma-Aldrich® 99% de pureza, St. Louis, MO, USA).
- ❖ EtOH (CAS No. 64-27-5 Merck KGaA® 99% de pureza Darmstadt, Alemania).
- ❖ Agua miliQ (agua bidestilada).
- ❖ Nipagin metilparabeno (Tegosept)
- ❖ Ácido propiónico (CAS 7664-38-2 Merck KGaA® Darmstadt, Alemania)
- ❖ Hojuelas de papa deshidratada marca Maggie®.

- ❖ Levadura fresca activada marca La Florida®.
- ❖ MIC (Medio Instantáneo Carolina, Carolina Biological Supply Company. Burlington, North Carolina. USA).
- ❖ Entellán (CAS 1.07961. Merck KGaA® Darmstadt, Alemania).

Materiales biológicos

- ❖ Cepas de *D. melanogaster*: (multiple wing hair “*mwh/mwh*”, flare “*flr³*/TM3, Bd^{ser}” y Oregon R(R)-flare³ “ORR (1); ORR (2); *flr³* TM3, Bd^{ser}”) cepas otorgadas por el Laboratorio de Toxicología Genética de la FES Iztacala UNAM.

Prueba de toxicidad para los tratamientos de NIC y en co-tratamiento con el RES en las cepas flare y Oregon R(R)-flare³ de *D. melanogaster*.

Cultivo y propagación de las cepas de *D. melanogaster*

Las cepas Oregon R(R)-flare³ y flare de *D. melanogaster* (Anexo I.) se propagaron y se mantuvieron a 25°C con un 60% de humedad relativa (HR), en frascos de vidrio estériles, de 250 mL. A cada frasco se le colocaron 5 g de hojuelas de puré de papa y se le añadieron 20 mL de solución conservadora, la cual incluye 5 mL de tegosept al 12% disuelto en alcohol y 5 mL de ácido propiónico, que tiene función fungicida y bactericida (Dueñas *et al.*, 2002); los frascos se cubrieron con tapones de hule espuma, y permanecen en completa oscuridad. Se propagaron los organismos hasta llegar a tener aproximadamente 10 frascos por cepa, para esto cada tercer día los organismos eran trasvasados; antes de que se cambiaran los organismos a nuevos frascos estériles se verificó que no se perdieran los marcadores genéticos característicos de cada cepa, para lo cual los organismos se manipularon con CO₂ (Figura 6).

Colecta de huevos y recuperación de larvas

Previamente para la colecta de huevos se realizó la activación de la levadura fresca con sacarosa y se dejó reposar en frascos estériles de 250 mL, por 24 h. Después se colocaron los organismos adultos de las cepas en los frascos con levadura activada

por 8 h en incubación a 25°C, con un 60% de HR en total oscuridad; después de transcurrir las 8 h, los adultos fueron devueltos a sus frascos de origen y los frascos con la puesta se incubaron por 72 ± 4 h, y posteriormente se recuperaron larvas de tercer estadio esto al diluir la levadura con agua tibia y utilizando una coladera de malla fina (Graf *et al.*, 1984).

Diseño experimental

Se colocaron 10 larvas de tercer estadio por cada de tubo de ensayo de tal forma que contenían 0.5 gr de MIC anteriormente hidratados con 2 mL de los tratamientos y co-tratamientos correspondientes que se muestran en la Tabla I. Después, los tubos con tapones de hule espuma se incubaron bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas hasta que emergieran las moscas adultas, estas moscas se colectaron y se mantuvieron en alcohol al 70%. Se realizaron tres experimentos independientes con cinco repeticiones por concentración y se cuantificó la sobrevivencia de éstos.

Tabla I. Tratamientos y co-tratamientos utilizados en la prueba de toxicidad.

Testigo negativo	Tratamientos NIC	Testigo solvente	Tratamiento RES	Co-tratamientos RES-NIC
Agua miliQ	470 μ M	EtOH 1%	RES 0.40 μ M	0.40 μ M + 470 μ M
	940 μ M			0.40 μ M + 940 μ M
	1880 μ M			0.40 μ M + 1880 μ M
	3760 μ M			0.40 μ M + 3760 μ M
	11280 μ M			0.40 μ M + 11400 μ M

Análisis estadístico de los datos

Con respecto a los datos, se analizaron con la prueba Kruskal-Wallis; la cual es la alternativa no paramétrica al test ANOVA simple para datos no pareados, donde no asume normalidad en los datos. Se trata de una extensión del test de Mann-Whitney

para más de dos grupos. La prueba de Kruskal-Wallis contrasta si las diferentes muestras están equitativamente distribuidas y que por lo tanto pertenecen a una misma distribución (población). Bajo ciertas simplificaciones se considera que el test de Kruskal-Wallis compara las medianas (Durán *et al.*, 2012). Las suposiciones son las mismas que se utilizan para la prueba de Mann-Whitney basándose en las siguientes hipótesis:

- ❖ Hipótesis nula (H₀): Las k poblaciones son iguales por lo tanto no existen diferencias significativas entre los tratamientos y co-tratamientos. Por lo tanto, el efecto toxico de la NIC por si sola y en cotratamiento con RES no afecta la sobrevivencia de las cepas de *D. melanogaster*.

- ❖ Hipótesis alternativa (H_a): Al menos un par de poblaciones es diferente por lo tanto existen diferencias significativas en al menos dos tratamientos y co-tratamientos. De tal modo que se observaría el efecto toxico de la NIC por si sola o en cotratamiento con RES sobre la sobrevivencia de las cepas de *D. melanogaster*.

Prueba SMART en ala de *D. melanogaster*, cruza BE.

Cultivo y propagación de las cepas de *D. melanogaster*

Para esta prueba se necesitó propagar las cepas Oregon R(R)-flare³ y multiple wing hair (Anexo II.) tal y como se realizó en la prueba de toxicidad salvo que en el proceso de propagación se verificaron los marcadores genéticos *flr³* y *mwh*. Para lo cual los organismos fueron anestesiados con CO₂ para una mejor manipulación.

Producción de la cruza BE.

Esta cruza se caracteriza por su alta expresión de citocromos P450, lo que permite el análisis de compuestos promutágenos (Graf y van Schaik, 1992; Graf *et al.*, 1998; Spanó y Graf, 1998). Para ello se aislaron hembras vírgenes (Oregon R(R)-flare³ ORR (1); ORR (2); *flr³* TM3, Bd^{ser}) y machos (multiple wing hair *mwh/mwh*). Las hembras que

eclosionaban en un intervalo de 3 horas se durmieron para una fácil manipulación y se mantuvieron 5 hembras por tubo de ensayo, cada tubo con 0.5 gr de hojuelas de puré de papa y solución conservadora. Se incubaron durante 5 días bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas para determinar si las hembras eran vírgenes, pasando este intervalo de tiempo los tubos que presentaban el desarrollo de larvas no se tomaban en cuenta. Una vez obtenidos los adultos necesarios se cruzaron en una proporción de 1 macho por cada 2 hembras, la craza se mantuvo por tres días en frascos de vidrio estériles de 250 mL, con puré de papa y solución conservadora a condiciones de 25°C, con un 60% de HR y en completa oscuridad (Figura 6).



Fig. 6 Cultivo y mantenimiento de las cepas y la craza BE.

Colecta de huevos y recuperación de larvas

La colecta y propagación de la Cruza BE se realizó de la misma manera como se describió anteriormente en la prueba de toxicidad.

Diseño Experimental

Ya teniendo las larvas (72 ± 4 h) de la primera generación de la craza BE se colocaron en proporciones equitativas en tubos de ensayo con 0.5 gr de MIC anteriormente

hidratados con 2 mL de los tratamientos y co-tratamientos correspondientes que se mencionan en la tabla II. Seguidamente, los tubos se taparon con tapones de hule espuma y se incubaron a las mismas condiciones anteriormente mencionadas, se vigiló la emergencia de las moscas adultas, las que se colectaron y mantuvieron en alcohol al 70%. Se realizaron tres experimentos independientes con tres repeticiones por concentración.

Tabla II. Tratamientos y co-tratamientos utilizados para la prueba SMART.

Testigo negativo	Testigo solvente	Testigo positivo	Tratamientos NIC	Tratamiento RES	Co-tratamientos RES-NIC
Agua miliQ	EtOH 1%	DMN 0.076 μ M	470 μ M	RES 0.40 μ M	0.40 + 470 μ M
			940 μ M		0.40 + 940 μ M
			1880 μ M		0.40 + 1880 μ M
			3760 μ M		0.40 + 3760 μ M
			11280 μ M		0.40 + 11400 μ M

Diseción y montaje de las alas

Para esto primero se seleccionaron los adultos transheterocigotos (organismos con fenotipo silvestre) para después sexarlos, luego con unas pinzas tipo relojero se prosiguió a disectar las alas teniendo el cuidado de no rasgarlas más adelante se montaron las alas sin la mayor cantidad de alcohol en preparaciones permanentes con la resina Entellán®. Cada laminilla contiene 10 pares de alas en una proporción 1:1 lo que significa que son 5 hembras y 5 machos.

Análisis de laminillas y análisis estadístico de los datos

Se realizó la lectura de 60 individuos por tratamiento con ayuda del microscopio óptico a un objetivo de (40x) y con un estricto control de lectura es importante considerar que para tener resultados fidedignos el tamaño óptimo de muestra para el estadístico es de

un mínimo de 55 individuos por tratamiento (Frei y Würgler, 1995) aunque para algunos tratamientos no se alcanzaron los 55 individuos, al no contar con los suficientes individuos transheterocigotos *mwh+/+flr³* para la prueba SMART (Figura 7). Se analizó la parte dorsal y ventral de las alas con el método de doble ciego registrándose el número de clones mutantes y el tipo de clon de cada individuo (Anexo II) (Graf *et al.*, 1984).



Fig. 7 Preparaciones permanentes de los tratamientos y co-tratamientos

Con respecto a los datos obtenidos se procesaron con el programa SMART para PC versión 2.1, que evalúa con una regla de decisión múltiple basada en la prueba no paramétrica Kastenbaum-Bowman, con una probabilidad de ($p < 0.05$) (Frei y Würgler, 1988). Dicha prueba determina si el tratamiento a analizar incrementa las frecuencias de clones mutantes al ser comparado con su testigo negativo, he indica si son resultados débiles positivos, positivos, negativos e indecisos basándose en las siguientes hipótesis:

- ❖ Hipótesis nula (H_0): la frecuencia de las mutaciones inducidas y espontáneas encontradas en los individuos del tratamiento no es significativamente mayor a la frecuencia de mutación del testigo negativo. Por lo que se espera que los tratamientos NIC, el tratamiento RES o los co-tratamientos RES-NIC no resulten genotóxicos.

- ❖ Hipótesis alternativa (H_a): la frecuencia de las mutaciones inducidas y espontáneas de los individuos del tratamiento es significativamente mayor que la frecuencia de mutaciones encontrada en el testigo negativo. De manera que se encontraría un efecto genotóxico por parte de los tratamientos NIC, el tratamiento RES o los co-tratamientos RES-NIC.

Es importante aclarar que los clones mutantes pequeños existen en una mayor frecuencia que los clones grandes y gemelos, es por tanto que el programa SMART PC versión 2.1 genera un análisis por separado que ayuda a prevenir la sobreestimación del tipo de clon menos usual. Por lo tanto, si se da el aumento significativo de clones pequeños y totales el programa SMART PC versión 2.1 tiene el valor del factor de multiplicación $m=2$ y en tanto para los clones grandes y gemelos el valor cambia y es de $m=5$ (Frei y Würigler, 1988). Por todo lo anteriormente puntualizado se tienen las posibles hipótesis:

- ❖ Aceptar H_0 y rechazar H_a : negativo (-).
- ❖ Rechazar H_0 y aceptar H_a : positivo (+).
- ❖ Rechazar H_0 y rechazar H_a : indeciso (i).
- ❖ Aceptar H_0 y aceptar H_a : débil positivo (w).

Cuando se obtienen resultados indecisos y débil positivo por el programa SMART PC versión 2.1 se utiliza la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney y Wilcoxon ($\alpha = \beta = 0.05$) usando el software estadístico STAT-Graphics versión 7.0, la prueba tiene como fundamento efectuar la comparación de dos poblaciones y establecer la diferencia de dispersión de los datos de un grupo respecto al otro los cuales no tienen una distribución normal (Frei y Würigler, 1995).

Por último, se empleó la prueba no paramétrica Kolmogorov-Smirnov con probabilidad de ($p < 0.05$), con el uso del software estadístico STAT-Graphics versión 7.0, para el análisis de la distribución del tamaño de clones *mwh*. La prueba se fundamenta en la

medición del grado de concordancia entre las distribuciones a evaluar por la comparación de sus frecuencias acumuladas (Graf *et al.*, 1984).

Resultados

Prueba de toxicidad

Los resultados de mortalidad de los tres experimentos independientes de la prueba de toxicidad se trabajaron con la prueba Kruskal-Wallis y se calcularon medidas descriptivas: media, desviación estándar (δ), valor mínimo, cuartil 1 (Q1), mediana, cuartil 3 (Q3) y valor máximo de los siguientes parámetros:

- A. Tratamientos NIC al compararse con su testigo agua MiliQ.
- B. Co-tratamientos NIC-RES y el tratamiento RES con su testigo EtOH 1 %.
- C. Comparación del porcentaje de mortalidad entre cepas (flare vs Oregon-flare).
- D. Interacciones concentración-cepa (flare vs Oregon-flare).

A. Tratamientos NIC al compararse con su testigo agua MiliQ

Los resultados de mortalidad de todos los tratamientos NIC y su testigo agua MiliQ arrojaron que las medias de todos los tratamientos NIC son distintas entre sí, y ninguna es igual a la del testigo agua MiliQ. Con respecto a las medianas, el testigo agua MiliQ y el tratamiento NIC 940 μM resultaron en 0, y para los demás tratamientos NIC son similares entre sí y existe una gran dispersión de los datos. La mortalidad más alta es para el tratamiento NIC a 11280 μM con el 37 % (Tabla III). Los datos arrojados por la prueba de Kruskal-Wallis indican que en todos los tratamientos NIC hubo diferencias significativas respecto al testigo agua MiliQ con valores ($H^* = 67.21$, $p = 0.000$); excepto el tratamiento NIC 940 μM y la concentración NIC 11280 μM fue subtóxica.

Tabla III. Medidas descriptivas de los porcentajes de mortalidad de cada tratamiento NIC y el testigo Agua MiliQ.

Compuesto	Concentración (µM)	Media	Desviación estándar	Valor mínimo	Q1	Mediana	Q3	Valor máximo
H ₂ O MiliQ	–	10.53	19.79	0	0	0	10	70
NIC 5	470	13.68	14.22	0	0	10	20	50
NIC 4	940	11.76	15.10	0	0	0	20	50
NIC 3	1880	18.95	26.64	0	0	10	20	90
NIC 2	3760	22	17.65	0	2.50	20	40	50
NIC 1	11280	37	29.75	0	5	40	60	90

B. Co-tratamientos NIC-RES y el tratamiento RES con su testigo EtOH 1%

Los resultados de mortalidad de todos los co-tratamientos NIC-RES, y el tratamiento RES y su testigo EtOH 1% demostraron que las medias de todos los co-tratamientos son diferentes entre sí, y ninguna es igual al testigo EtOH 1%. La media del tratamiento RES es muy similar al testigo EtOH 1%. Con respecto a las medianas, el testigo EtOH 1%, el tratamiento RES y el co-tratamiento a 940 + 0.40 µM resultaron en 10 y para los demás co-tratamientos son similares entre sí y existe una gran dispersión de los datos. La mortalidad más alta corresponde al co-tratamiento NIC-RES a 11280 + 0.40 µM con el 70% (Tabla IV y Figura 8). Los datos arrojados por la prueba de Kruskal-Wallis indican que hay diferencias significativas entre los co-tratamientos, el tratamiento RES y el testigo EtOH 1% con valores ($H^* = 69.76$, $p = 0.000$) y la interacción NIC-RES a la concentración de 11280 + 0.40 µM fue tóxica, y a las concentraciones 3760 + 0.40 y 470 + 0.40 µM fueron subtóxicas.

Tabla IV. Medidas descriptivas de los porcentajes de mortalidad de cada co-tratamiento NIC-RES y el testigo EtOH 1%.

Compuesto	Concentración [µM]	Media	Desviación estándar	Valor mínimo	Q1	Mediana	Q3	Valor máximo
EtOH	1%	12.78	19.76	0	0	10	20	60
RES	0.40	12.85	12	0	5	10	15	40
NIC5-RES	470 + 0.40	29	22.92	0	12.50	25	40	90
NIC4-RES	940 + 0.40	21.50	27.39	0	0	10	37	90
NIC3-RES	1880 + 0.40	24.12	12.28	0	20	20	39	50
NIC2-RES	3760 + 0.40	29	24.69	0	10	25	47	80
NIC1-RES	11280 + 0.40	70	22	20	52.50	80	80	100

Para nombrar los tratamientos NIC, los co-tratamientos NIC-RES, el tratamiento RES, el testigo negativo agua MiliQ, el testigo solvente EtOH 1 %, cepa flare y cepa Oregon-flare en las gráficas se utilizó la siguiente nomenclatura:

A: Agua MiliQ.

E: EtOH 1%.

N1: NIC 11280 µM, **N2:** NIC 3760 µM, **N3:** NIC 1880 µM, **N4:** NIC 940 µM y **N5:** NIC 470 µM.

NR1: NIC-RES 11280 + 0.40 µM, **NR2:** NIC-RES 3760 + 0.40 µM, **NR3:** NIC-RES 1880 + 0.40 µM, **NR4:** NIC-RES 940 + 0.40 µM y **NR5:** NIC-RES 470 + 0.40 µM.

R: RES 0.40 µM.

Flr: Cepa flare.

Or(r): Cepa Oregon-flare.

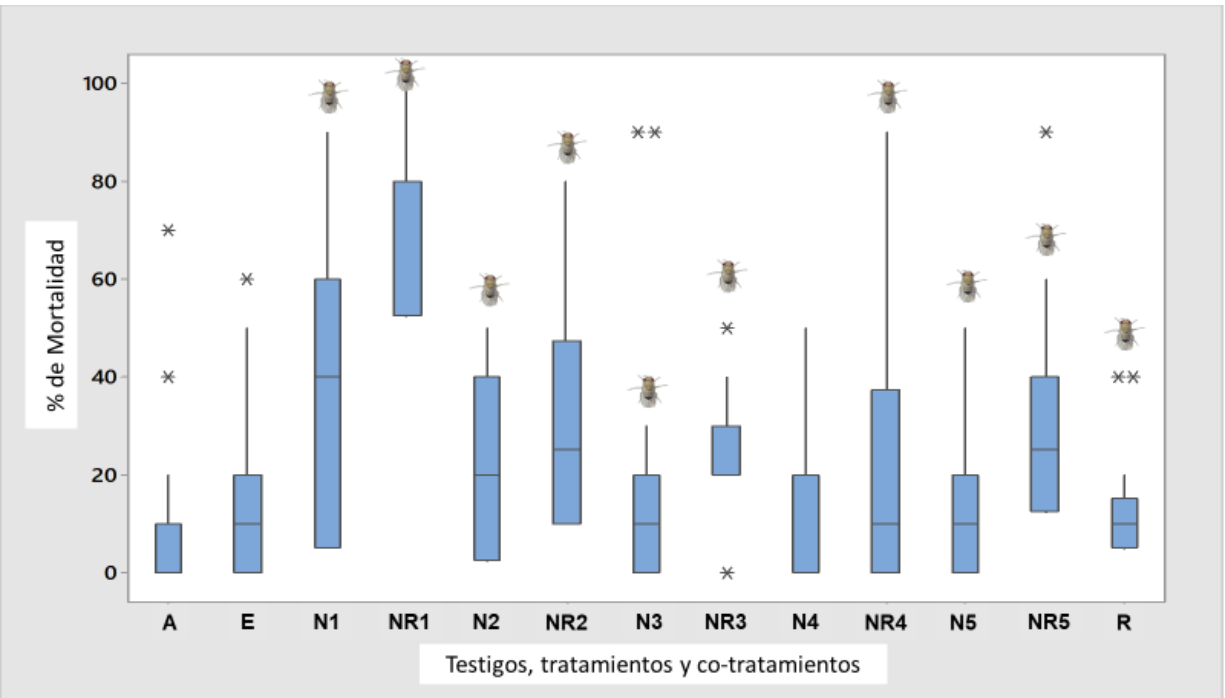



Fig. 8 Porcentaje de mortalidad de los tratamientos, los co-tratamientos y testigos negativos. Las cajas muestran la relación entre Q1, la mediana que está representada con una línea en medio y Q3. Se representa el 50% del total de los datos analizados, los valores mínimos y máximos están representados por las líneas de los extremos de las cajas y el * significa dato fuera del rango. Dónde:  muestra diferencias significativas ($p=0.000$) con respecto a los testigos negativos.

C. Comparación del porcentaje de mortalidad entre cepas flare vs Oregon-flare

Los resultados de mortalidad de la cepa flare y Oregon-flare arrojaron que las medias y medianas son distintas entre sí, los datos más altos los muestra la cepa Oregon-flare, aunque existe una gran dispersión de los datos; la mortalidad más alta es para la cepa Oregon-flare con el 37.59 % (Tabla V y Figura 9). Los datos arrojados por la prueba de Kruskal-Wallis indican que hay diferencias significativas entre ambas cepas ($H^*=67.21$, $p=0.000$).

Tabla V. Medidas descriptivas de los porcentajes de mortalidad de cada Cepa.

Cepa	Media	Desviación estándar	Valor mínimo	Q1	Mediana	Q3	Valor máximo
Flare	12.92	18.61	0	0	10	20	80
Oregon-flare	37.59	26.63	0	20	30	50	100

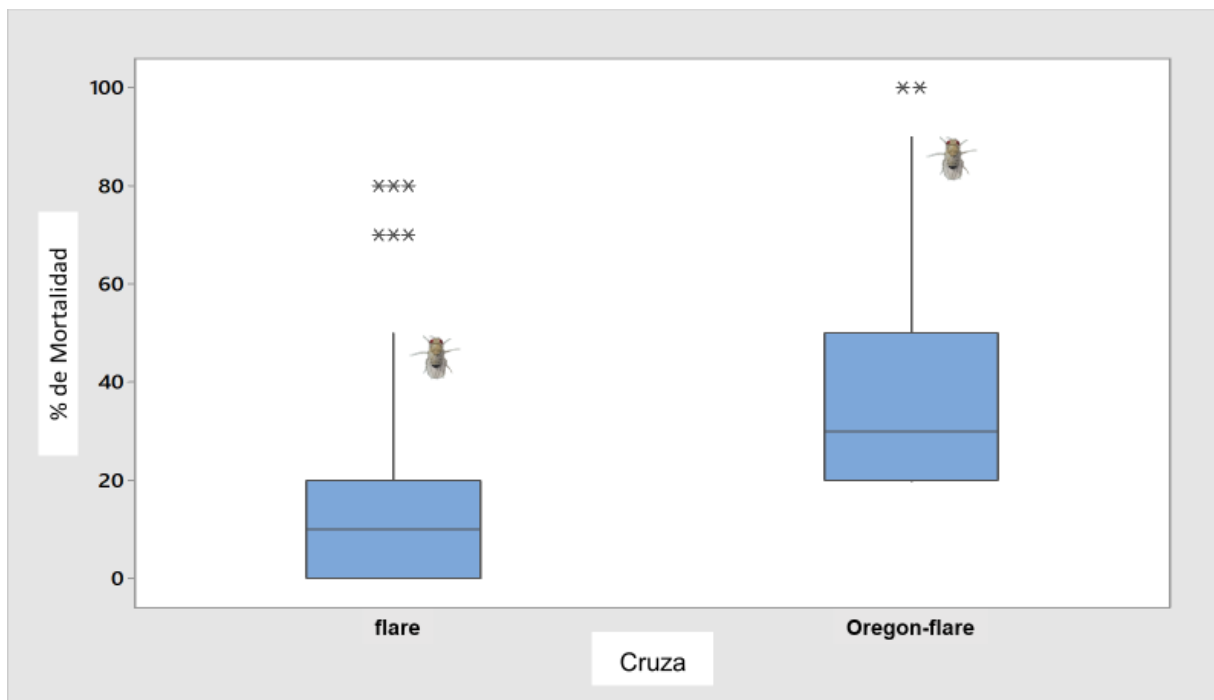



Fig. 9 Porcentaje de mortalidad de las cepas flare y Oregon-flare tratadas con NIC y en co-tratamiento con RES. Las cajas muestran la relación entre Q1, la mediana que está representada con una línea en medio y Q3. Se representa el 50% del total de los datos analizados, los valores mínimos y máximos están representados por las líneas de los extremos de las cajas y el * significa dato fuera del rango. Dónde:  muestra diferencias significativas ($p=0.000$) entre las cepas.

D. Interacciones concentración-cepa (flare vs Oregon-flare)

Los resultados de mortalidad para la cepa flare demuestran que las medias de todos los tratamientos NIC son distintas excepto las concentraciones más altas 3760 y 11280 μM y ninguna es igual a la del testigo agua miliQ. Lo que indica que la NIC no tuvo un efecto negativo sobre la sobrevivencia de *D. melanogaster* al presentarse porcentajes bajos de mortalidad. Con relación a las medianas, el testigo agua MiliQ y los

tratamientos NIC a 470 y 940 μM resultaron en 0 y para los demás tratamientos NIC son similares entre sí. Por otro lado, las medias de los co-tratamientos NIC-RES y el tratamiento RES son distintas entre sí y no son iguales respecto al testigo EtOH 1%, lo cual refleja que la interacción NIC-RES provoca una mayor mortalidad que la NIC o el RES por si solos. La mortalidad más alta con un 61% corresponde al co-tratamiento 11280 + 0.40 μM . Con respecto a las medianas el testigo EtOH 1% y el co-tratamiento a 940 + 0.40 μM fueron 0, el tratamiento RES y el co-tratamiento 3760 + 0.40 μM resultaron en 10, los co-tratamientos 470 + 0.40 μM y 1880 + 0.40 μM fueron 20 y el co-tratamiento 11280 + 0.40 μM tuvo el dato más alto, de 70, y con gran dispersión de los datos.

Para la cepa Oregon-flare las medias de los tratamientos NIC a 470 y 940 μM son iguales, las de los tratamientos NIC a 1880 y 3760 μM son muy similares y el tratamiento NIC a 11280 μM con el valor más alto y aparte ninguna es igual a la del testigo agua MiliQ, lo que denota que la NIC provocó una baja en la sobrevivencia al mostrar porcentajes altos de mortalidad en *D. melanogaster*. Con relación a las medianas, la del testigo agua MiliQ está por debajo de los tratamientos NIC, los tratamientos NIC a 470, 940 y 1880 μM son iguales. Por otra parte, las medias de los co-tratamientos NIC-RES son distintas y están por arriba del testigo EtOH 1% sin embargo la del tratamiento RES está por debajo del testigo EtOH 1%, lo que indica que la interacción NIC-RES generó elevados porcentajes de mortalidad. La mortalidad más alta con un 79% resultado de nuevo para el co-tratamiento 11280 + 0.40 μM . Con respecto a las medianas, la del tratamiento RES y el co-tratamiento 1880 + 0.40 μM son iguales y muy similares con la del testigo EtOH 1% y las de los demás co-tratamientos están por arriba del testigo EtOH 1% y existe una gran dispersión de los datos (Tabla VI y Figura 10). Finalmente se demuestra que la cepa Oregon-flare resultó ser más sensible.

No se pudo calcular una CL_{50} debido a que, en ningún parámetro y en ninguna concentración de NIC y su interacción NIC-RES se obtuvo un 100 % de mortalidad.

Los datos arrojados por la prueba de Kruskal-Wallis indican que hay diferencias significativas entre las interacciones cepa-concentración al ser comparadas entre sí

con valores ($H^* = 69.76$, $p = 0.000$). Encontrándose que las concentraciones de NIC a 11280 y 3760 μM fueron tóxica y subtóxica respectivamente y en todos los co-tratamientos fueron subtóxicos excepto el co-tratamiento NIC-RES a 11280 + 0.40 μM ya que este resultado ser tóxico.

Tabla VI. Medidas descriptivas de los porcentajes de mortalidad de cada cepa con sus respectivos tratamientos y co-tratamientos.

Cepa	Compuesto	Concentración (μM)	Media	Desviación estándar	Valor mínimo	Q1	Mediana	Q3	Valor máximo
flare	H ₂ O MiliQ	–	4	6.99	0	0	0	10	20
	EtOH	1%	2	4.22	0	0	0	2.50	10
	RES	0.40	7	6.75	0	0	10	10	20
	NIC 5	470	8	16.19	0	0	0	12.50	50
	NIC5-RES	470 + 0.40	16	12.65	0	0	20	30	30
	NIC 4	940	6	9.66	0	0	0	20	20
	NIC4-RES	940 + 0.40	4	12.65	0	0	0	0	40
	NIC 3	1880	7	8.23	0	0	5	12.50	20
	NIC3-RES	1880 + 0.40	17	8.23	0	10	20	20	30
	NIC 2	3760	13	14.18	0	0	10	22.50	40
	NIC2-RES	3760 + 0.40	10	9.43	0	0	10	12.50	30
	NIC 1	11280	13	16.36	0	0	10	20	50
NIC1-RES	11280 + 0.40	61	20.25	20	47.50	70	80	80	
Oregon-flare	H ₂ O MiliQ	–	17.78	23.33	0	0	10	30	70
	EtOH	1%	26.25	19.23	10	10	20	45	60
	RES	0.40	20	14.14	10	10	10	40	40
	NIC 5	470	20	8.66	10	15	20	20	40
	NIC5-RES	470 + 0.40	42	23.94	10	20	40	60	90
	NIC 4	940	20	18.26	0	0	20	30	50
	NIC4-RES	940 + 0.40	39	27.26	10	17.50	30	57.50	90
	NIC 3	1880	32.2	33.8	0	10	20	60	90

NIC3-RES	1880 + 0.40	34.29	9.76	20	30	30	40	50
NIC 2	3760	31	16.63	0	17.50	35	42.50	50
NIC2-RES	3760 + 0.40	48	19.89	20	30	45	70	80
NIC 1	11280	61	17.92	30	50	60	80	90
NIC1-RES	11280 + 0.40	79	20.79	30	75	80	92.50	100

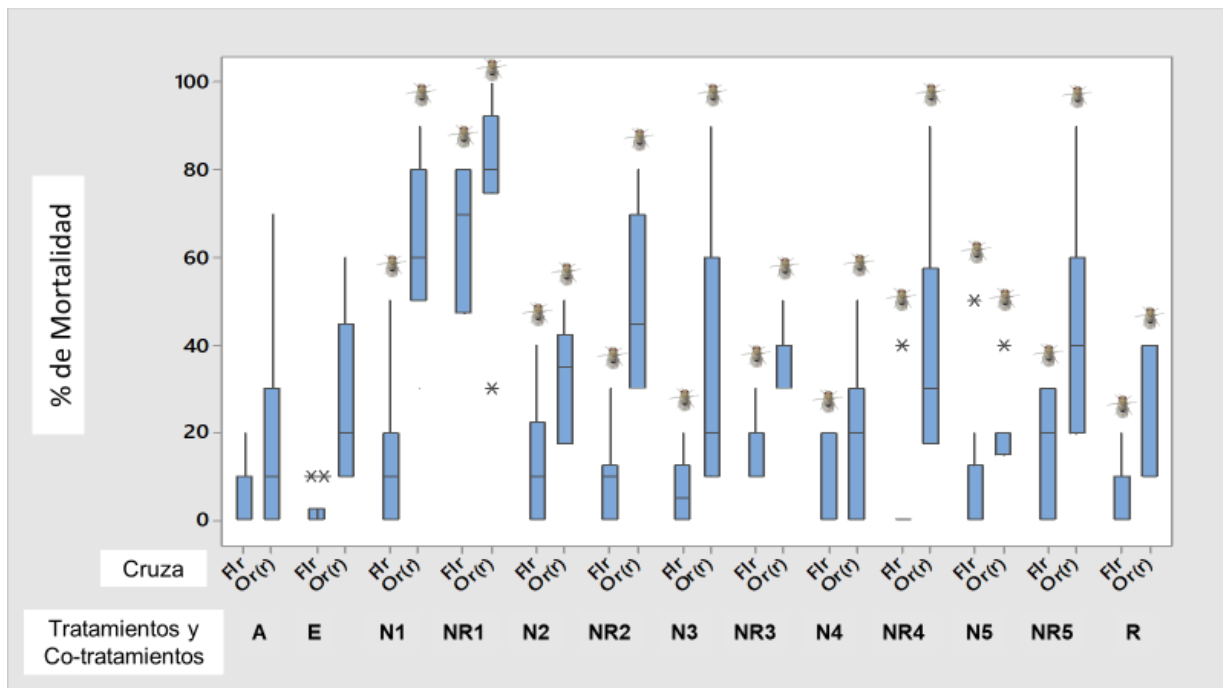



Fig. 10 Porcentaje de mortalidad de la interacción concentración-cepa de los tratamientos, los co-tratamientos y testigos negativos. Las cajas muestran la relación entre Q1, la mediana que está representada con una línea en medio y Q3. Se representa el 50% del total de los datos analizados, los valores mínimos y máximos están representados por las líneas de los extremos de las cajas y el * significa dato fuera del rango. Dónde:  muestra diferencias significativas ($p=0.000$) entre las cepas.

Prueba SMART en ala de *D. melanogaster*

Para la prueba SMART se revisaron 749 individuos (1498 alas) de los cuales se obtuvieron las frecuencias de clones mutantes (clones/individuo) (Tabla VII). Los resultados de los tratamientos, co-tratamientos y testigos de la tabla SMART en donde aparece indeciso por el programa SMART PC versión 2.1 al ser analizados con la

prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon, y se confirmaron como indeciso significativo (i/s) o indeciso negativo (i/n).

En relación a los resultados de las frecuencias acumuladas de clones *mwh*, se trabajaron con la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Tabla VIII). Los diagnósticos indican las diferencias estadísticas de los tratamientos NIC, el tratamiento RES y los co-tratamiento al compararse con sus respectivos testigos.

Tabla VII. Resultados de la prueba SMART en ala de *D. melanogaster* cruza BE. Frecuencias de clon/individuo de los tratamientos y co-tratamientos crónicos con un periodo de 48h.

Compuesto	Concentración (µM)	No. de Individuos	Manchas por individuo (número de manchas) diagnóstico estadístico*				
			Pequeñas (1-2 células) m = 2	Grandes (> 2 células) m = 5	Gemelas m = 5	Totales m = 2	Clones <i>mwh</i>
H₂O MiliQ (Testigo negativo) EtOH (Testigo solvente) DMN (Testigo positivo)							
H ₂ O MiliQ	–	35	0.54 (19)	0.06 (2)	0.00 (0)	0.60 (21)	21
EtOH	1%	35	0.34 (12)-	0.09 (3)i	0.03 (1)i	0.46 (16)-	16
DMN	0.076	30	2.93 (88)+	3.03 (91)+	0.57(17)+	6.53(196)+	179
H₂O MiliQ (Testigo negativo) NIC (Tratamientos nicotina)							
H ₂ O MiliQ	–	35	0.54 (19)	0.06 (2)	0.00 (0)	0.60 (21)	21
NIC 5	0.470	99	0.38 (38)-	0.07 (7)i/n	0.03 (3)i/n	0.48 (48)-	47
NIC 4	0.940	69	0.32 (22)-	0.07 (5)i/n	0.03 (2)i/n	0.42 (29 -	27
NIC 3	1880	58	0.47 (27)-	0.05 (3)i/n	0.07 (4)i/n	0.59 (34 -	34
NIC 2	3760	69	0.36 (25)-	0.06 (4)i/n	0.00 (0)i	0.42 (29 -	28
NIC 5 (Tratamiento) NIC5-RES (Co-tratamiento)							
NIC 5	0.470	99	0.38 (38)	0.07 (7)	0.03(3)	0.48 (48)	47
NIC5-RES	470 + 0.40	64	0.36 (23)-	0.11 (7)-	0.00 (0)-	0.47 (30)-	29
NIC 4 (Tratamiento) NIC4-RES (Co-tratamiento)							
NIC 4	0.940	69	0.32 (22)	0.07 (5)	0.03 (2)	0.42 (29)	27
NIC4-RES	940 + 0.40	66	0.42 (28)i/n	0.02 (1)-	0.02 (1)-	0.45 (30)-	30
NIC 3 (Tratamiento) NIC3-RES (Co-tratamiento)							
NIC 3	1880	58	0.47 (27)	0.05 (3)	0.07 (4)	0.59 (34)	34
NIC3-RES	1880 + 0.40	49	0.29 (14)-	0.08 (4)i/n	0.02 (1)-	0.39 (19)-	18

NIC 2 (Tratamiento) NIC2-RES (Co-tratamiento)							
NIC 2	3760	69	0.36 (25)	0.06 (4)	0.00 (0)	0.42 (29)	28
NIC2-RES	3760 + 0.40	78	0.59 (46)+	0.05 (4)-	0.03 (2)i/n	0.67 (52)+	52
EtOH (Testigo solvente) RES (Testigo resveratrol) NIC-RES (Co-tratamientos)							
EtOH	1%	35	0.34 (12)	0.09 (3)	0.03 (1)	0.46 (16)	16
RES	0.40	87	0.52 (45)i/n	0.06 (5)-	0.01 (1)-	0.59(51)i/n	51
NIC5-RES	470 + 0.40	64	0.36 (23)i/s	0.11 (7)i	0.00 (0)i/n	0.47 (30)-	29
NIC4-RES	940 + 0.40	66	0.42 (28)i/n	0.02 (1)-	0.02 (1)i/n	0.45 (30)-	30
NIC3-RES	1880 + 0.40	49	0.29 (14)-	0.08 (4)-	0.02 (1)i/n	0.39 (19)-	18
NIC2-RES	3760 + 0.40	78	0.59 (46)i/s	0.05 (4)-	0.03 (2)i/n	0.67(52)i/n	52
NIC1-RES	11280 + 0.40	10	0.40 (4)i/n	0.00 (0)i/n	0.00 (0)i/n	0.40 (4)i/n	4
RES (Testigo resveratrol) NIC-RES (Co-tratamientos)							
RES	0.40	87	0.52 (45)	0.06 (5)	0.01 (1)	0.59 (51)	51
NIC5-RES	470 + 0.40	64	0.36 (23)-	0.11 (7)i/n	0.00 (0)i/n	0.47 (30)-	29
NIC4-RES	940 + 0.40	66	0.42 (28)-	0.02 (1)-	0.02 (1)i/n	0.45 (30)-	30
NIC3-RES	1880 + 0.40	49	0.29 (14) ↓ +	0.08 (4)i/n	0.02 (1)i/n	0.39 (19)-	18
NIC2-RES	3760 + 0.40	78	0.59 (46)-	0.05 (4)-	0.03 (2)i/n	0.67 (52)-	52
NIC1-RES	11280 + 0.40	10	0.40 (4)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.40 (4)	4

*: Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würigler (1988); donde m: al factor de multiplicación de riesgo mínimo para evaluar resultados positivos (+), negativos (-), indecisos (i), indeciso significativo (i/s) y disminución del daño (↓+) a ($p < 0.05$).

Tabla VIII. Resultados del análisis de la distribución acumulada del tamaño de clones *mwh* en *D. melanogaster* cruza BE. Empleando la prueba de Kolmogorov-Smirnov con ($p < 0.05$).

Control	Tratamiento	p-level	Diagnóstico*
Comparación de los Experimentos			
H ₂ O MiliQ (Testigo negativo) vs EtOH (Testigo solvente)			
H ₂ O MiliQ	EtOH 1%	$p < 0.025$	+
H ₂ O MiliQ (Testigo negativo) vs NIC (Tratamientos nicotina)			
H ₂ O MiliQ	NIC 5 470 μ M	$p < 0.005$	+
	NIC 4 940 μ M	$p < 0.025$	+
	NIC 3 1880 μ M	$p < 0.025$	+
	NIC 2 3760 μ M	$p < 0.025$	+

NIC 5 (Tratamiento) vs NIC5-RES (Co-tratamiento)			
NIC 5 470 μM	NIC5-RES 470 μ M + 0.40 μ M	$p < 0.025$	+
NIC 4 (Tratamiento) vs NIC4-RES (Co-tratamiento)			
NIC 4 940 μM	NIC4-RES 940 μ M + 0.40 μ M	$p < 0.025$	+
NIC 3 (Tratamiento) vs NIC3-RES (Co-tratamiento)			
NIC 3 1880 μM	NIC3-RES 1880 μ M + 0.40 μ M	$p < 0.025$	+
NIC 2 (Tratamiento) vs NIC2-RES (Co-tratamiento)			
NIC 2 3760 μM	NIC2-RES 3760 μ M + 0.40 μ M	$p < 0.005$	+
EtOH (Testigo solvente) vs RES (Testigo resveratrol)			
EtOH 1%	RES 0.40 μ M	$p < 0.005$	+
EtOH (Testigo solvente) vs NIC-RES (Co-tratamientos)			
EtOH 1%	NIC5-RES 470 μ M + 0.40 μ M	$p < 0.025$	+
	NIC4-RES 940 μ M + 0.40 μ M	$p < 0.005$	+
	NIC3-RES 1880 μ M + 0.40 μ M	$p > 0.10$	-
	NIC2-RES 3760 μ M + 0.40 μ M	$p < 0.005$	+
	NIC1-RES 11280 μ M + 0.40 μ M	$p < 0.005$	+
RES (Testigo resveratrol) vs NIC-RES (Co-tratamientos)			
RES 0.40 μM	NIC5-RES 470 μ M + 0.40 μ M	$p < 0.005$	+
	NIC4-RES 940 μ M + 0.40 μ M	$p < 0.005$	+
	NIC3-RES 1880 μ M + 0.40 μ M	$p < 0.005$	+
	NIC2-RES 3760 μ M + 0.40 μ M	$p > 0.10$	-
	NIC1-RES 11280 μ M + 0.40 μ M	$p < 0.005$	+

* Diagnóstico estadístico donde (+) significativo y (-) no significativo

Testigo solvente EtOH 1% y el testigo positivo DMN

Al comparar el testigo EtOH 1% con el testigo agua MiliQ, no se encuentran diferencias significativas con la prueba de U Mann-Whitney a ($p < 0.05$) entre la frecuencia de clones de ningún tipo (Tabla VII y Figura 11). Sin embargo, hubo una alteración en la distribución de las frecuencias acumuladas de clones *mwh* y si hay diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Kolmogorov-Smirnov a ($p < 0.05$) con respecto al agua MiliQ (Tabla VIII y Figura 12). Por lo cual, se aprecia que el EtOH 1%

no tuvo un efecto genotóxico, pero si un efecto en la división celular de *D. melanogaster*.

Respecto al testigo positivo DMN a la concentración 0.076 μM al ser comparado con el testigo agua MiliQ se encontró un notorio incremento en todos los tipos de clones, lo cual se esperaba y hubo diferencias significativas con la prueba de U Mann-Whitney a ($p < 0.05$) en la frecuencia de todos los tipos de clones (Tabla VII y Figura 11), por lo que indica el efecto genotóxico de la DMN en *D. melanogaster*.

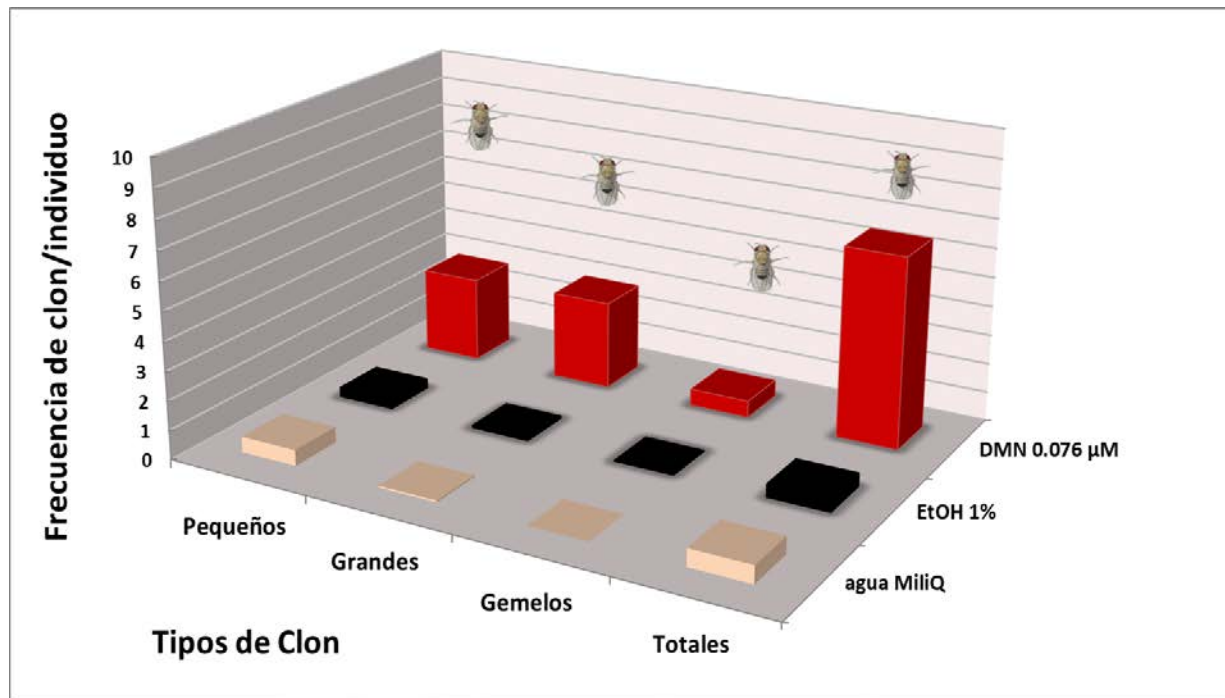



Fig. 11 Frecuencia de clones pequeños, grandes, gemelos y totales del testigo agua MiliQ, el testigo EtOH 1% y el testigo positivo DMN. Dónde:  muestra diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al testigo agua MiliQ.

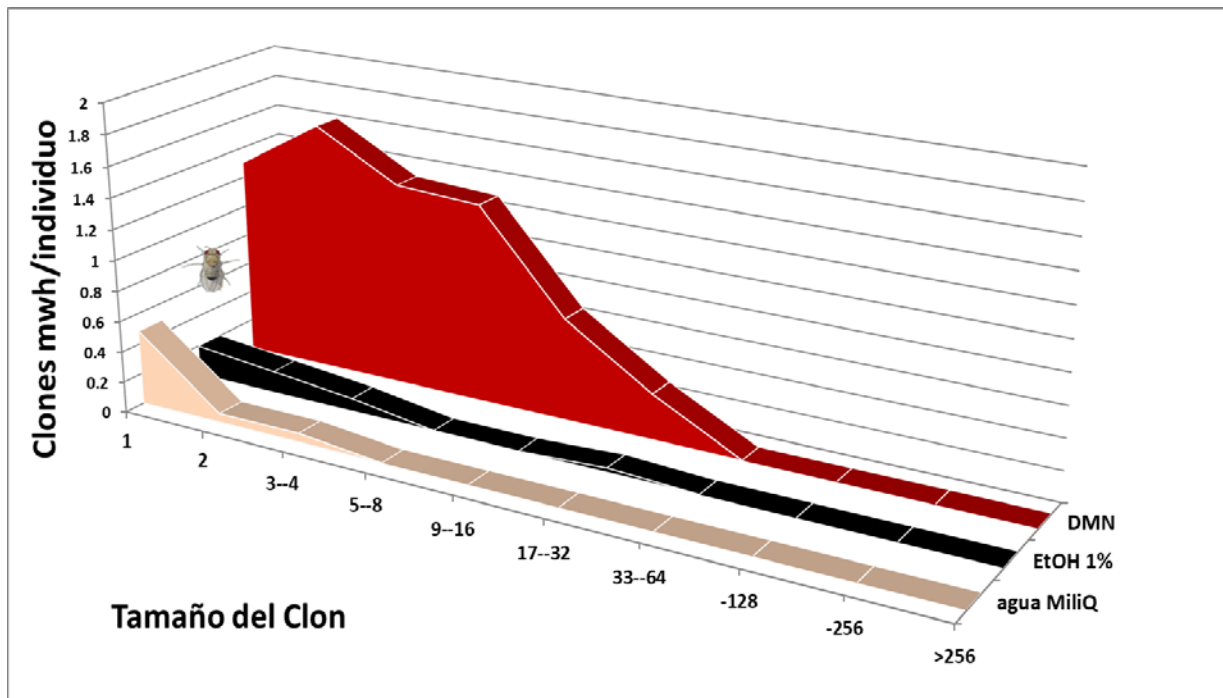



Fig. 12 Distribución de las frecuencias acumuladas del tamaño de clones *mwh* por individuo del testigo negativo, testigo solvente y el testigo positivo. Dónde:  muestra diferencias significativas a ($p < 0.05$) con respecto al testigo agua MiliQ.

Tratamientos NIC

Del tratamiento más alto de NIC 11280 μM no se obtuvieron suficientes individuos transheterocigotos *mwh+/+flr³* para la prueba SMART. En la Tabla VII y Figura 13 se muestran los resultados de la comparación de los tratamientos de NIC 470, 940, 1880 y 3760 μM frente al testigo agua MiliQ, las frecuencias de clones obtenidas de los tratamientos NIC son muy similares al testigo para el tipo de clon grande y gemelo, para el tipo de clon pequeño y totales los tratamientos NIC están por debajo de la frecuencia de clones del testigo agua MiliQ, ningún tratamiento mostro diferencias significativas a ($p < 0.05$) entre la frecuencia de clones de ningún tipo. Lo que indica que todos los tratamientos NIC no produjeron genotoxicidad.

Por otra parte, todos los tratamientos de NIC alteraron la distribución de las frecuencias acumuladas de clones *mwh* con respecto al testigo agua MiliQ y hubo diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Kolmogorov-Smirnov a ($p < 0.05$) (Tabla VIII

y Figura 14). Por lo tanto los tratamientos NIC se ven involucrados en una alteración de la división celular de *D. melanogaster*.

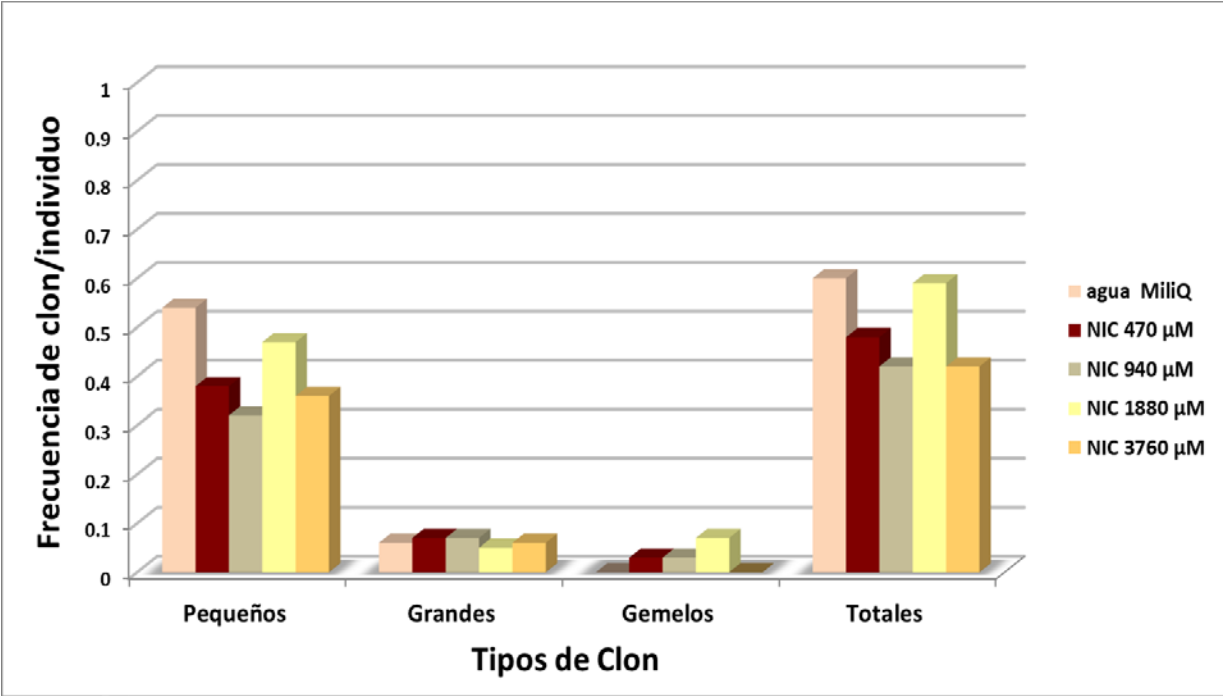


Fig. 13 Frecuencia de clones pequeños, grandes, gemelos y totales por individuo de los tratamientos NIC. No hubo diferencias significativas a ($p < 0.05$) con respecto al testigo agua MiliQ.

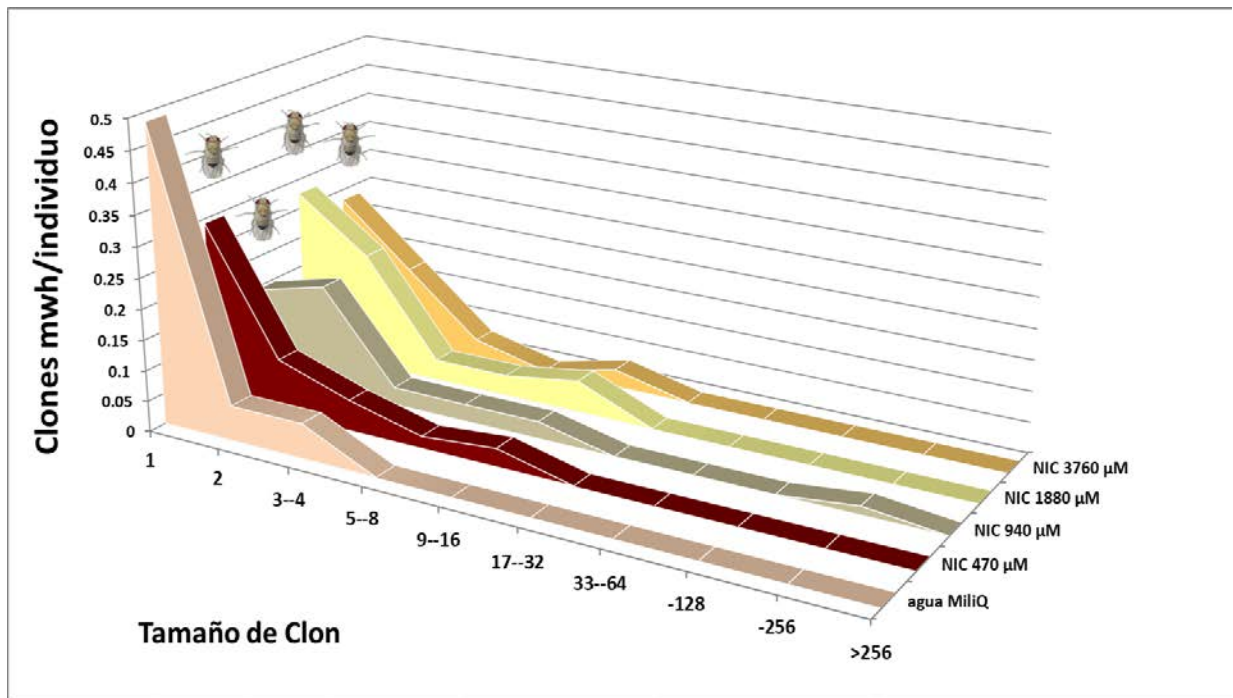


Fig. 14 Distribución de las frecuencias acumuladas del tamaño de clones *mwh* por individuo de los tratamientos NIC. Dónde: 🐜 muestra diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al testigo Agua MiliQ.

Co-tratamiento RES-NIC 0.40 µM + 470 µM vs el tratamiento NIC 470 µM

En la Tabla VII y la Figura 15 se muestran los resultados de la comparación del co-tratamiento RES-NIC 0.40 µM + 470 µM contra su tratamiento NIC 470 µM, la frecuencia de clones obtenida del co-tratamiento es muy similar al tratamiento NIC para todos los tipos de clon y no hubo diferencias significativas de acuerdo con la prueba de U Mann-Whitney a ($p < 0.05$). Lo que significa que no hay un efecto genotóxico del co-tratamiento RES-NIC 0.40 µM + 470 µM

En la distribución de las frecuencias acumuladas de clones *mwh* para el tratamiento NIC 470 µM y el co-tratamiento RES-NIC 0.40 µM + 470 µM, se observaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Kolmogorov-Smirnov a ($p < 0.05$) con respecto al tratamiento NIC (Tabla VIII y Figura 16). Lo que significa, que el co-tratamiento RES-NIC 0.40 µM + 470 µM, si alteró la división celular de *D. melanogaster*.

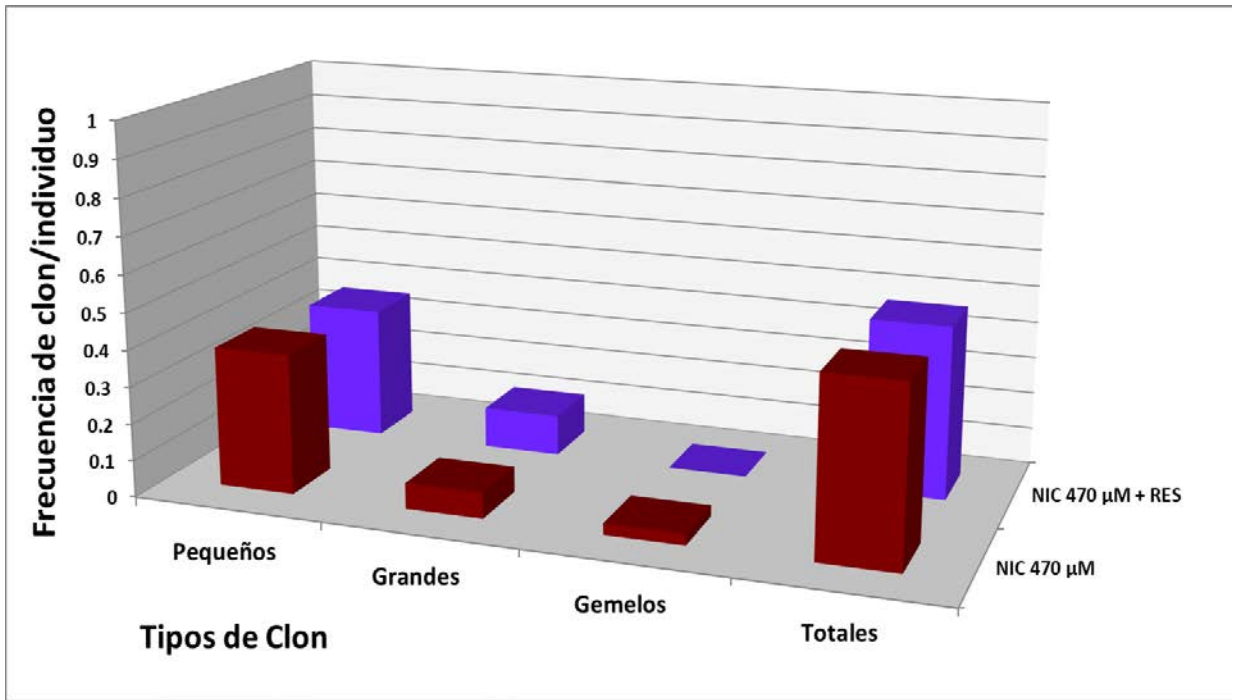


Fig. 15 Frecuencia de clones pequeños, grandes, gemelos y totales del tratamiento NIC 470 μM y el co-tratamiento RES-NIC 0.40 μM + 470 μM. No hubo diferencias significativas a ($p < 0.05$) con respecto al tratamiento NIC.

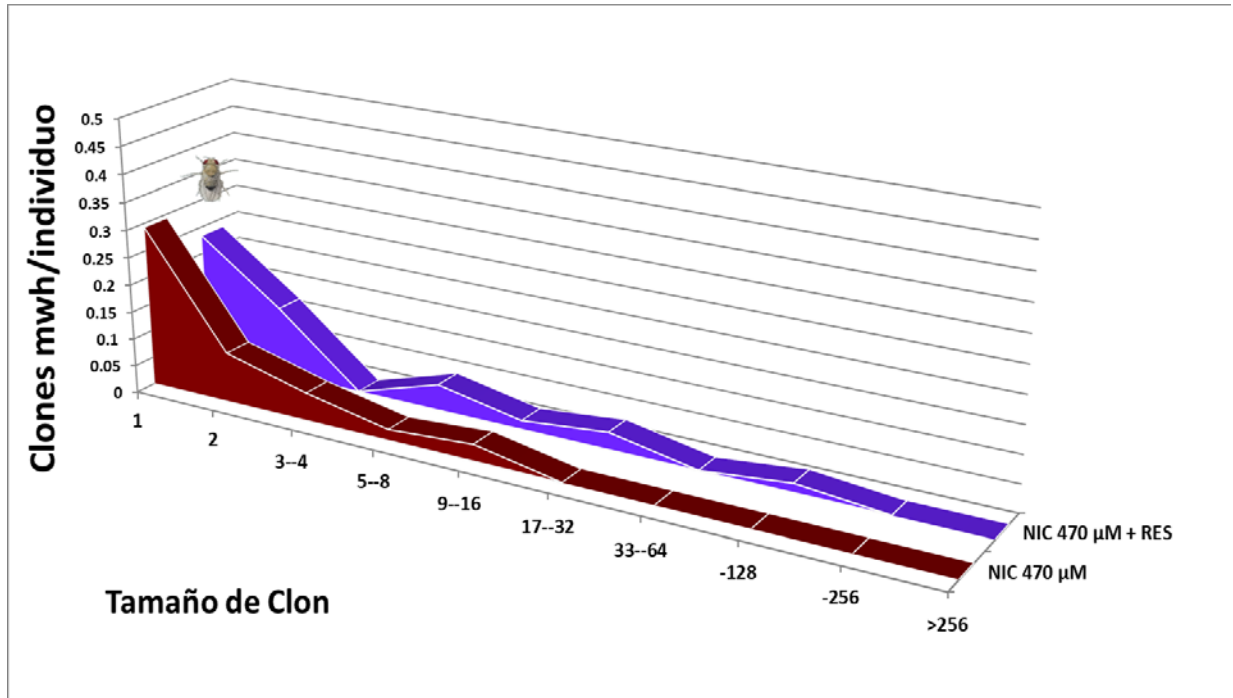



Fig. 16 Distribución de las frecuencias acumuladas del tamaño de clones *mwh* por individuo del tratamiento NIC 470 μM y su respectivo co-tratamiento RES-NIC. Dónde:  muestra diferencias significativas a ($p < 0.05$) con respecto al tratamiento NIC.

Co-tratamiento RES-NIC 0.40 μM + 940 μM vs el tratamiento NIC 940 μM

Al comparar el co-tratamiento RES-NIC 0.40 μM + 940 μM con su tratamiento NIC 940 μM , se muestra un incremento en la frecuencia de clones pequeños, aunque las demás frecuencias de clones son semejantes no se muestran diferencias significativas a ($p < 0.05$) entre la frecuencia de clones de ningún tipo (Tabla VII y Figura 17). Se demuestra que el co-tratamiento RES-NIC 0.40 μM + 940 μM no resultó ser genotóxico.

No obstante, en la distribución de las frecuencias acumuladas de clones *mwh* hubo una alteración con diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Kolmogorov-Smirnov a ($p < 0.05$) con respecto al tratamiento NIC (Tabla VIII y Figura 18). Lo que indica que el co-tratamiento RES-NIC 0.40 μM + 940 μM está involucrado en una alteración de la división celular.

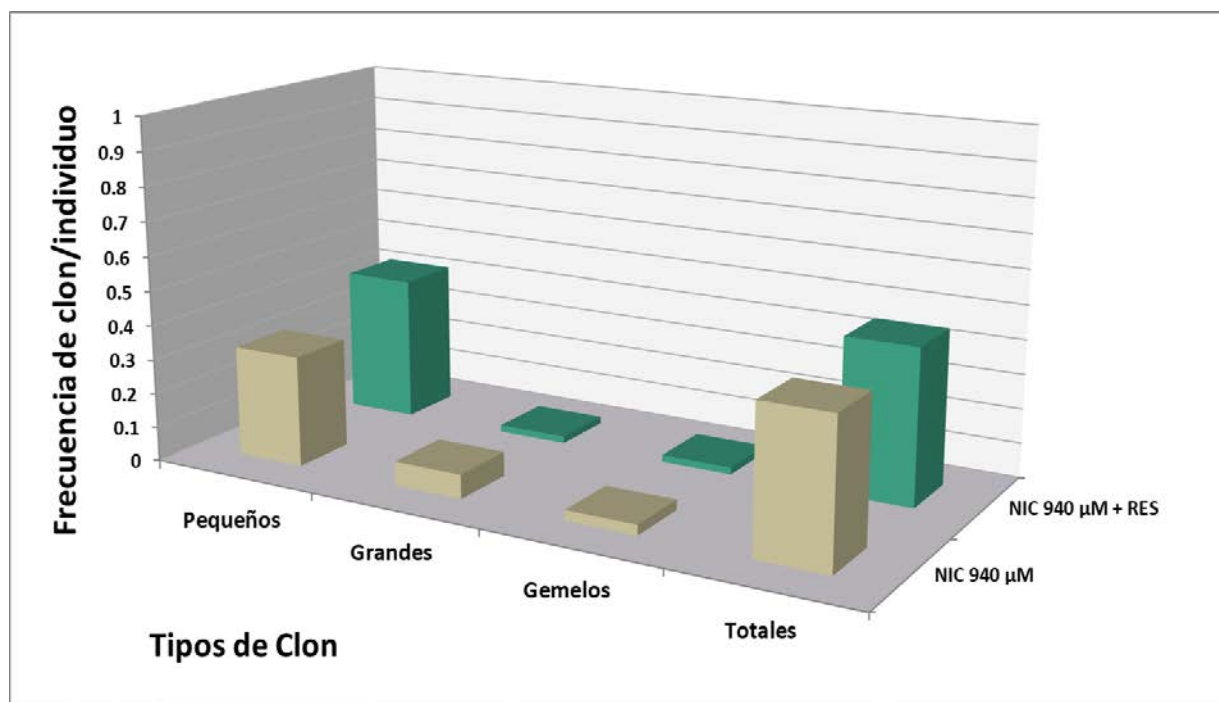


Fig. 17 Frecuencia de clones pequeños, grandes, gemelos y totales del tratamiento NIC 940 μM y el co-tratamiento RES-NIC 0.40 μM + 940 μM . No hubo diferencias significativas a ($p < 0.05$) con respecto al tratamiento NIC.

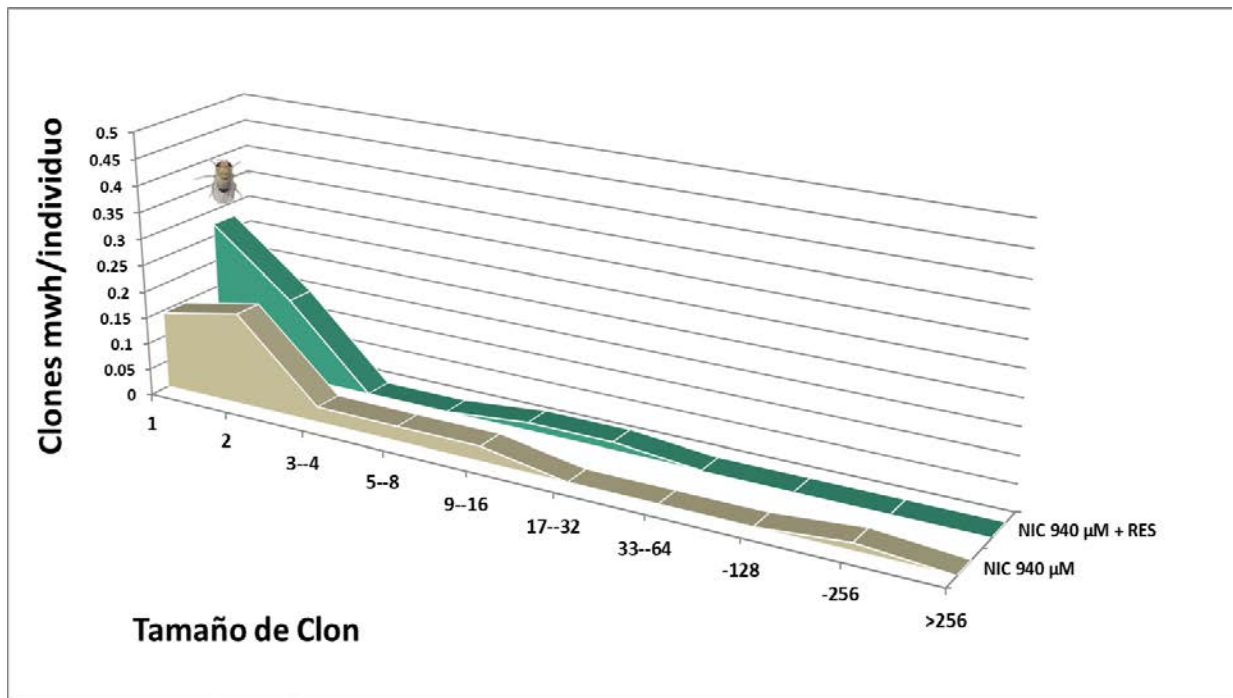



Fig. 18 Distribución de las frecuencias acumuladas del tamaño de clones *mwh* por individuo del tratamiento NIC 940 µM y su respectivo co-tratamiento RES-NIC. Dónde:  muestra diferencias significativas a ($p < 0.05$) con respecto al tratamiento NIC.

Co-tratamiento RES-NIC 0.40 µM + 1880 µM vs el tratamiento NIC 1880 µM

En la Tabla VII y Figura 19 se muestran los resultados de la comparación del co-tratamiento RES-NIC 0.40 µM + 1880 µM contra su tratamiento NIC 1880 µM, la frecuencia de clones obtenida del co-tratamiento es similar a su tratamiento para el tipo de clon grande y gemelo, para el tipo de clon pequeño y totales presenta frecuencias de clones por debajo del tratamiento NIC y sin diferencias significativas de acuerdo con la prueba de U Mann-Whitney a ($p < 0.05$). Lo cual indica que el co-tratamiento RES-NIC no resultó ser genotóxico.

En la distribución de las frecuencias acumuladas de clones *mwh* para el tratamiento NIC 1880 µM y el co-tratamiento RES-NIC 0.40 µM + 1880 µM, se observan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Kolmogorov-Smirnov a ($p < 0.05$) con respecto al tratamiento NIC (Tabla VIII y Figura 20). Por último, se presenta una

alteración en la división celular por el efecto del co-tratamiento RES-NIC 0.40 μM + 1880 μM .

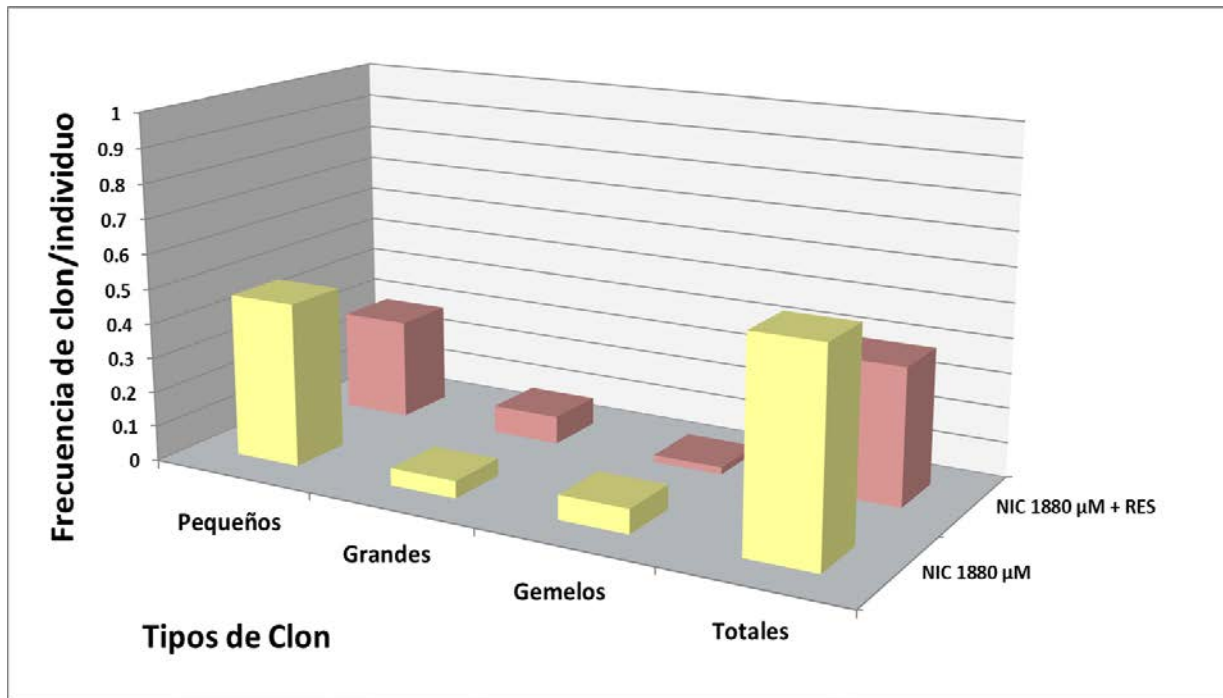


Fig. 19 Frecuencia de clones pequeños, grandes, gemelos y totales del tratamiento NIC 1880 μM y el co-tratamiento RES-NIC 0.40 μM + 1880 μM . No hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al tratamiento NIC.

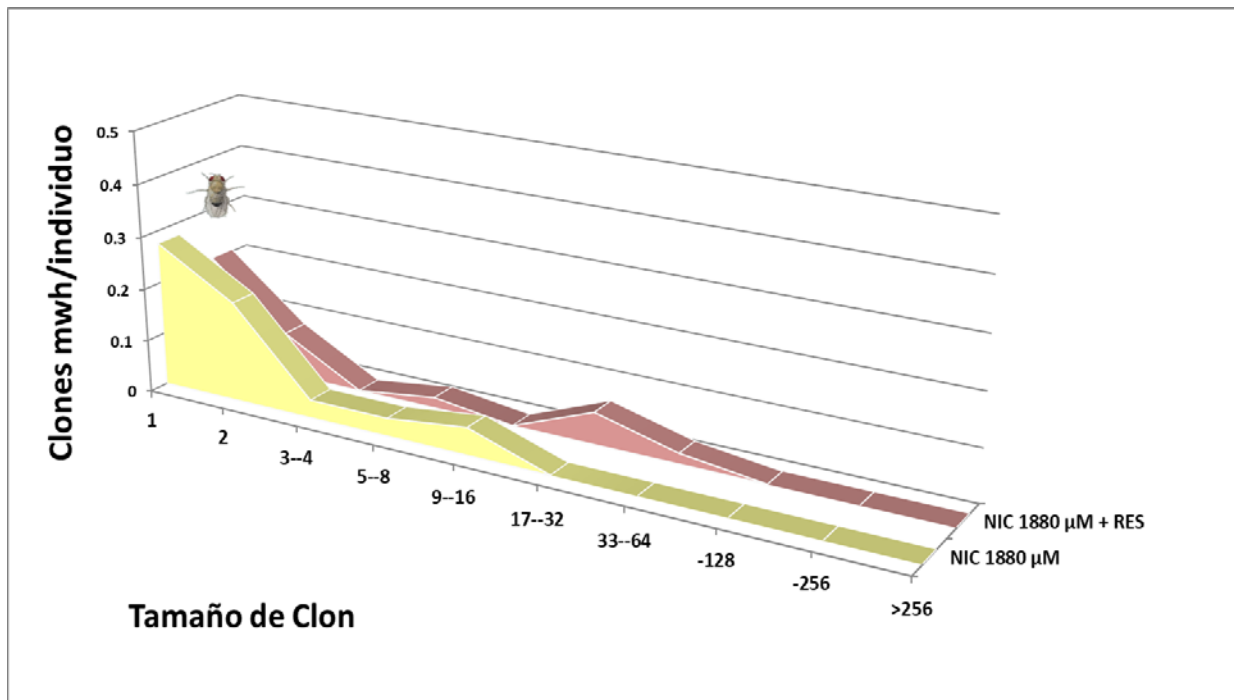



Fig. 20 Distribución de las frecuencias acumuladas del tamaño de clones *mwh* por individuo del tratamiento NIC 1880 μM y su respectivo co-tratamiento RES-NIC. Dónde:  muestra diferencias significativas a ($p < 0.05$) con respecto al tratamiento NIC.

Co-tratamiento RES-NIC 0.40 μM + 3760 μM vs el tratamiento NIC 3760 μM

Al comparar el co-tratamiento RES-NIC 0.40 μM + 3760 μM con el tratamiento NIC 3760 μM , se obtuvo un valor positivo en la prueba SMART, y existen diferencias significativas por la prueba de U Mann-Whitney a ($p < 0.05$) entre la frecuencia de clones pequeños y totales. Donde las frecuencias del co-tratamiento fueron mayores respecto al tratamiento en clones pequeños y totales y muy similares en clones grandes y gemelos (Tabla VII y Figura 21), esto denota en un daño tardío que se ve reflejado en aneuploidías (Graf *et al.*, 1984). Lo que demuestra el daño genotóxico de la interacción RES-NIC a 0.40 μM + 3760 μM .

Y además se presentó una alteración en la distribución de las frecuencias acumuladas de clones *mwh* y se encontraron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Kolmogorov-Smirnov a ($p < 0.05$) con respecto al tratamiento de NIC (Tabla VIII y Figura

22), lo que indica que el co-tratamiento RES-NIC 0.40 μM + 3760 μM resultó estar involucrado en una alteración de la división celular.

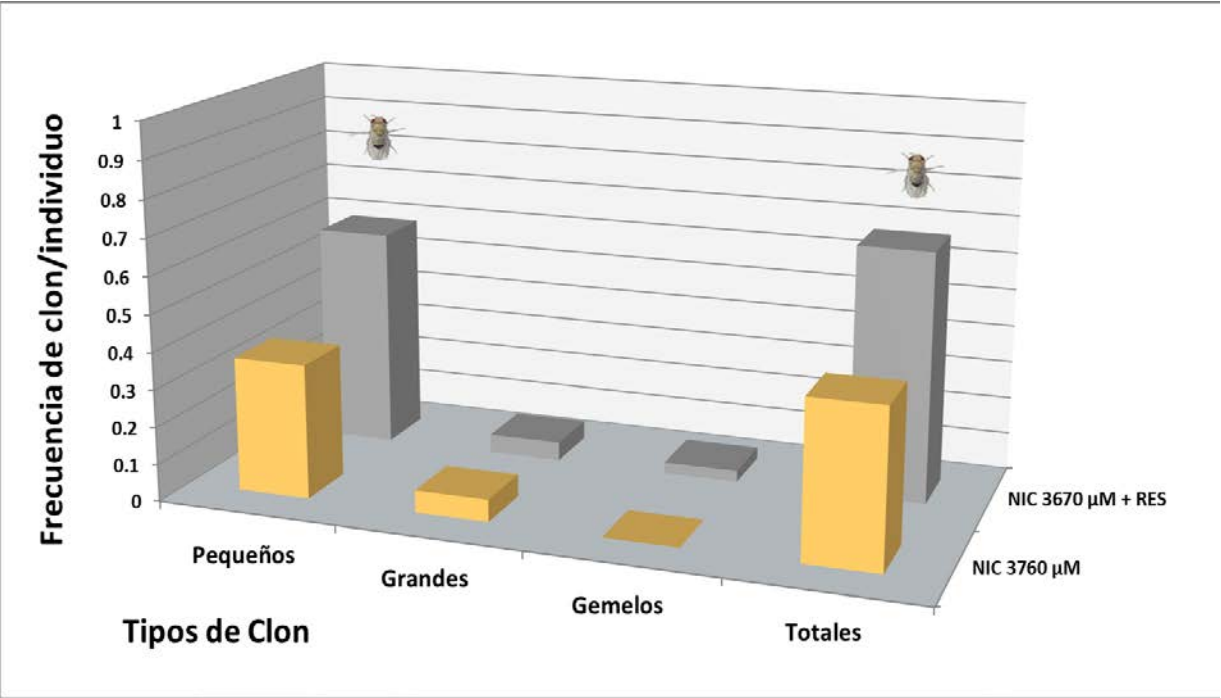



Fig. 21 Frecuencia de clones pequeños, grandes, gemelos y totales del tratamiento NIC 3670 μM y el co-tratamiento RES-NIC 0.40 μM + 3760 μM . Dónde:  muestra diferencias significativas a ($p < 0.05$) con respecto al tratamiento NIC.

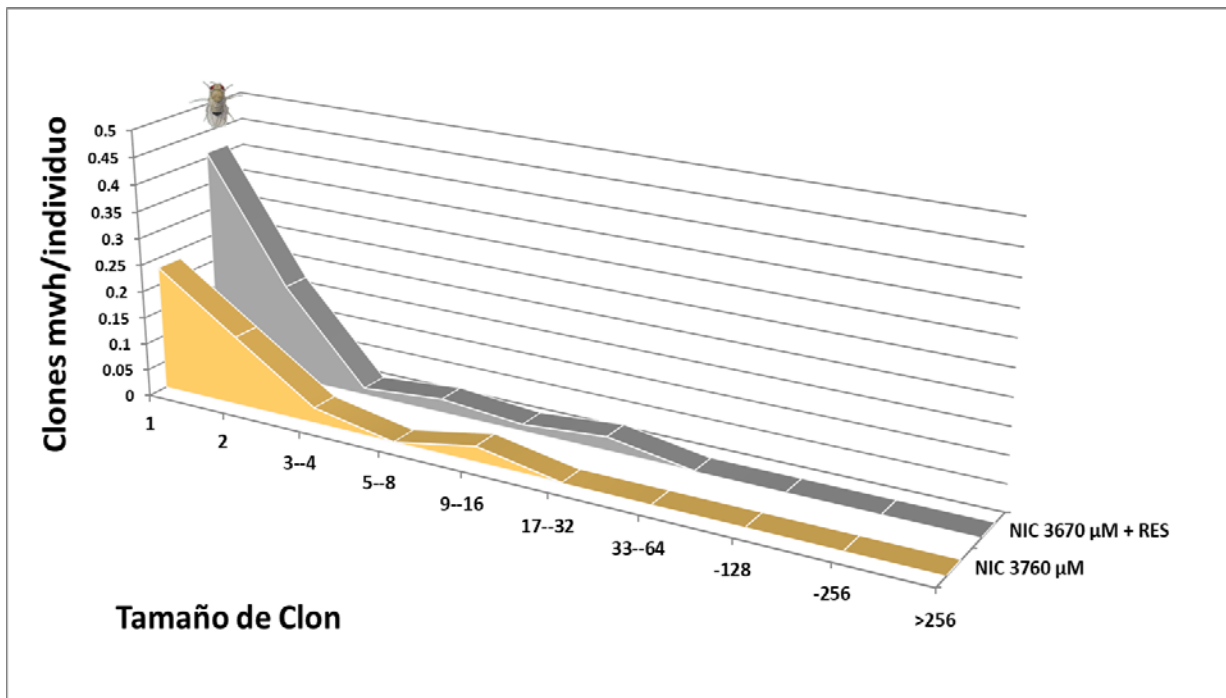



Fig. 22 Distribución de las frecuencias acumuladas del tamaño de clones *mwh* por individuo del tratamiento NIC 3670 μM y su respectivo co-tratamiento RES-NIC. Dónde:  muestra diferencias significativas a ($p < 0.05$) con respecto al tratamiento NIC.

Tratamiento RES vs el testigo solvente EtOH 1%

En la Tabla VII y Figura 23 se muestran los resultados de la comparación del tratamiento RES 0.40 μM contra el testigo solvente EtOH 1%, la frecuencia de clones obtenida del tratamiento RES es similar a la del testigo para el tipo de clon grande y gemelo, para el tipo de clon pequeño y totales presenta frecuencias de clones por arriba del testigo, no obstante, sin presentar diferencias significativas de acuerdo con la prueba de U Mann-Whitney a ($p < 0.05$). Lo que significa que no hay un efecto genotóxico por parte del tratamiento RES.

Para la distribución de las frecuencias acumuladas de clones *mwh* para el testigo EtOH 1% y el tratamiento RES 0.40 μM se presenta una alteración y se observan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Kolmogorov-Smirnov a ($p < 0.05$) con respecto al testigo EtOH 1% (Tabla VII y Figura 24). Lo que significa, que el tratamiento RES 0.40 μM , si alteró la división celular de *D. melanogaster*.

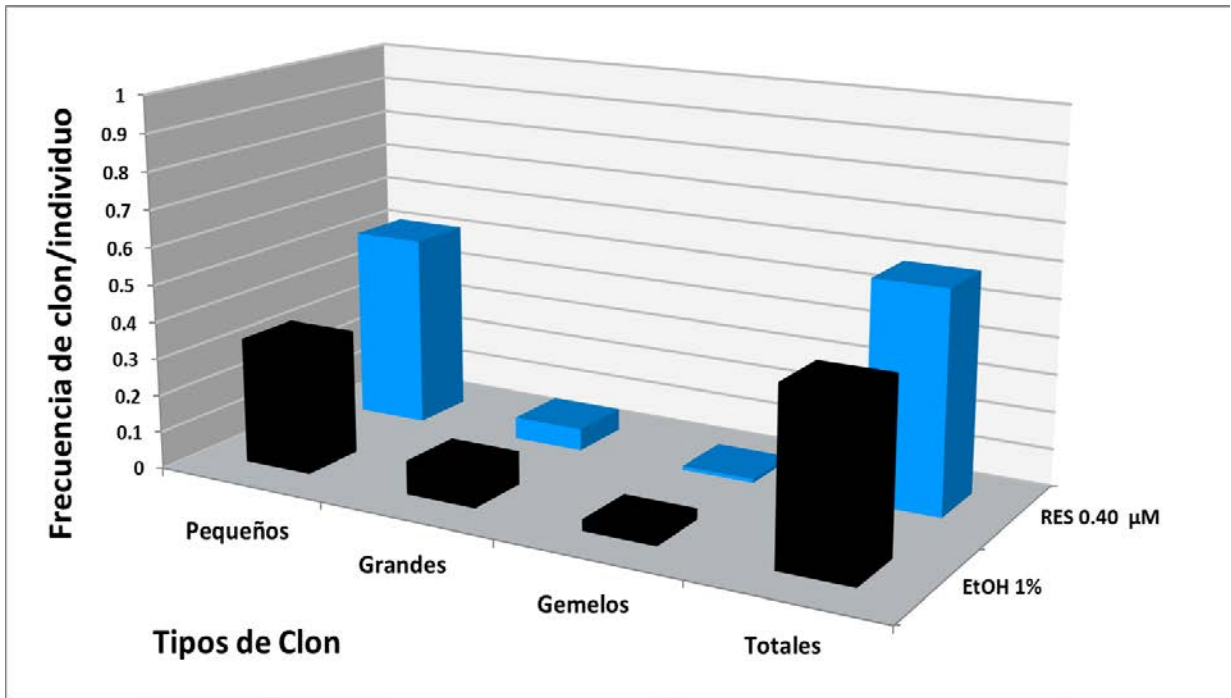


Fig. 23 Frecuencia de clones pequeños, grandes, gemelos y totales del testigo EtOH 1% y el tratamiento RES 0.40 μM. No hubo diferencias significativas a ($p < 0.05$) con respecto al EtOH1%.

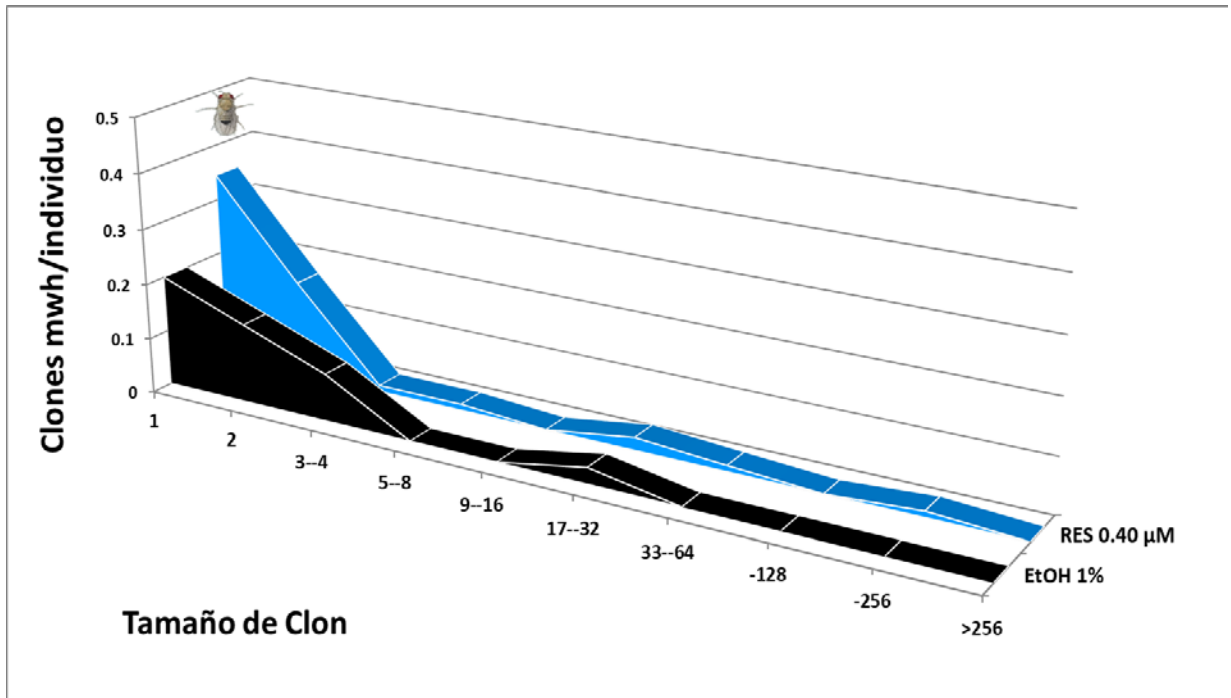



Fig. 24 Distribución de las frecuencias acumuladas del tamaño de clones *mwh* por individuo del testigo EtOH 1% y el tratamiento RES. Dónde:  muestra diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al testigo EtOH 1%.

Co-tratamientos RES-NIC

Al comparar los co-tratamiento RES-NIC en todas las concentraciones con el testigo solvente EtOH 1%, las frecuencias de clones obtenidas del co-tratamiento 0.40 μM + 470 μM son muy similares, las frecuencias del co-tratamiento 0.40 μM + 940 μM resultaron que para el tipo de clon pequeño fue mayor, para el tipo grande fue menor y para el tipo gemelos y totales fueron muy similar, las frecuencias del co-tratamiento 0.40 μM + 1880 μM son menores para el tipo de clon pequeño y totales y muy similares para el tipo grande y gemelos, las frecuencias de clones del co-tratamiento 0.40 μM + 3760 μM fueron mayores para el tipo de clon pequeño y totales y muy similares para grande y gemelo y por último las frecuencias del co-tratamiento 0.40 μM + 11280 μM resultaron que para el tipo de clon pequeño fue mayor y menores para los clones grandes, gemelos y totales. Ningún co-tratamiento mostró diferencias significativas por medio de la prueba SMART, los datos se trabajaron también con la prueba de U Mann-Whitney a ($p < 0.05$) para los datos que resultaron “indecisos”, y por lo tanto los co-tratamientos que resultaron positivos fueron 0.40 μM + 470 μM y 0.40 μM + 3760 μM para el tipo de clon pequeño, lo que indica un daño tardío que se ve reflejado en aneuploidías (Graf *et al.*, 1984) (Tabla VII y Figura 25). Se demuestra que la interacción RES-NIC a las concentraciones 0.40 μM + 940 μM , 0.40 μM + 1880 μM y 0.40 μM + 11280 μM no generó genotoxicidad, si bien a las concentraciones 0.40 μM + 470 μM y 0.40 μM + 3760 μM fue todo lo contrario, ya que hubo un efecto genotóxico.

En la comparación de los co-tratamientos RES-NIC con el tratamiento RES, las frecuencias de tipo de clon obtenidas del co-tratamiento 0.40 μM + 470 μM son para el tipo de clon pequeño y totales menor, en clones grandes fue mayor y para gemelos muy similar, las frecuencias del co-tratamiento 0.40 μM + 940 μM fueron menores para el tipo de clon pequeño, grande y totales y muy similares, las frecuencias del co-tratamiento 0.40 μM + 1880 μM resultaron menores para el tipo de clon pequeño y totales y similares para grande y gemelos, las frecuencias de clones del co-tratamiento 0.40 μM + 3760 μM son mayores para el tipo de clon pequeño y totales y similares para grande y gemelo y por último las frecuencias del co-tratamiento 0.40 μM + 11280 μM

resultaron que para el tipo de clon pequeño, grande y totales fueron menores y muy similar en gemelo todo esto respecto al tratamiento RES, ningún co-tratamiento mostró diferencias significativas con la prueba de U Mann-Whitney a ($p < 0.05$), pero se aprecia una disminución del daño por parte de los co-tratamientos por lo cual se realizó el inverso en la prueba SMART para todos los co-tratamientos donde el testigo fueron los co-tratamientos y el experimental fue el tratamiento RES con la finalidad de saber si la disminución fue significativa; el resultado fue que solo la concentración 0.40 μM + 11280 μM tuvo diferencias significativas de acuerdo a la prueba de U Mann-Whitney a ($p < 0.05$) para el tipo de clon pequeño (Tabla VII y Figura 26). Por último, se encuentra nuevamente que los co-tratamientos RES-NIC no fueron genotóxicos, aunque, a la concentración 0.40 μM + 1880 μM se refleja un efecto protector en *D. melanogaster* debido al encontrar una disminución del daño.

No obstante, hubo una variación en la distribución de las frecuencias acumuladas de clones *mwh* respecto al testigo EtOH 1% y al tratamiento RES, se observaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Kolmogorov-Smirnov a ($p < 0.05$) en todos los co-tratamientos excepto a la concentración 0.40 μM + 1880 μM con respecto al testigo EtOH 1% y el co-tratamiento 0.40 μM + 3760 μM en relación con el tratamiento RES (Tabla VIII y Figuras 27 y 28). Para finalizar, los resultados demuestran que la mayoría de las concentraciones de la interacción RES-NIC están involucradas en la alteración de la división celular.

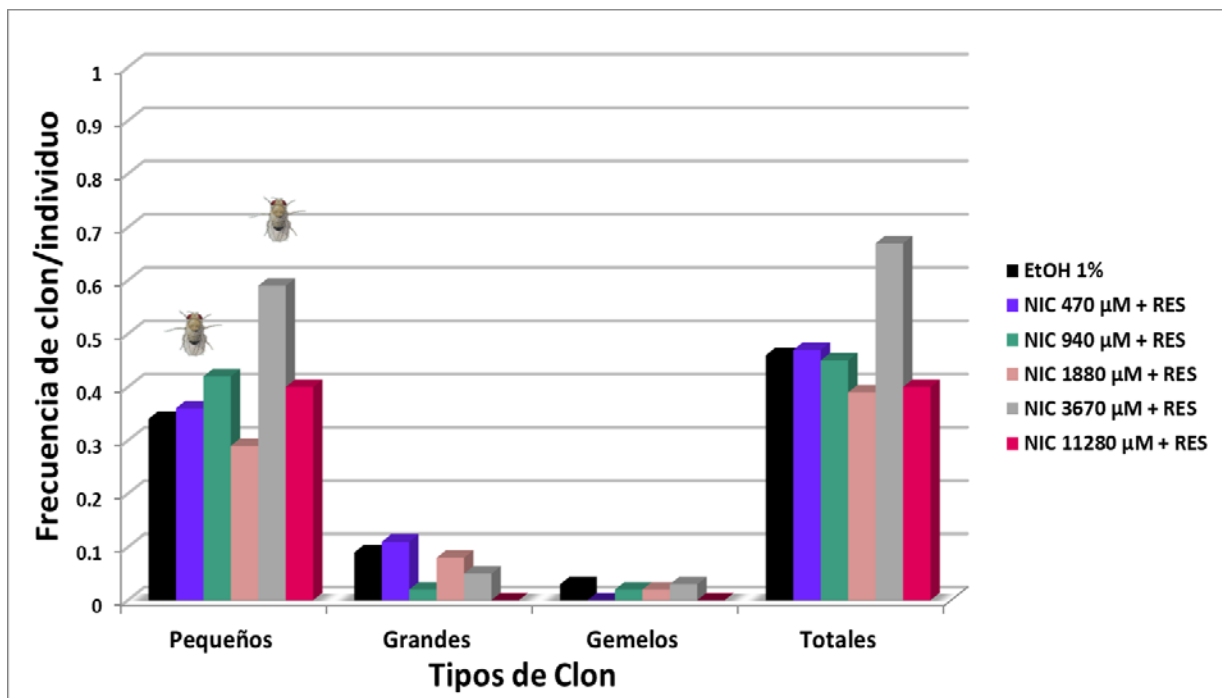


Fig. 25 Frecuencia de clones pequeños, grandes, gemelos y totales por individuo de los co-tratamientos de RES-NIC. Dónde: 🐝 muestra diferencias significativas a ($p < 0.05$) con respecto al testigo solvente EtOH 1%.

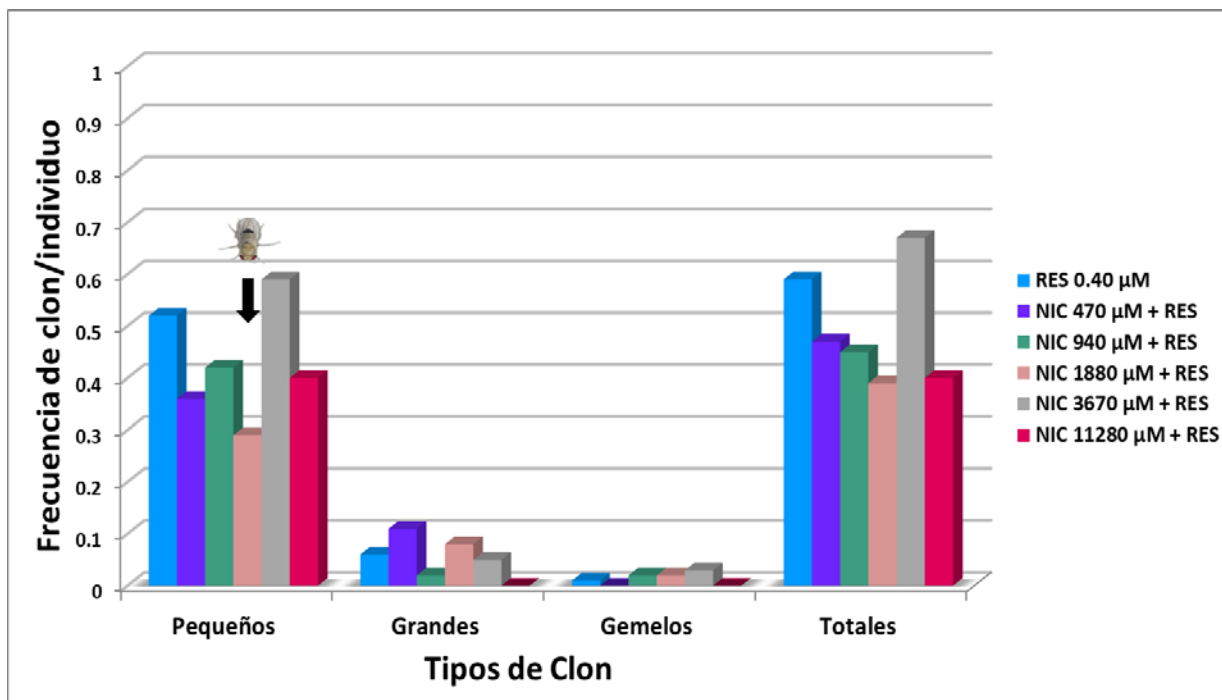


Fig. 26 Frecuencia de clones pequeños, grandes, gemelos y totales por individuo de los co-tratamientos de RES-NIC. Dónde: 🐝↓ muestra diferencias significativas a ($p < 0.05$) en relación con la disminución del daño, con respecto al tratamiento RES.

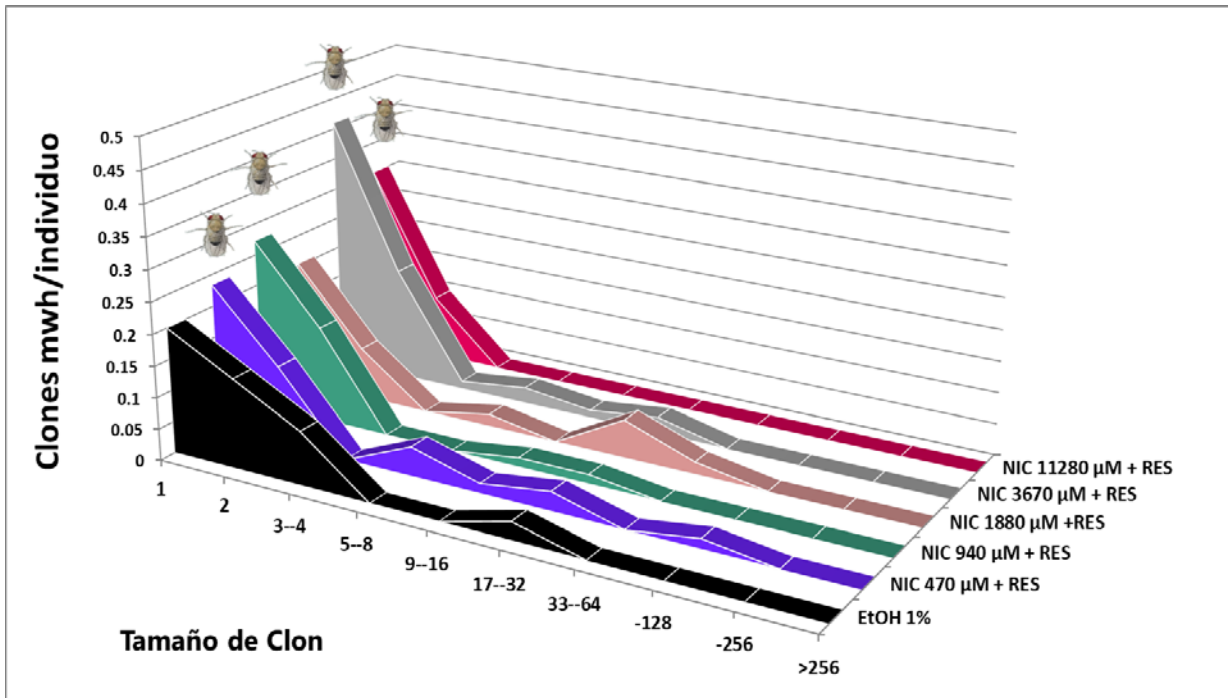


Fig. 27 Distribución de las frecuencias acumuladas del tamaño de clones *mwh* por individuo del testigo EtOH 1% y los co-tratamientos RES-NIC. Dónde: 🐝 muestra diferencias significativas a ($p < 0.05$) con respecto al testigo EtOH 1%.

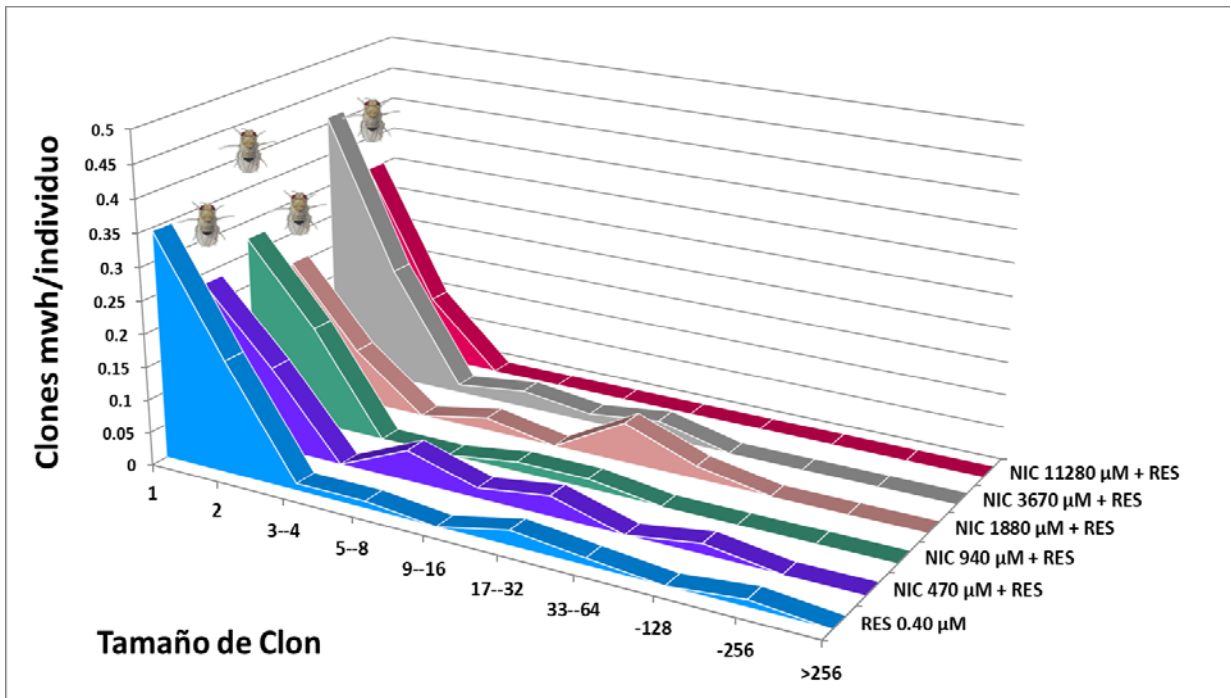


Fig. 28 Distribución de las frecuencias acumuladas del tamaño de clones *mwh* por individuo del tratamiento RES y los co-tratamientos RES-NIC. Dónde: 🐝 muestra diferencias significativas a ($p < 0.05$) con respecto al tratamiento RES.

Discusión

Prueba de toxicidad

La NIC es la sustancia orgánica más abundante en el humo del cigarro. El daño inducido por la NIC está mediado por la generación de ERO (Crowley-Weber *et al.*, 2003), al menos parcialmente a través de los nAChR de células mesencefálicas de rata y en cultivos de MOC (Barr *et al.*, 2007; Ginzkey *et al.*, 2014). Al considerar el reporte de como la NIC tiene diferentes formas de participar en el daño oxidativo, se destaca la capacidad de generar una producción alta de RL (Calle y Melgarejo, 2005) particularmente el $\cdot\text{OH}$, el $\text{O}_2\cdot^-$, el no radical H_2O_2 , el ion hipoclorito ($\cdot\text{ClO}^-$) y el anión peroxinitrito ($\cdot\text{ONO}_2^-$), que a su vez son capaces de inducir apoptosis (Crowley-Weber *et al.*, 2003; Toklu *et al.*, 2010).

Los resultados de la prueba de toxicidad indican que la concentración más alta de NIC 11280 μM demostró ser subtóxica. La toxicidad de la NIC podría estar relacionada con el efecto oxidativo por este compuesto. En apoyo a lo anterior, se ha reportado que la exposición a la NIC a concentraciones de 0.1, 1, 10 y 100 μM durante 24 h causó aumento en la peroxidación lipídica y neurotoxicidad en la línea celular derivada de un feocromocitoma de la médula suprarrenal de rata (células PC12) y en un periodo de 1 semana a la concentración de 6 mg/kg en las ratas cepa Sprague-Dawley (Qiao *et al.*, 2005). Posteriormente Dawson *et al.* (1988) reportaron la toxicidad de la NIC en el modelo *Xenopus laevis*, pues encontraron una gran mortalidad de los embriones y obtuvieron dos CL_{50} , la primera a 136.5 mg/L de NIC en tratamiento agudo de 96 h sin requerir una activación metabólica y para la segunda se utilizó el sistema de activación metabólica (MAS) dando como resultado una CL_{50} de 20.2 mg/L, muy por debajo de la primera en embriones de *Xenopus laevis*. A su vez Nathiga Nambi *et al.* (2017) reportaron una CL_{50} de 4.94 mg/L de NIC en tratamiento agudo de 96 h a concentraciones de 3, 4, 5, 6 y 7 mg/L en pez cebra (*Danio rerio*), la toxicidad se debió al aumento intracelular de ERO de una manera dependiente de la concentración, dichas ERO fueron detectadas a través de una sonda fluorescente de diacetato de 2',7'-

diclorodihidrofluoresceína (H2DCFDA). Por otro lado, Velázquez-Ulloa (2017) estudió la exposición de la NIC a concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 mg/mL durante el desarrollo de *D. melanogaster*, y encontraron una disminución de la supervivencia de los organismos de manera concentración-dependiente, además la concentración de 0.3 mg/mL provocó una eclosión retardada de aproximadamente un día.

Por otra parte, en el presente trabajo también se encontró que la interacción NIC-RES fue tóxica y subtóxica a diferentes concentraciones. Este resultado podría explicarse por la subtoxicidad ejercida por la NIC, aunado a las propiedades pro-oxidantes reportadas para el RES, lo que concuerda con lo informado por Martins et al. (2014) quienes encontraron que el tratamiento RES durante 24 h a concentraciones de 1, 10 y 50 μ M desencadenó un efecto pro-oxidante de manera dosis-dependiente en las células HSC; igualmente durante 120 h también promovió efectos pro-oxidantes desde la concentración más baja 0.1 μ M. El RES a 20 μ g/mL generó un daño al DNA al causar la fragmentación del DNA y un efecto citotóxico al inhibir la división celular lo que origina una filamentación celular. Además, demostró propiedad pro-oxidante por el aumento de los niveles intracelulares de ERO en *S. typhimurium* (Lee y Lee, 2017). También se ha reportado que el RES en co-tratamiento con NIC a 0.01 + 0.62 mM en machos de *D. melanogaster* cepa Canton S+ se mostró una disminución la longevidad en un 28.58% (Cruz, 2015). Por otro lado, los resultados de este trabajo no concuerdan con lo reportado por Gómez (2017) quien encontró que los co-tratamientos NIC-RES a 0.456, 1.9, 3.8, 11.4 mM + 0.40 μ M redujeron la mortalidad al ser comparados con sus testigos NIC.

Al comparar entre cepas se encontró, en este trabajo, un mayor porcentaje de mortalidad en la cepa Oregon-flare que en la cepa flare, lo que refleja un posible efecto subtóxico. Esto puede deberse a la participación de los Cyp450s en el metabolismo de la NIC, se ha reportado que el CYP6G1 se ve involucrado en la metabolización y resistencia de la NIC en *D. melanogaster* (Li et al., 2012), ya que la cepa Oregon-flare cuenta con una elevada expresión de las actividades dependientes de Cyp450s típicas para esta cepa (Graf y van Schaik, 1992) por medio de la mutación dominante *Rst* (2)

DDT/*Cyp6g1* en el cromosoma 2 localizada en el mapa citológico (48E7), de manera que provoca la expresión constitutiva de una proteína inductora de los genes *Cyp6a2*, *Cyp6a8* y *Cyp6a9* (Graf *et al.*, 1998) lo cual denotaría que los niveles altos de Cyp450s están involucrados en la C-oxidación de la NIC (Osorio, 2010). Se puede inferir, que con una mayor cantidad de Cyp450s habría un mayor metabolismo de la NIC, y se produciría una gran cantidad de metabolitos secundarios que elevarían el estrés oxidativo, lo que regularía ciertos genes involucrados en la aceleración de los procesos de envejecimiento, en la activación de rutas de apoptosis y en la activación de distintas respuestas de defensa frente al estrés oxidativo. En contraposición a lo antes mencionado, para la cepa flare se encontró que sólo el co-tratamiento NIC-RES 11280 + 0.40 μM fue tóxico, en contraste con esto, los demás co-tratamientos presentan una mortalidad relativamente baja. Esto se puede deber a que esta cepa presenta niveles basales de Cyp450s, aunque *D. melanogaster* presenta el CYP6G1, capaz de la metabolización y resistencia de la NIC (Li *et al.*, 2012). Por lo tanto, se puede inferir que al presentar dichas enzimas de desintoxicación, se puede manifestar una disminución en la metabolización de la NIC y facilitar su eliminación del organismo, por consiguiente sería menos tóxica o no percibirse toxicidad por parte de la NIC.

Otra explicación de la reducción de la mortalidad en los co-tratamientos en ambas cepas se deba a un aparente efecto protector del RES, ya que este pudo tener un efecto positivo en contra de las ERO. Lo que concuerda con lo reportado por Guarante (2005) en donde demuestra que el RES está involucrado en la inducción de la expresión de los genes que codifican a las sirtuinas y estas a su vez inhiben la producción de ERO e inducen la expresión de enzimas antioxidantes tales como la SOD. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con Lin *et al.* (2012) quienes observaron un efecto protector del RES a las concentraciones de 1×10^{-8} y 1×10^{-7} μM en embriones de ratón sobre el estrés oxidativo provocado por la NIC a una concentración de 1 mM en co-tratamiento y la activación de SIRT1, GPx-1, GPx-4, SOD1 y SOD2. Toklu *et al.* (2010) reportaron en ratas macho whistar albino que el RES inhibe la citoquina pro-inflamatoria plasmática y los niveles del malondialdehído (MDA)

en riñón, la vejiga y los cuerpos cavernosos, suprimió la generación de radicales y redujo la producción del nucleósido de DNA oxidado (8-OHdG) plasmático, lo que indica que el RES contrarresta la toxicidad inducida por la NIC, lo que implica en la protección contra daño oxidativo del DNA y cambios asociados en el metabolismo energético mitocondrial.

Por otro lado, el RES lograría la supervivencia de los individuos por la activación de sirtuinas, las cuales se ven involucradas en la protección contra enfermedades asociadas al envejecimiento, gracias a una variedad de mecanismos que incluyen la regulación de la respuesta al estrés, la apoptosis y la reparación del DNA (Cha y Kim, 2013). La Sir2 (SIRT 1 homóloga en mamíferos) es un importante modulador del proceso de envejecimiento y de la actividad locomotora en *D. melanogaster* (Tinkerhess *et al.*, 2012). Se ha demostrado que el RES a una concentración de 10 μ M durante 24 horas incrementa la expresión de la SIRT1 y que un pretratamiento con 10 mM provoca la inhibición de la SIRT1 en un modelo de cultivo celular de la ELA transfectando las células VSC4.1 con el vector mutante hSOD1G93A (Wang *et al.*, 2011).

La subtoxicidad de la NIC a la concentración más alta se deba al efecto oxidante de dicho compuesto, y posiblemente la toxicidad encontrada del co-tratamiento NIC-RES (11280 + 0.40) es provocada por la generación de ERO que llega a producir la NIC; lo que desencadenaría en un efecto pro-oxidante del RES. Por otro lado, el probable efecto protector del RES puede deberse a la activación de sirtuinas, lo que pudo contribuir a la capacidad del RES de prolongar la esperanza de vida en *D. melanogaster*.

Prueba SMART en ala de *D. melanogaster*

Los organismos están expuestos a un sin fin de sustancias químicas xenobióticas, que, una vez absorbidas, se pueden acumular en él y así pueden amenazar su equilibrio funcional. Si la concentración de cualquier xenobiótico en el organismo es excesiva, existe un riesgo en sus funciones biológicas. Cuando son sometidos al metabolismo

xenobiótico sufren reacciones de biotransformación para hacerlos más hidrosolubles y sean fáciles de excretar esto a veces no sucede ya que el compuesto xenobiótico sufre un proceso de bioactivación, en donde algunos son relativamente inertes y poco reactivos pasan a metabolitos muy reactivos con una toxicidad intrínseca mayor que la del original (Coutiño *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2012; Acosta y Acosta, 2017).

Testigo positivo DMN

La DMN presenta propiedades alquilantes, carcinogénicas y mutagénicas (Krueger, 1966). El efecto alquilante se debe a que la DMN provoca metilaciones en el sitio N7 de la guanina en todos los tipos de RNA ribosomal, mensajero y nuclear (Pegg y Jackson, 1976; Galbraith *et al.*, 1979) presentando un mayor nivel de metilación que el DNA (Galbraith *et al.*, 1979). En este último, produce metilaciones 6-metilguanina y 7-metilguanina (Galbraith *et al.*, 1979; Umbenhauer y Pegg, 1981; Goto *et al.*, 1999; Leão y Pavão, 2001). Se ha encontrado que la DMN participa en el incremento del daño oxidativo (Vendemiale *et al.*, 2001; Sathish *et al.*, 2011), el cual es dado por una caída de la actividad antioxidante de SOD, CAT, GPx, la Glutación S-transferasa (GST) y la Glutación Reductasa (GR) (Sathish *et al.*, 2011), y en la oxidación de proteínas y lípidos a una dosis de 1mL de DMN al %1/100g de peso corporal (Vendemiale *et al.*, 2001).

Para este trabajo, se empleó la DMN a la concentración 0.076 μ M, y se encontró que resultó genotóxica, pues mostró un incremento en la frecuencia de clones pequeños, grandes, gemelos y totales, y además alteró la distribución de las frecuencias acumuladas del tamaño de los clones *mwh* en la cruce de BE. Recientemente, Carmona (2018) reportó que la DMN a la misma concentración tuvo efecto genotóxico en la cruce BE, al producir incremento en todas las frecuencias de clones mutantes y la alteración en la distribución de las frecuencias acumuladas del tamaño de clones *mwh*. Estos resultados concuerdan con trabajos anteriores en donde se encontró el mismo efecto con la DMN a diferentes concentraciones en un rango que va de los 76 μ M a los 156 μ M, mediante la prueba SMART en ala de *D. melanogaster* (Graf *et al.*, 1984; Murillo, 1997; Castañeda, 2003; Castañeda *et al.*, 2011; Santos, 2016). Además, hay reportes en el ensayo cometa que muestran que la DMN es genotóxica, por

ejemplo, Hobbs et al. (2015) reportaron que la DMN a dosis leves (0.63, 1.25 y 2.5 mg/kg/día) produjeron daño al DNA dependiente de la dosis en hígado de ratas macho Sprague Dawley. También se ha demostrado que es capaz de inducir fibrosis hepática y daño hepático necrótico, reflejado con un mayor peso del hígado, aumento en la peroxidación lipídica, interrupción en la síntesis de proteínas en el hígado y menor peso corporal en machos de ratas Wistar (Abdu y Al-Bogami, 2017).

Respecto al efecto genotóxico de la DMN en la craza BE, este promutageno requiere activación metabólica para producir más daño (Galbraith *et al.*, 1979; Graf *et al.*, 1984; Ooka *et al.*, 2016) vía Cyp450s; en específico por la enzima CYP2E1 en seres humanos (Yang *et al.*, 1990; Orellana y Guajardo, 2004). Cabe mencionar que en esta craza hay una elevada expresión de Cyp450s provocando una mayor activación de la DMN, con lo que conlleva a mayor cantidad de metabolitos activos de la DMN como son el ion diazometilo y el ion carbonio los cuales son los responsables de las metilaciones que causan daño al DNA (Leão y Pavão, 2001).

Testigo solvente EtOH 1%

En este trabajo el EtOH 1% no fue genotóxico. Este efecto era el esperado ya que en trabajos anteriores en la prueba SMART no se ha reportado el efecto no genotóxico del EtOH en la craza BE a concentraciones similares de 1.2%, 1%, 2% y 1% respectivamente (Dueñas, 2001; Sánchez, 2015; Santos, 2016; Carmona, 2018). De igual manera, para la craza CE a una concentración de 1% (Gómez, 2017). Una explicación para la falta de genotoxicidad del EtOH 1% es que *D. melanogaster* tiene resistencia al EtOH debido a su preferencia por alimentos como frutos dulces en descomposición que generan EtOH y por su valor calorífico (Pohl *et al.*, 2012). Sumado a esto, el EtOH pudo ser metabolizado de manera eficaz gracias a que la craza BE de *D. melanogaster* presenta una elevada expresión de CYP450s (Graf y van Schaik, 1992), lo que favorece así su rápida eliminación. Sin embargo, no se tiene información de que los CYP450s están involucrados en el metabolismo del EtOH en *D. melanogaster*. Aunque en la cepa Canton-S el EtOH a una sola exposición es capaz de regular de forma positiva los genes *Cyp6a2* y *Cyp6a13* y un aumento en la expresión

de las enzimas de biotransformación codificadas por genes *Cyp6a8*, *Cyp4e3* y *Cyp309a1* (Morozova *et al.*, 2006). De igual manera, en moscas adultas transgénicas derivadas de la línea w¹¹¹⁹ de *D. melanogaster*, el EtOH fue capaz de inducir la expresión de los genes *Cyp4e3*, *Cyp6a2*, *Cyp6a8*, *Cyp6a13*, *Cyp6t3*, *Cyp12a4* y *Cyp18a1*. Mientras que en larvas de segundo estadio temprano fueron los genes *Cyp4ac1* y *Cyp12e1* (Giraud *et al.*, 2010). Esto nos habla de que estos genes y sus proteínas resultantes están relacionadas con el metabolismo del EtOH. Sin embargo, en mamíferos está documentado que la enzima CYP2E1 es la que lleva acabo parte de la biotransformación del EtOH (Millonig *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2010; Álvarez *et al.*, 2017; Vadigepalli y Hoek, 2018).

En *D. melanogaster* se han reportado otras enzimas implicadas en el metabolismo del EtOH, como aldehído deshidrogenasa (ALDH) y alcohol deshidrogenasa (ADH), las cuales están involucradas en el metabolismo de aldehídos (Anderson y Banertt, 1991). También se sabe que la ALDH está implicada en la tolerancia del EtOH y en la disminución de la concentración de uno de sus metabolitos secundarios como es el acetaldehído (Anderson y Banertt, 1991; Fry y Saweikis, 2006; Fry *et al.*, 2007) y en la actividad de la ADH en adultos de *D. melanogaster* (Fry y Saweikis, 2006; Fry *et al.*, 2007). De igual manera Fry, (2014) reporta que a una mayor actividad de las enzimas ADH y ALDH hay una mayor metabolización del EtOH lo cual significa su rápida eliminación ya que esta última contribuye a reducir los niveles del acetaldehído en cepas europeas de *D. melanogaster*. Malherbe *et al.*, (2005) concluyen que un aumento en la actividad de ADH genera una mayor tolerancia al EtOH en adultos de dos líneas homocigotas para dos variantes de genotipos *Adh* (*Adh*^{SS} y *Adh*^{FF}) en *D. melanogaster*.

Otro motivo por el cual el EtOH no resultó genotóxico se debe a que está involucrado en el nivel de expresión de ciertos genes que pueden estar vinculados con su tolerancia o metabolismo (Rey, 2015). Kong *et al.* (2010) reportaron que la exposición al aire humidificado saturado con EtOH al 60% provocó el aumento en la expresión de los genes *cactus*, *Myd88* y *Tl*, los cuales están involucrados en la vía de señalización del sistema inmunitario innato. Así mismo Troutwine *et al.* (2016) reportaron que el sistema

inmunitario innato que predomina en *D. melanogaster* está mediado por los receptores tipo Toll los cuales se ven involucrados en la resistencia al EtOH, la cual se debe a la sobreexpresión de genes de la ruta de Toll los cuales son el gen *Spätzl*, *Peaje*, *Myd88*, *pell*, *cactus*, *Dif*, *dorsal* y *Relish*. Sin embargo, la ruta de Toll no genera una tolerancia manifiesta después de la interacción con EtOH.

El EtOH 1% provocó alteración en la distribución de las frecuencias acumuladas de clones *mwh* en la crucea BE, lo que puede significar una alteración en la división celular, esto podría ser explicado si se considera que se ha reportado que el EtOH puede presentar efecto teratogénico (Adams *et al.*, 2002; Aguilar, 2009) citotóxico, (Colomé *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2018) genotóxico (De Oliveira *et al.*, 2012; Otoba *et al.*, 2013) y tóxico (Aguilar, 2009; San *et al.*, 2017). Aunado a todo esto, el EtOH puede interferir en mecanismos de control del ciclo celular mediante el inicio de la cascada de fosforilaciones de proteínas. También se tienen reportes de que el EtOH y en específico el acetaldehído están involucrados en el deterioro del ciclo celular al detenerlo en la transición G₂/M en líneas celulares recombinantes Hep G2 (VA-13 y VL-17A). Esto se debe a la acumulación de la forma inactiva de la Cdc2 (Clemens *et al.*, 2003; Scheer *et al.*, 2016), la cual es producida por la activación de la proteína ATM que a su vez activa el punto de control de la enzima Chk2 provocando la fosforilación de la fosfatasa Cdc25C (Clemens *et al.*, 2011) y un incremento en el inhibidor de Cdc2, conocido como p21 (Scheer *et al.*, 2016). También en el proceso activo de apoptosis, como lo reportado en el trabajo de Sun *et al.* (2017) quienes demostraron que el EtOH indujo a apoptosis por el incremento en la actividad de la AChE en células SH-SY5Y de neuroblastoma humano y por el aumento el número de células apoptóticas en cerebros de hembras adultas de ratas. Otra manera que tiene el EtOH de generar apoptosis es por medio de la activación de la CASP 3, al aumento de la proteína NR1 y la concentración media de Ca²⁺ intracelular; lo que refleja un efecto citotóxico en la línea celular del neuroblastoma humano SK-N-SH (Wang *et al.*, 2018). Por otro lado, está el daño al DNA provocado por el acetaldehído como lo reportado por Hori *et al.* (2010) quienes encontraron que a una concentración muy alta de acetaldehído (1.8 mM) fue capaz de generar aductos de N2-etilideno-dG en células HL-60. De igual manera Balbo *et al.* (2016) encontraron

formación del aducto N2-etilideno-dG y el aducto crotonaldehído derivado de 1, N2-propano-2-dG en la mucosa esofágica de monos adultos *Macaca mulatta* a una dosis promedio de 2.3 ± 0.8 g de EtOH/kg de peso corporal por día.

Todo lo anterior, se muestra que el EtOH puede afectar la división celular, aunque la mayoría de los estudios fueron en pruebas *in vitro*, se necesita trabajar más en pruebas *in vivo* teniendo diferentes tiempos de exposición, que ayuden a tener una mayor información sobre el papel del EtOH en la división celular.

Tratamientos NIC

Las concentraciones de NIC 470, 940, 1880 y 3760 μ M utilizadas en este trabajo, no resultaron ser genotóxicas al ser comparadas con el testigo agua MiliQ en la craza BE. De igual manera que lo reportado por Carmona (2018) donde con el uso de la craza BE y a las mismas concentraciones empleadas en este trabajo obtiene el mismo efecto al no encontrar un incremento en la frecuencia de clones pequeños, grandes, gemelos y totales. Del mismo modo Gómez (2017) con el uso de la craza CE e iguales concentraciones de NIC 0.456, 1.9 y 3.8 mM a las empleadas en este trabajo, demostró un ligero incremento en las frecuencias de clones pequeños, gemelos y grandes, pero sin ser significativo.

La NIC no es genotóxica por que *D. melanogaster* presenta resistencia a la NIC (Carrillo, 2004) por la elevada expresión de CYP450s que presenta la craza BE. Además, en los insectos, la inducción de genes *CypP450s* y *ugt* codifican enzimas de la fase II del metabolismo xenobiótico, que confieren resistencia a los insecticidas (Lui *et al.*, 2015).

La NIC es metabolizada vía CYP450 en *D. melanogaster*, uno de ellos es el CYP6G1, ya que la NIC es capaz de provocar la inducción del gen *Cyp6g1* reflejándose en una sobreexpresión de dicho citocromo (Li *et al.*, 2012; Highfill *et al.*, 2017). También puede aumentar la expresión de los genes *Cyp28d1* (Marriage *et al.*, 2014; Highfill *et al.*, 2017), *Cyp28d2*, *Ugt86Dd* (Highfill *et al.*, 2017) y *Ugt86Dh*; los últimos 2 genes antes mencionados codifican (enzimas UDP-glucuronosiltransferasas) (Marriage *et al.*, 2014)

los cuales representan la variación genética funcional en la resistencia a la NIC (Marriage *et al.*, 2014; Highfill *et al.*, 2017). Se sabe que la NIC es capaz de favorecer la inducción del promotor del gen *Cyp6a8* en moscas de una línea transgénica reportera de *D. melanogaster* (Stroud, 2017). También se tiene información de que hay genes que no están involucrados con el metabolismo xenobiótico como tal, pero se tiene reporte que metabolizan a la NIC en *D. melanogaster* como lo encontrado por Carrillo (2004), en donde al mapear las inserciones del elemento P de algunos genes de líneas isogénicas que se retrocruzaron con la línea parental por 5 generaciones, he indica como responsables al gen que codifica para el factor de transcripción E2F, al gen Roundabout que codifica para el receptor transmembrana (robo) y al gen que codifica para la 6-fosfofructosa 2-quinasa (Pfrx) enzima involucrada en el metabolismo de la fructosa y la manosa. De manera que la elevada expresión de CYP450s presente en la cruce BE y el papel que tiene la NIC para inducir genes asociados a su metabolismo favorecieron a una mayor metabolización y excreción del metabolito, de esta manera no se presentó un daño genotóxico.

Con respecto a los resultados en la distribución de las frecuencias acumuladas de clones *mwh* la NIC provocó una alteración en la división celular en todos los tratamientos, sin saber, si el cambio en la división celular fue positivo o negativo. En trabajos anteriores del laboratorio de Toxicología Genética en la prueba SMART, se encontró de igual manera que la NIC está involucrada en la alteración de la división celular. Para la cruce BE, Carmona (2018) reportó las concentraciones de NIC 470, 940 y 3760 μM y para la cruce CE Gómez (2017) reportó dos concentraciones de NIC, 3.8 y 11.4 mM. Una de las posibles respuestas a esta alteración en la división celular podría deberse al papel que tiene la NIC sobre la apoptosis, ya que es capaz de inducirla por medio de la generación de ERO intracelulares que activan las vías de señalización que la regulan (Crowley-Weber *et al.*, 2003; Bodas *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2016). Bodas *et al.* (2016) encontraron que la NIC a concentraciones de 1.5 a 5 mM causa apoptosis por el incremento de estrés oxidativo, también por el incremento en la actividad de la CASP 3. Además de, el aumento de la autofagia originado por el incremento de la ubiquitinación de proteínas en células epiteliales bronquiales. De igual

manera, Kim et al. (2016) reportan un efecto apoptótico de la NIC 50, 100, 200 o 400 μM , provocado por ERO que activaron la vía de señalización MAPK, que activo el NF- κB , lo que ocasiona la detención del ciclo celular en la fase G2 a M. Incluso, Jalili et al. (2017) reportaron un efecto pro-apoptótico debido al incremento en la expresión de los genes *Casp2*, *Casp3*, *Bax* y la relación Bax/Bcl-2 en riñón e hígado de ratones BALB/c. Asimismo Cao et al. (2017) concluyen que la NIC a 10 y 50 μM incrementó la actividad de la CASP 3 en las HUVECs y de la apoptosis en estas células, debido a la ubiquitinación y degradación de Akt, a través de las proteínas TTC3 y MUL1. Del mismo modo la NIC 0,1 y 1 μM incrementó la actividad de la CASP 3 y Bax y causó disminución de Bcl-2 en osteoblastos humanos (Marinucci *et al.*, 2018).

Por otro lado, hay reportes contradictorios al efecto apoptótico de la NIC ya que a la concentración 0.5 μM fue capaz de suprimir la activación de la apoptosis de la vía de señalización intracelular quinasa Ras/ Raf/ MAP en las células epiteliales de pulmón de ratón LA4, provocando un aumento de la actividad de Ras, esta a su vez provoca el incremento en la cantidad y actividad de Raf, y desencadena un incremento de la MAP quinasa, lo que provoca que la célula pase de la fase G1 a S y encima, hubo un incremento de la PI3K y una sobreexpresión del gen ciclina D1 (*Cln D1*) lo cual provocó que las células se mantuvieran en las fases S, G1 y M (Chu *et al.*, 2005). También se tiene reporte de que la NIC 1 μM redujo la apoptosis al disminuir las células apoptóticas en dos líneas celulares de cáncer colorrectal humano (células Caco-2 y HCT-8), al aumentar la expresión de PI3K para la vía PI3K/Akt y PKC para la vía PKC /ERK1/2, que a su vez indujo un aumento de la expresión de survivina y la fosforilación de Bcl2 por medio de su sitio Ser⁷⁰ (Cuccina *et al.*, 2012). Guha et al. (2014) reportaron que en la línea celular de cáncer de mama (células MCF-7) la NIC a concentraciones de 1-100 μM provoca la inducción del receptor αnAChR el cual modula la activación del factor de transcripción STAT3, esto a su vez provocó el aumento de la expresión de la proteína LGALS3 capaz de suprimir la apoptosis al bloquear el daño mitocondrial. Recientemente, Jalili et al. (2017) concluyen que la NIC a 2.5 mg/kg de peso/día es capaz de generar un efecto antiapoptótico al disminuir la expresión de los genes *P53*, *Bcl2*, *Casp2* y *Casp3*.

Otra manera en donde la NIC puede alterar la apoptosis es por medio del cambio de potencial de membrana ya que al unirse a través de los sitios de unión de los nAChRs activan y cambian rápidamente las estructuras tridimensionales de los receptores para abrir el canal iónico, lo que permite la afluencia de cationes, entre ellos el calcio (Ca^{+2}), y provoca la despolarización de la membrana (Barik y Wonnacott, 2009; Jiang *et al.*, 2014). De este modo la NIC tiene la capacidad de incrementar la concentración intracelular de Ca^{+2} (Zhong *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2014; Hong *et al.*, 2017). Además, en *D. melanogaster* se ha reportado el incremento de Ca^{+2} intracelular por parte de la NIC como lo encontrado por Campusano *et al.* (2007) en donde la NIC aumentó los niveles de Ca^{+2} en las células Kenyon y de forma general en las neuronas observándose un efecto concentración-respuesta. Cabe resaltar que la concentración 10 μM lo hizo de manera drástica. Leyton *et al.* (2014) indican que la NIC aumenta los niveles de Ca^{+2} por medio de la activación de canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC) en las células Kenyon de *D. melanogaster*.

Por todo lo anteriormente expuesto, los efectos de la NIC en la apoptosis dependerán de los modelos empleados, de los marcadores celulares a estudiar y la concentración aplicada. La mayoría de los estudios mencionados con anterioridad fueron en pruebas *in vitro* y con concentraciones menores a las empleadas en este trabajo. Estas referencias apoyan el argumento de que la NIC pudo afectar la división celular. Aunque se necesitaría comprobar directamente si las concentraciones empleadas en este trabajo afectan a *D. melanogaster*.

Tratamiento RES

En este trabajo la concentración empleada de RES 0.40 μM no resultó ser genotóxica al ser comparada con su testigo EtOH 1%. Existen reportes en diferentes pruebas de genotoxicidad del efecto no genotóxico a concentraciones pequeñas de RES como lo reportado por Türkez y Şişman, (2012) quienes demostraron que el RES a una concentración de 10 o 15 μM no resultó ser genotóxico, ya que de ningún modo altero las frecuencias en la prueba CA y las del SCE en linfocitos periféricos humanos. De igual manera Yan *et al.*, (2012) demostraron que el RES a 5 μM no es genotóxico al no

inducir ningún daño al DNA de los linfocitos periféricos humanos, Abraham et al. (2016) con el uso de las pruebas de micronúcleos *in vivo* y de micronúcleos de bloque de citocinesis *in vitro* reportaron un efecto negativo de genotoxicidad por parte del RES, para la última prueba mencionada el RES a concentraciones 0.05 y 0.5 μM no incrementó la frecuencia de micronúcleos en las células HL-60. Por último, Gómez (2017), con la misma concentración de RES que en este trabajo en la prueba SMART cruza CE, reportó que no hubo daño genotóxico pese a que haya encontrado un incremento en la frecuencia de clones pequeños y totales al compararlo con su testigo EtOH y una disminución en clones grandes, sin embargo, estos aumentos no fueron significativos.

En la cruza BE de *D. melanogaster* hay una alta activación de la fase 1 del metabolismo xenobiótico por una mayor expresión de CYP450s, esto provocaría la biotransformación metabólica del RES, lo que favorece a su eliminación y la participación de sus metabolitos sin provocar una alteración grave o un efecto negativo de genotoxicidad. Para apoyar este argumento existe poca información de que CYP450s están involucrados con el metabolismo del RES, aunque la mayoría de la información que se tiene reporta las isoformas CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 en el metabolismo del RES (Potter *et al.*, 2002; Piver *et al.*, 2004). Hay pocos reportes sobre la capacidad del RES de inducir CYP450s salvo lo reportado por Chow et al. (2010) y Koe et al. (2014). De igual manera las enzimas de desintoxicación de fase II están en una alta expresión en la cruza BE, es por ende que se pensaría que parte del metabolismo del RES ocurre en dicha fase de esta manera evitaría su interacción y un posible daño a constituyentes celulares como el DNA. Existen reportes de que el RES induce enzimas de desintoxicación de la fase II como es la UDP-glucuroniltransferasa, la Glutathion S-transferasa y la Sulfotransferasa en ratones macho Swiss-Albino (CD1), en hembras y machos de *H. s. sapiens* y ratones machos salvajes C57BL/6Oca2^{p-un} (Canistro *et al.*, 2009; Chow *et al.*, 2010; Böhmendorfer *et al.*, 2017). Así que se infiere que es posible que el efecto encontrado en este trabajo del RES en *D. melanogaster* radique en la adecuación y coordinación de todas las actividades enzimáticas de las fases del metabolismo xenobiótico implicadas en su completa metabolización.

El RES provocó una alteración en la división celular este resultado concuerda con Gómez (2017), quien reporta que a esta misma concentración de RES 0.40 μM , pero en la cruz CE, encontró diferencias significativas en la frecuencia acumulada de clones *mwh* al compararlo con su testigo EtOH.

La alteración de la división celular por parte del RES a concentraciones bajas se podría explicar en parte al efecto antiproliferativo que se da a través de la regulación del ciclo celular. Se tiene reportado que el RES en un rango 12.5-100 μM inhibió la proliferación de células derivadas de carcinoma hepatocelular humano (células HepG2) de una manera concentración-dependiente sumado por la supresión en la replicación del DNA y que a su vez el RES está involucrado en la conducción de la fase G_1 a la fase S por la interacción con la proteína CDK2/ciclina E, ya que a concentraciones 6.25 y 12.5 μM incrementó su forma activa (fosfo-CDK2) y a 12.5 y 25 μM genera un acumulación de células en la fase S (Zhou *et al.*, 2009). Por otra parte, Fernández *et al.* (2012) encontraron que el RES de 10-100 μM inhibió el crecimiento celular de las líneas celulares de leucemia aguda humana (JURKAT E.6 y THP-1) de manera concentración-dependiente, lo que ocasiono que a concentraciones que oscilan entre 10-30 μM detiene el ciclo celular al generar una acumulación de células en la fase S. Del mismo modo Chin *et al.* (2014) reportan el efecto antiproliferativo en una línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231) con el uso de RES a 0.5, 1, 5 y 10 μM de una manera concentración-dependiente y además ocasionaron la detención del ciclo celular en la fase S. Así mismo Heo *et al.* (2018) concluyen que el RES a concentraciones muy pequeñas 10^{-2} , 10^{-1} , 1, 5 y 10 μM anula la viabilidad celular de la línea celular de melanoma (A375SM) y que las concentraciones de 1 y 10 μM ocasionan una detención del ciclo celular en la conducción de la fase G_2 a la fase M por medio de la expresión de las proteínas CDKN1A y CDKN1B. También se ha reportado el efecto proliferativo del RES a concentraciones bajas 0.1, 0.5 y 1 μM al aumentar la proliferación de células HPMC jóvenes con una mayor aceleración del crecimiento registrado para la concentración 0.5 μM (Mikuła *et al.*, 2012). Igualmente, Kumar *et al.* (2016) a concentraciones 1, 10 y 20 μM reportó aumento de la proliferación de células progenitoras neurales (HNPC) observándose un incremento

en las proteínas Nestina y SOX2 y solo la concentración RES 10 μ M indujo la proliferación de células HNPC por medio de la activación de la señalización MAPK al aumentar los niveles de las proteínas ERK1, ERK2 y p38 MAPK-quinasa. A su vez, Luengo et al. (2017) utilizando RES a concentraciones 1 y 10 μ M reportaron un efecto proliferativo en células HT-29 al obtener un incremento celular. Por otro lado, el RES a una dosis de 4 mL/4 μ g de forma *in vivo* incremento la proliferación de células cancerosas de mama al notarse una baja expresión de la proteína Er α y una alta expresión de la proteína Δ 16HER2. Algo semejante provocó el RES de manera *in vitro* ya que las concentraciones que oscilaron de 10-30 μ M promovieron la proliferación celular de dos líneas celulares tumorales la CAM6 y BT474 por medio de la activación de manera descendente la ruta de señalización de mTORC1/p70S6K/4EBP1 (Andreani *et al.*, 2017).

Para resumir el papel del RES en la división celular de manera positiva o negativa dependerá de su efecto antiproliferativo o proliferativo, y de acuerdo con los diferentes tipos celulares a probar, sin embargo, esto solo es un argumento que tendría que ser comprobado.

Co-tratamientos RES-NIC

Para este trabajo el co-tratamiento RES-NIC 0.40 + 3760 μ M resultó ser genotóxico al ser comparado con su testigo NIC 3760 μ M y los co-tratamientos que resultaron ser genotóxicos al ser comparados con el testigo EtOH 1% fueron a las concentraciones 0.40 + 470 μ M y 0.40 + 3760 μ M en la cruce BE. Por otro lado, está el reporte de que se han empleado concentraciones de RES y NIC muy similares a las utilizadas en este trabajo y que la interacción RES-NIC resultó genotóxica en la cruce CE. Gómez (2017) no encontró el efecto genotóxico del co-tratamiento 0.40 μ M + 3.8 mM. No obstante, el co-tratamiento 0.40 μ M + 1.9 mM sí resultó ser genotóxico. En este trabajo los co-tratamientos comparados con el testigo EtOH 1% fueron genotóxicos en la cruce BE. Sin embargo, en la cruce CE no lo fueron ya que el co-tratamiento 0.40 μ M + 470 μ M mostró frecuencias más altas en clones pequeños y totales al compararse con su testigo, pero sin ser significativas y el co-tratamiento RES-NIC 0.40 μ M + 3760 μ M

presentó frecuencias similares con su testigo EtOH. Aunque los co-tratamientos 0.40 μM + 1.9 mM y 0.40 μM + 11.4 mM sí produjeron genotoxicidad, curiosamente en la cruce BE el daño se presentó de manera tardía por el incremento en las frecuencias de clones pequeños, por el contrario, en la cruce CE se aprecia que el daño se presentó en su mayoría de manera temprana al presentarse un incremento en las frecuencias de clones grandes. Los resultados de genotoxicidad provocados por los co-tratamientos en las dos cruces difieren por la diferencia en la expresión de CYP450s que presentan ambas cruces.

El probable argumento para explicar el efecto genotóxico de los co-tratamientos RES-NIC se podría deber a que no se mantuvo un equilibrio entre oxidantes y antioxidantes, debido al agotamiento del antioxidante o la alta acumulación de ERO genera estrés oxidativo, lo cual promueve un desbalance en la señalización redox (Birben *et al.*, 2012; Poljsak *et al.*, 2013).

Es cierto que en este trabajo la NIC no ejerció genotoxicidad, pero se sabe que la NIC a concentraciones similares a las que se evaluaron los co-tratamiento con el RES provoca genotoxicidad (1000-4000 μM) (Kleinsasser *et al.*, 2005; Ginzkey *et al.*, 2010; Ginzkey *et al.*, 2014). Asimismo, esta genotoxicidad podría ser explicada a través de la producción de ERO. Se sabe que la NIC es capaz de inducir la generación de EROs intracelular (Bodas *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2016; Lan *et al.*, 2016) las cuales son capaces de generar un daño oxidativo a las nucleobases y a la desoxirribosa, también provocan enlaces cruzados DNA-proteína, roturas de cadena simple o doble del DNA, mutaciones, deleciones o translocaciones y reticulación con proteínas (Buonocore *et al.*, 2010; Birben *et al.*, 2012; Cadet *et al.*, 2012). Por todo lo anteriormente planteado, sería probable que la NIC al generar un elevado estrés oxidativo que provocará que la actividad antioxidante del RES fuera contrarrestada y que ocasionará que actuará como pro-oxidante.

Se tiene reportado que a concentraciones bajas tiene actividad pro-oxidante. Ahmad *et al.* (2003) demostraron que el RES 8 μM tuvo un efecto pro-oxidante al incrementar el nivel del radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ intracelular y en presencia de H_2O_2 ocasionaron un incremento

mayor de dicho radical en la línea celular HL-60. También Low et al. (2010) hallaron la capacidad pro-oxidante del RES en concentraciones que oscilaron de 10-30 μM al incrementar el nivel del radical O_2^{\cdot} en mitocondrias y de manera intracelular, lo cual resalta, que a 10 μM el incremento del radical fue constante lo que conlleva a la apoptosis de las células de leucemia humana. Por otra parte, Mikuła et al. (2014) en una línea celular de senescencia encontraron un incremento en la producción de EROs por parte del RES a 0.5 y 10 μM , en donde la última concentración tuvo un impacto mayor en la producción de EROs, al incrementar el potencial de membrana interna mitocondrial. Martins et al. (2014) reportan el efecto pro-oxidante del RES a 0.1 y 1 μM al incrementar la producción de especies reactivas intracelulares en las células HSC de una manera concentración-dependiente. Por último, Pignitter et al. (2016) reportan la actividad pro-oxidante del RES a concentraciones de 1 y 10 μM al promover un efecto promotor sobre la peroxidación del ácido linoleico en la prueba de la actividad antioxidante total.

Sumado al desbalance en la señalización redox, otro posible argumento para explicar la genotoxicidad presentada por los co-tratamientos RES-NIC se deba a la actividad de la NIC sobre las sirtuinas ya que está, al poder regular a la baja la expresión de las sirtuinas causaría una disminución en la resistencia al estrés oxidativo. Se tiene reportado que la NIC 1 mM puede causar una disminución en la expresión de SIRT1 en embriones de ratón cultivados (Lin *et al.*, 2012).

A su vez para este trabajo se encontró que en la cruza BE, el co-tratamiento 1880 + 0.40 μM generó una disminución significativa de la frecuencia de clones pequeños del 55.7% al compararse con su testigo RES. Se presentó que ninguna concentración empleada de NIC en este trabajo generó algún daño, por consiguiente se descarta la posibilidad de que el RES disminuyera dicho daño por la NIC, y más bien el efecto conjunto de ambos compuestos generó una disminución del daño endógeno al DNA promovido por las ERO que se generan a partir de subproductos metabólicos normales por medio del metabolismo oxidativo de las mitocondrias (Corrales y Muñoz, 2012). El daño reflejado por la tasa de mutación espontánea provocada por errores en la

replicación del DNA y elementos genéticos transponibles y que llegan a ocurrir de forma normal en el individuo. Este resultado no se reprodujo utilizando la misma concentración de RES y NIC para la cruce CE sino todo lo contrario ya que Gómez (2017), encontró que el co-tratamiento 1.9 mM + 0.40 µM produjo genotoxicidad, ya que hubo diferencias significativas en las frecuencias de clones grandes al compararse con su testigo RES lo que representa que hubo un efecto sinérgico entre ambos compuestos.

La posible respuesta para la protección al daño observada en este trabajo por el co-tratamiento se explique a través vía sirtuinas. Las sirtuinas son una familia grande de proteínas con actividad deacetilasas, mono-ADP-ribosiltransferasas (Yuan y Marmorstein, 2012; Dang, 2014) y muy pocas con actividad desalminilasa y desuccinilasa (Du *et al.*, 2011) que ejecutan diferentes procesos como la longevidad, el metabolismo energético resistencia al estrés oxidativo, regulación del ciclo celular por medio de la diferenciación celular, apoptosis y la segregación cromosómica, en la integridad genómica mediante la expresión genética (transcripción del DNA) activación de vías de reparación y recombinación del DNA (Yamamoto *et al.*, 2007; Finkel *et al.*, 2009; Houtkooper *et al.*, 2012). En específico la SIRT1 que presenta homología con la proteína Sir2 en *D. melanogaster* (Frankel *et al.*, 2010) facilita la reparación del DNA esto a través de mejorar la eficacia de la vía de unión final no homóloga, al incrementar la deacetilación de KAP1 de modo que, provoca una mayor asociación con 53BP1 (Lin *et al.*, 2015).

Con relación a lo anterior, se sabe que el RES está involucrado de varias maneras en la activación y expresión de las sirtuinas (Bagul *et al.*, 2015; 2018). Al activarlas generaría una protección al DNA contra el daño provocado por el estrés oxidativo. Se tiene muy poca información de la activación de sirtuinas en *D. melanogaster* salvo lo encontrado por Wood *et al.* (2004) quienes reportaron que el RES incrementó la actividad enzimática de Sir2, esto se ve reflejado por una mayor deacetilación de proteínas. Una forma del como el RES activa sirtuinas en humanos, es por medio de la estimulación de la deacetilación de péptidos y sustratos de proteínas como lo

encontrado por (Gertz *et al.*, 2012; Lakshminarasimhan *et al.*, 2013) en donde responsabilizan al RES en la activación de algunas sirtuinas de humanos como lo son SIRT1 y SIRT5 mediante dicha estimulación. El RES causa un aumento en la unión entre las láminas tipo A pertenecientes a la matriz nuclear con SIRT1 ocasionando la activación de SIRT1 de ahí que aumente la actividad deacetilasa de la proteína y su localización en la matriz mitocondrial (Liu *et al.*, 2012). Por último, se tiene información de que el RES es capaz de activar la SIRT3 por medio de la estimulación del complejo I mitocondrial reflejándose en un aumento de la oxidación de NADH generando una mayor concentración de NAD⁺/mitocondrial que funge como co-sustrato central para la activación de las sirtuinas (Desquirit *et al.*, 2013). No sólo vía sirtuinas el RES es capaz de proteger al DNA sino también por presentar interacciones directas con el DNA, y que se reflejarían en la eliminación del daño del DNA favoreciendo la reparación, recombinación y replicación del DNA. Ya que el RES a una concentración baja (0.5 µM) se ve involucrado en la replicación del DNA al favorecer la detención en la fase S y en el mantenimiento de los telómeros al no alterar su longitud, cabe señalar que está involucrado en la reparación del DNA al disminuir las roturas de doble cadena de DNA sumado a esto la disminución de la concentración de la 8-OHdG esto se debe por el incremento de la actividad del DNA glicosilasa I (Mikuła *et al.*, 2012).

Por su capacidad antioxidante el RES modula de forma indirecta el daño al DNA al contribuir en el balance de la señalización redox celular una manera para lograr dicho balance es el eliminar las ERO e inhibir la generación de RL. Está reportado que el RES previene la generación de ERO intracelulares lo cual provoca una disminución en el estrés oxidativo lo que equivale a la protección del DNA del daño oxidativo (Sgambato *et al.*, 2001; Rossi *et al.*, 2013) y hay que mencionar que el RES puede inhibir el daño al DNA causado por el radical [•]OH al provocar su eliminación y además la del radical O₂^{-•} (Leonard *et al.*, 2003).

La segunda manera es que el RES pueda contrarrestar el estrés oxidativo gracias a la activación de la vía de Nrf2/ARE. El Nrf2 es una proteína que solamente se presenta cuando hay estrés oxidativo y se une a un promotor de DNA, de tal forma que, inicia la

transcripción de genes diana, de esta manera regula y activa la expresión de los genes antioxidantes y sus proteínas contra el estrés oxidativo (Königsberg, 2007). En específico el Nrf2 presenta homología con la proteína Cnc-C (Cap 'n Collar isoforma C) en *D. melanogaster* cabe señalar que Cnc-C no solo es sensible al estrés oxidativo, sino que está implicado en el manteniendo de la proteostasis, resistencia a pesticidas y regularización del proceso de envejecimiento (Pitoniak y Bohmann, 2015). El RES tiene el efecto de activar el Nrf2 al incrementar su expresión de RNAm lo que conlleva su translocación al núcleo, manifestando la expresión de algunos genes regulados por ARE involucrados en el metabolismo de RL como son *Nqo1*, *Gclc*, *Gst*, *Sod*, *Gr* y *Hmox1*. Y cabe señalar que la reducción del estrés oxidativo mitocondrial y celular por parte del RES es a causa de la activación de Nrf2 (Rubiolo *et al.*, 2008; Ungvari *et al.*, 2010). Por consiguiente, se infiere que el contraste de resultados de los co-tratamientos se deba en parte por los diferentes efectos que presenta el RES como su actividad prooxidante, su papel en la señalización redox celular y por su papel en la integridad del DNA sumado por el efecto genotóxico y apoptótico de la NIC.

Por otra parte, la mayoría de los co-tratamientos RES-NIC generaron una alteración en la división celular, resultado obtenido por la comparación con sus testigos NIC. Sin embargo, dos co-tratamientos RES-NIC no alteraron la división celular los cuales son el co-tratamiento 1880 + 0.40 μ M al ser comparado con el testigo EtOH 1% y el co-tratamiento 3760 + 0.40 μ M con respecto al tratamiento RES en la cruza BE. Algo semejante ocurrió con Gómez (2017) en donde utilizó concentraciones idénticas de RES-NIC encontró que todos los co-tratamientos alteraron la división celular al compararlos con el testigo EtOH para la cruza CE. Similarmente Magaña (2017) encontró que los co-tratamientos RES-NIC alteraron la división celular en la cruza BE, no obstante, empleó una diferente concentración de RES 11 μ M y diferentes concentraciones de NIC 12.5, 25 y 50 μ M. Y en específico Carmona (2018) reportó la alteración en la división celular de la interacción RES-NIC solo para dos co-tratamientos a concentraciones de NIC 1.9 y 3.8 mM y RES 11 μ M.

Para este trabajo la NIC y el RES por si solos tuvieron que ver con la alteración en la división celular esto quizás hace pensar que el efecto conjunto de RES-NIC reforzó dicha alteración lo que conlleva a que la NIC por su efecto genotóxico y por su capacidad de generar ERO y al tener en cuenta el efecto genotóxico del RES a bajas concentraciones, más el comportamiento pro-oxidante del RES. Posiblemente generarían un aumento en el daño celular reflejándose en un efecto citotóxico por parte de los co-tratamientos. No obstante, para considerar este argumento se necesitan los estudios que determinen la citotoxicidad de la interacción RES-NIC.

Por último, con respecto a los dos co-tratamientos RES-NIC que no afectaron la división celular, pero si sus testigos NIC posiblemente se deba a la protección del RES mediante vía sirtuinas, disminuyendo el daño celular causado por la NIC lo que provocaría una baja frecuencia de clones *mwh*.

Conclusiones

No se pudo calcular una CL_{50} debido a que en ninguna concentración se obtuvo un 100 % de mortalidad. Pero todos los tratamientos y co-tratamientos mostraron diferencias significativas con respecto a sus testigos.

Ningún tratamiento de NIC resultó genotóxico en la cruce BE de *D. melanogaster*, pero si alteraron la división celular de los discos imaginales de las alas resultado de su papel en el proceso de apoptosis.

La concentración de RES 0.40 μM no resultó ser genotóxico en *D. melanogaster* sin embargo sí tuvo que ver con una variación en la división celular quizá a consecuencia de su efecto proliferativo o antiproliferativo.

Los co-tratamientos RES-NIC 0.40 μM + 470 μM y 0.40 μM + 3760 μM no solo resultaron genotóxicos, si no también alteraron la división celular de *D. melanogaster*, seguramente por el desbalance en la señalización redox provocado por la interacción RES-NIC. Además, la mayoría de los co-tratamientos mostraron efecto sobre la división celular probablemente al producirse citotoxicidad.

El co-tratamiento RES-NIC 0.40 μM + 1880 μM presenta una disminución del daño provocado por la tasa de mutaciones espontáneas y por el daño oxidativo del metabolismo aeróbico en *D. melanogaster* asimismo no afectó la división celular de los discos imaginales de las alas.

Literatura Citada

- Abdu, S. B. y Al-Bogami, F. M. (2017). Influence of resveratrol on liver fibrosis induced by dimethylnitrosamine in male rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 26(1): 201-209.
- Abraham, S. K., Khandelwal, N., Hintzsche, H. y Stopper, H. (2015). Antigenotoxic effects of resveratrol: assessment of *in vitro* and *in vivo* response. *Mutagenesis*. 31(1): 27-33.
- Acosta, G. B. y Acosta, S. B. (2017). Xenobióticos. *Ciencia y Desarrollo*. 6: 27- 33.
- Adams, J., Bittner, P., Buttar, H. S., Chambers, C. D., Collins, T. F. X., Daston, G. P., Filkins, K., Flynn, T. J., Graham, J. M., Jones, K. L., Kimmel, C., Lammer, E., Librizzi, R., Mitala, J. y Polifka, J. E. (2002). Statement of the Public Affairs Committee of the Teratology Society on the fetal alcohol syndrome. *Teratology*. 66(6): 344-347.
- Aguilar, H. D. (2009). Comparación del efecto teratogénico Griseofulvina y Etanol en el desarrollo larvario de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ahmad, K. A., Clements, M. V. y Pervaiz, S. (2003). Pro-oxidant Activity of Low Doses of Resveratrol Inhibits Hydrogen Peroxide Induced Apoptosis. *Annals of The New York Academy of Sciences*. 1010(1): 365-373.
- Alexandrov, L. B., Ju, Y. S., Haase, K., Van Loo, P., Martincorena, I., Nik-Zainal, S., Totoki, Y., Fujimoto, A., Nakagawa, H., Shibata, T., Campbell, P. J., Vineis, P., Phillips, D. H. y Stratton, M. R. (2016). Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. *Science*. 354(6312): 618-622.
- Allocca, M., Zola, S. y Bellosta, P. (2018). Capítulo 6 The Fruit Fly, *Drosophila melanogaster*: The Making of a Model (Part I). En Khan, P. F. (Ed). *Drosophila melanogaster: Model for Recent Advances in Genetics and Therapeutics*. (pp. 114-124). Croacia. Intechopen. Recuperado de: <https://www.intechopen.com/books/drosophila-melanogaster-model-for-recent-advances-in-genetics-and-therapeutics/the-fruit-fly-drosophila-melanogaster-the-making-of-a-model-part-i-#B27>
- Andersen, J. L., Manenti, T., Sørensen, J. G., MacMillan, H. A., Loeschcke, V. y Overgaard, J. (2015). How to assess *Drosophila* cold tolerance: chill coma temperature and lower lethal temperature are the best predictors of cold distribution limits. *Functional Ecology*. 29(1): 55-65.

- Anderson, S.M. y Barnett, S.E. (1991). The involvement of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase in alcohol/aldehyde metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Genética*. 83(2): 99-106.
- Andreanic, C., Bartolacci, C., Wijnant, K., Crinelli, R., Bianchi, M., Magnani, M., Hysi, A., Lezzi, M., Amici, A. y Marchini, C. (2017). Resveratrol fuels HER2 and ER α -positive breast cancer behaving as proteasome inhibitor. *Impact Journals Aging*. 9(2): 508-520.
- Asimov, I. (2015). Capítulo 5 Oxidative stress and redox regulation: adaptation, damage, repair, senescence, and death. En Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C. (Ed.) *Free Radicals in Biology & Medicine*. (pp. 200-205). United Kingdom: Editorial Oxford University Press. Recuperado de: <https://www.oxfordscholarship.com/view/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001/acprof-9780198717478-chapter-5>
- Asociación Americana de Psiquiatría. (2014). Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-5®). 5ª Ed. Ciudad de Arlington, VA: Panamericana. Recuperado de: https://www.academia.edu/17057730/Manual_Diagnostico_y_Estadistico_de_los_Trastornos_Mentales_DSM-5_APA_5ed_booksmedicos
- Álvarez, A. S. M., Fernández, S. A., Navarrete, M. E. M., Vioque, J. y Tardón, A. (2017). Efecto del alcohol y sus metabolitos en el cáncer de pulmón: estudio CAPUA. *Medicina Clínica*. 148(12): 531-538.
- Ávalos, G. A. y Pérez, U. C. E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA (Biología)*. 2(3): 119-145.
- Balbo, S., Cervera, J. R., Khariwala, S., Baker, E. J., Daunais, J. B. y Grant, K. A. (2016). Increased levels of the acetaldehyde-derived DNA adduct N2-ethyldeoxyguanosine in oral mucosa DNA from Rhesus monkeys exposed to alcohol. *Mutagénesis*. 31(5): 553–558.
- Baeta de Oliveira, C., Terezinha, K. C., Baltazar, D. L. y Bacaicoa, M. H. (2011). Estudio de la nicotina a través de la quimioprevención. *Revista de la Universidad de Ibirapuera*. Universidad de Ibirapuera. San Paulo. 1(1): 26-30.
- Bagul, P. K., Dinda, A. K. y Banerjee, S. K. (2015). Effect of resveratrol on sirtuins expression and cardiac complications in diabetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 468(1-2): 221-227.
- Bagul, P. K., Katare, P. B., Bugga, P., Dinda, A. K., y Sanjay, K. B. (2018). SIRT-3 modulation by resveratrol improves mitochondrial oxidative phosphorylation in diabetic heart through deacetylation of TFAM. *Cells*. 7(12): 235.

Bainton, R. J., Tsai, L. T. Y., Singh, C. M., Moore, M. S., Neckameyer, W. S. y Heberlein, U. (2000). Dopamine modulates acute responses to cocaine, nicotine and ethanol in *Drosophila*. *Current Biology*. 10(4):187-194.

Barik, J. y Wonnacott, S. (2009). Molecular and Cellular Mechanisms of Action of Nicotine in the CNS. *Nicotine Psychopharmacology*. 192: 173-207.

Barr, J., Sharma, C. S., Sarkar, S., Wise, K., Dong, L., Periyakaruppan, A. y Ramesh, G. T. (2007). Nicotine induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor kappa B in rat mesencephalic cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 297(1-2): 93-99.

Barrera, G. (2012). Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *International Scholarly Research Network Oncology*. 2012: 1-21.

Benlloch, C. S. (2008). Metilación y cáncer. *Gastroenterología y Hepatología Continuada*. 7(1): 20-22.

Benowitz, N. L., Hukkanen, J. y Jacob, P. (2009). Capítulo 2 Nicotine Chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers. En Henningfield, J. E., Edythe, D. L. y Sakire, P. (Ed.), *Nicotine Psychopharmacology* (pp. 29-40). USA.: Editorial Board. Recuperado de: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-540-69248-5.pdf>

Benowitz, N. L. (2010). Nicotine Addiction. *New England Journal of Medicine*. 362(24): 2295-2303.

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S. y Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*. 5(1): 9-19.

Bodas, M., Van Westphal, C., Carpenter, T. R., Mohanty, K. D. y Vij, N. (2016). Nicotine exposure induces bronchial epithelial cell apoptosis and senescence via ROS mediated autophagy-impairment. *Free Radical Biology and Medicine*. 97: 441-453.

Bonekamp, N. A., Völkl, A., Fahimi, H. D. y Schrader, M. (2009). Reactive oxygen species and peroxisomes: Struggling for balance. *Bio Factors*. 35(4): 346-355.

Böhmdorfer, M., Szakmary, A., Schiestl, R., Vaquero, J., Riha, J., Brenner, S., Thalhammer, T., Szekeres, T. y Jäger, W. (2017). Involvement of UDP-Glucuronosyltransferases and Sulfotransferases in the Excretion and Tissue Distribution of Resveratrol in Mice. *Nutrients*. 9(12): 1347.

Brown, K. M., von Weymarn, L. B. y Murphy, S. E. (2005). Identification of N-(Hydroxymethyl) Norcotinine as a Major Product of Cytochrome P450 2A6, but Not Cytochrome P450 2A13-Catalyzed Cotinine Metabolism. *Chemical Research in Toxicology*. 18(12):1792-1798.

Buonocore, G., Perrone, S. y Tataranno, M. L. (2010). Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 15(4): 186-190.

Burton, G. y Ingold, K. (2015). Capítulo 3 Antioxidant defences synthesized *in vivo*. En Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C. (Ed.) *Free Radicals in Biology & Medicine*. (pp. 72-80). United Kingdom: Editorial Oxford University Press. Recuperado de: <https://www.oxfordscholarship.com/view/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001/acprof-9780198717478-chapter-3>

Cadet, J., Ravanat, J. L., Taverna, P. M., Menoni, H. y Angelov, D. (2012). Oxidatively generated complex DNA damage: Tandem and clustered lesions. *Cancer Lett*. 327(1-2): 5-15.

Calle, V. E. y Melgarejo, P. I. (2005). Oxidantes en el humo del cigarrillo y enfermedad cardiopulmonary. *Cuad. - Hosp. Clín*. 50(1): 88-92.

Campusano, J. M., Su, H., Jiang, S. A., Sicaeros, B. y O'Dowd, D. K. (2007). nAChR-mediated calcium responses and plasticity in *Drosophila* Kenyon cells. *Developmental Neurobiology*. 67(11): 1520-1532.

Canistro, D., Bonamassa, B., Pozzetti, L., Sapone, A., Abdel, R. S. Z., Biagi, G. L. y Paolini, M. (2009). Alteration of xenobiotic metabolizing enzymes by resveratrol in liver and lung of CD1 mice. *Food and Chemical Toxicology*. 47(2): 454-461.

Cao, X., Han, C., Wen, J., Guo, X. y Zhang, K. (2017). Nicotine increases apoptosis in HUVECs cultured in high glucose/high fat via Akt ubiquitination and degradation. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 45(2): 198-204.

Carretero, J. Carcinógenos y origen del cáncer de pulmón. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas CNIO. [En línea]. 2005. [Fecha de acceso 5 de Mayo del 2019]. Recuperado de: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.464.4120&rep=rep1&type=pdf>

Carrillo, E. R., Díaz, P. M. J. A., Peña, P. C. A., Flores, R. O. I., Neri, M. R., Zepeda, M. A. D., Pérez, C. Á. A. y Ortiz, T., A. (2016). Especies reactivas de oxígeno, sepsis y teoría metabólica del choque séptico. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*. 59(1): 6-18.

Cashman, J. R., Park, S.B., Yang, Z. C., Wrighton, S.A., Jacob, P. y Benowitz, N. L. (1992). Metabolism of Nicotine by Human Liver Microsomes: Stereoselective Formation of trans-Nicotine N-Oxide. *Chemical Research in Toxicology*. 5(5):639-46.

Castañeda, P. M. L. (2003). Valoración genotóxica del acetato de plomo y la dimetilnitrosamina (DMN) en las cruces AB y ST de *Drosophila melanogaster*

pretratadas con fenobarbital mediante la prueba SMART. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

Castañeda, P. M. L., Heres, P. M. E., Guzmán, R. J., Hernández, P. L. B., Dueñas, G. I. E., Durán, D. A. y Delfín, A. I. (2011). Lead acetate does not inhibit dimethylnitrosamine activation and interacts with phenobarbital which is genotoxic in the ST cross of the *Drosophila* wing spot test. *Food and Chemical Toxicology*. 49: 2172-2179.

Castañeda, P. M. L., Heres, P. M. E. y Dueñas, G. I. E. (2013). *Drosophila melanogaster* un modelo experimental. UNAM, FES Iztacala. Mexico D.F. 86 pp.

Carmona, A. C. (2018). Evaluación del posible efecto modulador del resveratrol en cotratamiento con nicotina, con SMART en ala de *Drosophila melanogaster*, cruza de bioactivación elevada (HB). Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala Universidad Nacional Autónoma de México.

Cha, Y.I., Kim, H.S. (2013). Emerging role of sirtuins on tumorigenesis: possible link between aging and cancer. *BMB Reports*. 46(9): 429-438.

Charlesworth, J. C., Curran, J. E., Johnson, M. P., Göring, H. HH., Dyer, T. D., Diego, V. P., Kent Jr. J. W., Mahaney, M. C., Almasy, L., MacCluer, J. W., Moses, E. K. y Blangero, J. (2010). Epidemiología transcriptómica del tabaquismo: el efecto del tabaquismo sobre la expresión génica en linfocitos. *BMC Medical Genomics*. 3(1): 29.

Chen, G., Giambone, N. E., Dluzen, D. F., Muscat, J. E., Berg, A., Gallagher, C. J. y Lazarus, P. (2010). Glucuronidation Genotypes and Nicotine Metabolic Phenotypes: Importance of Functional UGT2B10 and UGT2B17 Polymorphisms. *Cancer Research*. 70(19): 7543-7552.

Chin, Y. T., Hsieh, M. T., Yang, S. H., Tsai, P. W., Wang, S. H., Wang, C. C., Lee, Y. S., Cheng, G. Y., Huang, F. W. C., London, D., Tang, H. Y., Fu, E., Yen, Y., Liu, L. F., Lin, H. Y. y Davis, P. J. (2014). Anti-proliferative and gene expression actions of resveratrol in breast cancer cells *in vitro*. *Oncotarget*. 5(24): 12891-12907.

Chow, H. H. S., Garland, L., Hsu, C. H., Vining, D. R., Chew, W. M., Miller, J. A., Perloff, M., Crowell, J. A. y Alberts, D. (2010). Resveratrol Modulates Drug and Carcinogen-Metabolizing Enzymes in a Healthy Volunteer Study. *Cancer Prevention Research*. 3(9):1168-1175.

Chu, M., Guo, J., y Chen, C. Y. (2005). Long-term Exposure to Nicotine, via Ras Pathway, Induces Cyclin D₁ to Simulate G₁ Cell Cycle Transition. *Journal of Biological Chemistry*. 280(8): 6369-6379.

Ciolino, L. A., Turner, J. A., McCauley, H. A., Smallwood, A. W. y Yi, T. Y. (1999). Optimization study for the reversed-phase ion-pair liquid chromatographic

determination of nicotine in commercial tobacco products. *Journal of Chromatography A*. 852(2): 451-463.

Cisternino, S., Chapy, H., André, P., Smirnova, M., Debray, M. y Scherrmann, J. M. (2012). Coexistence of Passive and Proton Antiporter-Mediated Processes in Nicotine Transport at the Mouse Blood–Brain Barrier. *The AAPS Journal*. 15(2): 299-307.

Clemens, D. L. Calisto, L. E. Sorell, M. F. y Tuma, D. J. (2003). Ethanol metabolism results in a G2/M cell-cycle arrest in recombinant Hep G2 cells. *Hepatology*. 38(2): 385-393.

Clemens, D. L., Schneider, K. J. y Nuss, R. F. (2011). Ethanol metabolism activates cell cycle checkpoint kinase, Chk2. *Alcohol*. 45(8): 785-793.

Colomé, P. J. A., Jordá, T. J., Fernández, R. G., Segoviano, M. R., Díaz, F. A. J. y Espinós, P. D. (2003). Radicales libres y citotoxicidad del etanol en los leucocitos humanos de sangre venosa periférica. *Anales de Medicina Interna (Madrid)*. 20(8): 396-398.

Corrales, L. C. y Muñoz, A. M. M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova*. 10(18): 213-225.

Coutiños, R. E. M. R., Purata, A. y Hernández, C. P. (2010). Citocromo P450 biomarcador de exposición terapéutico-toxicológico-carcinogénico. *Revista de Educación Bioquímica*. 29(2): 39-52.

Crowley-Weber, C. L., Dvorakova, K., Crowley, C., Bernstein, H., Bernstein, C., Garewal, H. y Payne, C. M. (2003). Nicotine increases oxidative stress, activates NF- κ B and GRP78, induces apoptosis and sensitizes cells to genotoxic/xenobiotic stresses by a multiple stress inducer, deoxycholate: relevance to colon carcinogenesis. *Chemico-Biological Interactions*. 145(1): 53–66.

Cruz, C. E. L. (2015). Efecto del Resveratrol y del co-tratamiento resveratrol-nicotina en la longevidad de *D. melanogaster* (Meigen, 1830). Facultad de Estudios Superiores Iztacala Universidad Nacional Autónoma de México.

Cucina, A., Dinicola, S., Coluccia, P., Proietti, S., D'Anselmi, F., Pasqualato, A. y Bizzarri, M. (2012). Nicotine stimulates proliferation and inhibits apoptosis in colon cancer cell lines through activation of survival pathways. *Journal of Surgical Research*. 178 (1): 233-241.

C.C.R.S.E.R.I. Comité Científico sobre Riesgos de Salud Emergentes y Recientemente Identificados de la Unión Europea. (2010). Recuperado de: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenih_r_o_029.pdf

C.M.C.T. El Convenio Marco de la OMS para el Control del Tabaco. (2003). Recuperado de: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42813/9243591010.pdf;jsessionid=B9AD3F28DBEC84410EE875435C525738?sequence=1>

Dang, W. (2014). The controversial world of sirtuins. *Drug Discovery Today: Technologies*. 12: e9-e17.

Dawson, D. A., Fort, D. J., Smith, G. J., Newell, D. L. y Bantle, J. A. (1988). Evaluation of the developmental toxicity of nicotine and cotinine with frog embryo teratogenesis assay: *Xenopus*. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*. 8(6): 329–338.

Desquirit, D. V., Gueguen, N., Leman, G., Baron, S., Nivet, A. V., Chupin, S., Chevrollier, A., Vessières, E., Ayer, A., Ferré, M., Bonneau, D., Henrion, D., Reynier, P. y Procaccio, V. (2013). Resveratrol induces a mitochondrial complex I-dependent increase in NADH oxidation responsible for sirtuin activation in liver cells. *Journal of Biological Chemistry*. 288(51): 36662-36675.

De Oliveira, N. C. D., Sarmiento, M. S., Nunes, E. A., Porto, C. M., Rosa, D. P., Bona, S. R., Rodrigues, G., Marroni, N. P. Pereira, P., Picada, J. N., Ferraz, A. B. F. Thiesen, F. V. y Da Silva, J. (2012). Rosmarinic acid as a protective agent against genotoxicity of ethanol in mice. *Food and Chemical Toxicology*. 50(5):1208-1214.

Du, J., Zhou, Y., Su, X., Yu, J. J., Khan, S., Jiang, H., Kim, J., Woo, J., Kim, J. H., Choi, B. H., He, B., Chen, W., Zhang, S., Cerione, R. A., Auwerx, J., Hao, Q. y Lin, H. (2011). Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science*. 334(6057): 806-809.

Dueñas, G. I. E. (2002). Efecto mutagénico y recombinogénico de la P-Fenilenediamina y la O-Fenilenediamina mediante la prueba de mutación somática en alas de *Drosophila melanogaster* cruza E y A. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. Pág 47-50.

Dueñas, G. I. E., Heres, P. M. E., Castañeda, P. L. y Graf, U. (2002). Easy rising of *Drosophila melanogaster* consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. Technique note. *Drosophila Information Service*. 84: 166.

Durán, D. A., Vargas, V. A. y Cisneros, C. A. E. (2012). Bioestadística. México, Tlalnepantla: UNAM, FES Iztacala.

Dusinska, M., Rundén, P. E., Carreira, S. C. y Saunders, M. (2012). Capítulo 4 Critical Evaluation of Toxicity Tests. En Fadeel, B., Pietroiusti, A. y Shvedova, A. A. (Ed.). *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials: Exposure, Toxicology, and Impact on Human Health* (pp. 63-83). USA.: Editorial Academic Press. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123869401000040>

D.S.S.H.E.U. Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos. The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General. [En línea]. 2014. [Fecha de acceso 20 de Mayo del 2019]. Disponible en: <https://www.hhs.gov/surgeongeneral/reports-and-publications/tobacco/index.html>

Fernández, P. F., Belchí, N. S., Almagro, L., Bru, R., Pedreño, M. A. y Gómez, R. L. V. (2012). Cytotoxic Effect of Natural trans-Resveratrol Obtained from Elicited *Vitis vinifera* Cell Cultures on Three Cancer Cell Lines. *Plant Foods for Human Nutrition*. 67(4): 422-429.

Ferrís, T. J., Ortega, G. J. A., López, A. J. A., Berbel, T. O., Marco, M. A. y García, C. J. (2004). Tabaquismo parental y cáncer pediátrico. *Revista Española de Pediatría: Clínica de Investigación*. 60(3): 225-236.

Flybase. 2019a. [En Línea] 15 de julio del 2019 [Fecha de acceso: 15 de julio del 2019] Accesible en: <https://flybase.org/reports/FBgn0264272>

Flybase. 2019b. [En Línea] 15 de julio del 2019 [Fecha de acceso: 15 de julio del 2019] Accesible en: <https://flybase.org/reports/FBgn0260049>

Flybase. 2019c. [En Línea] 15 de julio del 2019 [Fecha de acceso: 15 de julio del 2019] Accesible en: <https://flybase.org/reports/FBgn0013771>

Flybase. 2019d. [En Línea] 15 de julio del 2019 [Fecha de acceso: 15 de julio del 2019] Accesible en: <https://flybase.org/reports/FBgn0000473>

Flybase. 2019e. [En Línea] 15 de julio del 2019 [Fecha de acceso: 15 de julio del 2019] Accesible en: <https://flybase.org/reports/FBgn0013772>

Finkel, T., Deng, C. X. y Mostoslavsky, R. (2009). Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature*. 460(7255): 587-591.

Frankel, S., Ziafazeli, T. y Rogina, B. (2011). dSir2 and longevity in *Drosophila*. *Experimental Gerontology*. 46(5): 391-396.

Frei, H. y Würigler, F. E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*. 203(4): 297-308.

Frei, H. y 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*. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*. 334(2): 247-258.

- Frei, H., Graf, U. y Würigler, F. E. (1998). Induced loss of heterozygosity in somatic cells of *Drosophila melanogaster* is as sensitive indicator of genotoxicity. *Toxicology Letters*. 95(1001): 43.
- Fry, J. D. (2014). Mechanisms of naturally evolved ethanol resistance in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*. 217: 22.
- Fry, J. D. y Saweikis, M. (2006). Aldehyde dehydrogenase is essential for both adult and larval ethanol resistance in *Drosophila melanogaster*. *Genetical Research*. 87(2): 87-92.
- Fry, J. D., Donlon, K. y Saweikis, M. (2007). A worldwide polymorphism in aldehyde dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*. evidence for selection mediated by dietary ethanol. *Evolution*. 62(1): 66-75.
- Frölich, A. y Würigler, F. E. (1989). New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*. 216(3): 179-187.
- Galbraith, A. I., Barker, M. y Itzhaki, R. F. (1979). Methylation of DNAase-digestible DNA and of RNA in chromatin from rats treated with dimethylnitrosamine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*. 561(2): 334-344.
- Gambini, J., Inglés, M., Olaso, G., Lopez, G. R., Bonet, C. V., Gimeno, M. L., Mas, B. C., Abdelaziz, K. M. Gomez, C. M. C., Vina, J. y Borras, C. (2015). Properties of Resveratrol: *In Vitro* and *In Vivo* Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015: 1-13.
- Gertz, M., Nguyen, G. T. T., Fischer, F., Suenkel, B., Schlicker, C., Fränzel, B., Tomaschewski, J., Aladini, F., Becker, C., Wolters, D. y Steegborn, C. (2012). A Molecular Mechanism for Direct Sirtuin Activation by Resveratrol. *PLOS ONE*. 7(11).
- Ginzkey, C., Friehs, G., Koehler, C., Hackenberg, S., Voelker, H. U., Richter, E. y Kleinsasser, N. H. (2010). Nicotine and methyl methane sulfonate in mini organ cultures of human parotid gland tissue. *Toxicology Letters*. 197(2) :69-74.
- Ginzkey, C., Steussloff, G., Koehler, C., Burghartz, M., Scherzed, A., Hackenberg, S., Hagen, R. y Kleinsasser, N. H. (2014). Nicotine derived genotoxic effects in human primary parotid gland cells as assessed *in vitro* by comet assay, cytokinesis-block micronucleus test and chromosome aberrations test. *Toxicology in Vitro*. 28(5): 838-846.
- Giraud, M., Unnithan, G. C., Le Goff, G. y Feyereisen, R. (2010). Regulation of cytochrome P450 expression in *Drosophila*: Genomic insights. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 97 (2):115-122.

- Goto, Y., Matsuda, T., Ito, K., Huh, N., Thomale, J., Rajewsky, M. F., Hayatsu, H. y Negishi, T. (1999). Mutagenicities of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in *Drosophila* and their relationship to the levels of O-alkyl adducts in DNA. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 425(1):125-134.
- Gómez, L. B. (2017). Evaluación del efecto del Resveratrol en co-tratamiento con Nicotina en SMART en ala de *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera, Drosophilidae), CE. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala Universidad Nacional Autónoma de México.
- Graf, U., Würigler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B. y Kale, P. G. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 6(2): 153-188.
- Graf, U. y van Schaik, N. (1992). Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*. 271(1): 59-67.
- Graf, U., Abraham, S. K., Guzmán, J. R. y Würigler, F. E. (1998). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 402(1): 203-209.
- Grybko, M., Sharma, G. y Vijayaraghavan, S. (2010). Functional Distribution of Nicotinic Receptors in CA3 Region of the Hippocampus. *Journal of Molecular Neuroscience*. 40(1-2): 114-120.
- Guarente, L., (2005). Calorie restriction and SIR2 genes-towards a mechanism. *Mechanisms of Ageing and Development*. 126, 923-928.
- Guha, P., Bandyopadhyaya, G., Polumuri, S. K., Chumsri, S., Gade, P., Kalvakolanu, D. V. y Ahmed, H. (2014). Nicotine promotes apoptosis resistance of breast cancer cells and enrichment of side population cells with cancer stem cell-like properties via a signaling cascade involving galectin-3, $\alpha 9$ nicotinic acetylcholine receptor and STAT3. *Breast Cancer Research and Treatment*. 145(1): 5-22.
- Gupta, R. K., Patel, A. K., Shah, N., Choudhary, A. K., Jha, U. K., Yadav, U. C., Gupta, P. K. y Pakuwal, U. (2014). Oxidative Stress and Antioxidants in Disease and Cancer: A Review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 15(11): 4405-4409.
- Guzmán, R. J. y Graf, U. (1995). *Drosophila melanogaster* Somatic Mutation and Recombination Test as a biomonitor. In: Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change. *Environmental Science Research*. 50: 169-181.
- Gülçin, İ. (2010). Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 11(1): 210-218.

Hecht, S. S. (2003). Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nature Reviews Cancer*. 3(10): 733-744.

Heo, J. R., Kim, S. M., Hwang, K. A., Kang, J. H. y Choi, K. (2018). Resveratrol induced reactive oxygen species and endoplasmicreticulum stress-mediated apoptosis, and cell cycle arrest in the A325SM malignant melanoma cell line. *International Journal of Molecular Medicine*. 42(3): 1427-1435.

Heres, P.M.E., Dueñas, G. I., Castañeda, P. L., Sánchez, G. A., Contreras, S. M., Durán, D. Á. y Graf, U. (2004). Genotoxicity of tamoxifen citrate and 4-nitroquinoline-1-oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis*. 19 (3): 187-193.

Highfill, C. A., Tran, J. H., Nguyen, S. K. T., Moldenhauer, T. R., Wang, X. y Macdonald, S. J. (2017). Naturally Segregating Variation at Ugt86Dd Contributes to Nicotine Resistance in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 207(1): 311-325.

Hobbs, C. A., Recio, L., Streicker, M., Boyle, M. H., Tanaka, J., Shiga, A. y Witt, K. L. (2015). Comet assay evaluation of six chemicals of known genotoxic potential in rats. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 786-788: 172-181.

Hong, W., Peng, G., Hao, B., Liao, B., Zhao, Z., Zhou, Y., Peng, F., Ye, X., Huang, L., Zheng, M., Pu, J. Liang, C., Yi, E., Peng, H., Li, B. y Ran, P. (2017). Nicotine-Induced Airway Smooth Muscle Cell Proliferation Involves TRPC6-Dependent Calcium Influx Via $\alpha 7$ nAChR. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 43(3): 986-1002.

Hori, K., Miyamoto, S., Yukawa, Y., Muto, M., Chiba, T. y Matsuda, T. (2012). Stability of acetaldehyde-derived DNA adduct *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 423(4): 642-646.

Houtkooper, R. H., Pirinen, E. y Auwerx, J. (2012). Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 13(4): 225-238.

Jalili, C., Salahshoor, M., Moradi, M., Ahookhash, M., Taghadosi, M. y Sohrabi, M. (2017). Expression Changes of Apoptotic Genes in Tissues from Mice Exposed to Nicotine. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 18(1): 239-244.

Jiang, Y., Dai, A., Zhou, Y., Peng, G., Hu, G., Li, B., Sham, J. S. y Ran, P. (2014). Nicotine Elevated Intracellular Ca^{2+} in Rat Airway Smooth Muscle Cells via Activating and Up-Regulating $\alpha 7$ -Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 33(2): 389-401.

Joehanes, R., Just, A. C., Marioni, R. E., Pilling, L. C., Reynolds, L. M., Mandaviya, P. R., Guan, W., Xu, T., Elks, C. E., Aslibekyan, S., Moreno, M. H., Smith, A. J., Brody, A. J., Dhingra, R., Yousefi, P., Pankow, J. S., Kunze, S., Shah, S. H., McRae, A. F., Lohman, K., Sha, J., Absher, D. M., Ferrucci, L., Zhao, W., Demerath, E. W., Bressler,

J., Grove, M. L., Huan, T., Liu, C., Mendelson, M. M., Yao, C., Kiel, D. P., Peters, A., Wang, S. R., Visscher, P. M., Wray, N. R., Starr, J. N., Ding, J., Rodriguez, C. J., Wareham, N. J., Irvin, M. R., Zhi, D., Barrdahl, M., Vineis, P., Ambatipudi, S., Uitterlinden, A. G., Hofman, A., Schwartz, J., Colicino, E., Hou, L., Vokonas, P. S., Hernandez, D. G., Singleton, A. B., Bandinelli, S., Turner, S. T., Ware, E. B., Smith, A. K., Klengel, T., Binder, E. B., Psaty, B. M., Taylor, K. D., Gharib, S. A., Swenson, B. R., Liang, L., DeMeo, D. L., O'Connor, G. T., Herceg, Z., Ressler, K. J., Conneely, K. N., Sotoodehnia, N., Kardia, S. L. R., Melzer, D., Baccarelli, A. A., Van Meurs, J. B. J., Romieu, I., Arnett, D. K., Ong, K. K., Liu, Y., Waldenberger, M., Deary, I. J., Fornage, M., Levy, D. y London, S. J. (2016). Epigenetic Signatures of Cigarette Smoking. *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 9(5): 436-447.

Kaldas, M. I., Walle, U. K. y Walle, T. (2003). Resveratrol transport and metabolism by human intestinal Caco-2 cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 55(3): 307-312.

Kato, A. y Hashimoto, T. (2004). Molecular Biology of Pyridine Nucleotide and Nicotine Biosynthesis. *Frontiers in Bioscience*. 9: 1577-1586.

Kellermann, V., Loeschcke, V., Hoffmann, A. A., Kristensen, T. N., Fløjgaard, C., David, J. R., Svenning, J. C. y Overgaard, J. (2012a). Phylogenetic constraints in key functional traits behind species' climate niches: patterns of desiccation and cold resistance across 95 *Drosophila* species. *International Journal of Organic Evolution*. 66(11): 3377-3389.

Kellermann, V., Overgaard, J., Hoffmann, A. A., Fløjgaard, C., Svenning, J. C. y Loeschcke, V. (2012b). Upper thermal limits of *Drosophila* are linked to species distributions and strongly constrained phylogenetically. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 109(40): 16228-16233.

Khan, R., Khan, M., Sahreen, S. y Ali, N. (2012). Hepatoprotective activity of *Sonchus asper* against carbon tetrachloride-induced injuries in male rats: a randomized controlled trial. *Complementary and Alternative Medicine*. 12(90).

Kleinsasser, N. H., Sassen, A. W., Semmler, M. P., Harréus, U. A. Licht, A. K. y Richter, E. (2005). The Tobacco Alkaloid Nicotine Demonstrates Genotoxicity in Human Tonsillar Tissue and Lymphocytes. *Toxicological Sciences*. 86(2): 309-317.

Kim, C. S., Choi, J. S., Joo, S. Y., Bae, E. H., Ma, S. K., Lee, J. y Kim, S. W. (2016). Nicotine-Induced Apoptosis in Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells. *PLOS ONE*. 11(3).

King, R. E., Bomser, J. A. y Min, D. B. (2006). Bioactivity of Resveratrol. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 5(3): 65-70.

Koe, X. F., Tengku, M. T. S., Chong, A. S. C., Wahab, H. A. y Tan, M. L. (2014). Cytochrome P450 induction properties of food and herbal-derived compounds using a

novel multiplex RT-qPCR *in vitro* assay, a drug-food interaction prediction tool. *Food Science & Nutrition*. 2(5): 500-520.

Kong, E. C., Allouche, L., Chapot, P. A., Vranizan, K., Moore, M. S., Heberlein, U. y Wolf, F. W. (2010). Ethanol-Regulated Genes That Contribute to Ethanol Sensitivity and Rapid Tolerance in *Drosophila*. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 34(2): 302-316.

Kotova, N., Vare, D., Schultz, N., Meesters, G. D., Stepnik, M., Grawé, J., Helleday, T. y Jenssen, D. (2013). Genotoxicity of alcohol is linked to DNA replication-associated damage and homologous recombination repair. *Carcinogenesis*. 34(2): 325-330.

Königsberg, F.M. (2007). Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica*. 26(1): 18-25.

Kumar, V., Pandey, A., Jahan, S., Shukla, R. K., Kumar D., Srivastava, A., Singh, S., Rajpurohit, C. S, Yadav, S., Khanna, V. K. y Pant, A. B. (2016). Differential responses of Trans-Resveratrol on proliferation of neural progenitor cells and aged rat hippocampal neurogenesis. *Scientific Reports*. 6: 28142.

Lakshminarasimhan, M., Rauh, D., Schutkowski, M. y Steegborn, C. (2013). Sirt1 activation by resveratrol is substrate sequence-selective. *Impact Journals Aging*. 5(3): 151-154.

Lan, X., Lederman, R., Eng, J. M., Shoshtari, S. S. M., Saleem, M. A., Malhotra, A. y Singhal, P. C. (2016). Nicotine Induces Podocyte Apoptosis through Increasing Oxidative Stress. *PLOS ONE*. 11(12).

Lee, W. y Lee, D. G. (2017). Resveratrol induces membrane and DNA disruption via pro-oxidant activity against *Salmonella typhimurium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 489: 228-234.

Leonard, S. S., Xia, C., Jiang, B. H., Stinefel, B., Klandorf, H., Harris, G. K. y Shi, X. (2003). Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 309(4): 1017-1026.

Leão, M. B. C. y Pavão, A. C. (2001). An electron transfer mechanism for the dimethylnitrosamine carcinogenic action. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* 539(1-3): 297-30.

Leyton, V., Goles, N. I., Fuenzalida, U. N. y Campusano, J. M. (2014). Octopamine and Dopamine differentially modulate the nicotine-induced calcium response in *Drosophila* Mushroom Body Kenyon Cells. *Neuroscience Letters*. 560(1): 16-20.

- Li, X., Bai, S. y Cass, B. N. (2012). Accord insertion in the 5' flanking region of CYP6G1 confers nicotine resistance in *Drosophila melanogaster*. *Gene*. 502(1): 1-8.
- Lin, C., Yon, J. M., Jung, A. Y., Lee, J. G., Jung, K. Y., Kang, J. K., Lee, B. J., Yun, Y. W. y Nam, S. Y. (2012). Resveratrol prevents nicotine teratogenesis induced in mouse embryos cultured. *Reproductive Toxicology*. 34(3): 340-346.
- Lin, Y. H., Yuan, J., Pei, H., Liu, T., Ann, D. K., Lou, Z. (2015). KAP1 Deacetylation by SIRT1 Promotes Non-Homologous End-Joining Repair. *PLOS ONE*. 10(4).
- Liu, B., Ghosh, S., Yang, X., Zheng, H., Liu, X., Wang, Z., Jing, G., Zheng, B., Kennedy, B. K., Sun, Y., Kaeberlein, M., Tryggvason, K. y Zhou, Z. (2012). Resveratrol rescues SIRT1-dependent adult stem cell decline and alleviates progeroid features in laminopathy-based progeria. *Cell Metabolism*. 16(6): 738-750.
- Liu, N., Li, M., Gong Y., Liu, F. y Li, T. (2015). Cytochrome P450s-Their expression, regulation, and role in insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 120: 77-81.
- López, V. H. E. y García, C. J. (2003). La participación de los receptores de acetilcolina nicotínicos en trastornos del sistema nervioso central. *Salud Mental*. 26(3): 66-72.
- Low, C. I. C., Chen, Z. X. y Pervaiz, S. (2010). Bcl-2 Modulates Resveratrol-Induced ROS Production by Regulating Mitochondrial Respiration in Tumor Cells. *Antioxidants & Redox Signaling*. 13(6): 807-819.
- Lucas, A. C. (2009). Estudio de la complejidad del resveratrol por diferentes tipos de ciclodextrinas. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias, de la Actividad Física y del Deporte Universidad Católica San Antonio.
- Luengo, Á. S. H., Alcaide, A., Ramos, G. M., Cercas, E., Vallejo, S., Romero, A., Talero, E., Sánchez, F. C. F., Moltiva, V. y Peiró, C. (2017). Dual Effects of Resveratrol on Cell Death and Proliferation of Colon Cancer Cells. *Nutrición and Cáncer*. 69 (7): 1019-1027.
- Luga, C., Alvarez, I. J. R. y Russo, N. (2012). Antioxidant Activity of trans-Resveratrol toward Hydroxyl and Hydroperoxyl Radicals: A Quantum Chemical and Computational Kinetics Study. *The Journal of Organic Chemistry*. 77(8): 3869-3877.
- Lyons, M. M., Yu, C., Toma, R. B., Cho, S. Y., Reiboldt, W., Lee, J. van Breemen, R. B. (2003). Resveratrol in Raw and Baked Blueberries and Bilberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(20): 5867-5870.
- Magaña, A. M. J. (2017). Evaluación del efecto del resveratrol sobre la genotoxicidad de la nicotina en SMART en ala de *Drosophila melanogaster* en las cruza estándar y de bioactivación elevada. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala Universidad Nacional Autónoma de México.

- Mahal, H. S. y Mukherjee, T. (2006). Scavenging of reactive oxygen radicals by resveratrol: antioxidant effect. *Research on Chemical Intermediates*. 32(1): 59-71.
- Malherbe, Y., Kamping, A., Delden, W. y Zande, L. (2005). ADH enzyme activity and Adh gene expression in *Drosophila melanogaster* lines differentially selected for increased alcohol tolerance. *Journal of Evolutionary Biology*. 18(4): 811-819.
- Mansvelder, H. D., Keath, J. R. y McGehee, D. S. (2002). Synaptic Mechanisms Underlie Nicotine-Induced Excitability of Brain Reward Areas. *Neuron*. 33(6): 905-919.
- Marinucci, L., Balloni, S., Fettucciari, K., Bodo, M., Talesa, V. N. Antognelli, C. (2018). Nicotine induces apoptosis in human osteoblasts via a novel mechanism driven by H₂O₂ and entailing Glyoxalase 1-dependent MG-H1 accumulation leading to TG2-mediated NF-κB desensitization: Implication for smokers-related osteoporosis. *Free Radical Biology and Medicine*. 117: 6-17.
- Markou, A. (2008). Neurobiology of nicotine dependence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 363(1507): 3159-3168.
- Markow, T. A. y O'Grady, P. M. (2006). *Drosophila: A Guide to Species Identification and Use*. San Diego. Academic Press.
- Marriage, T. N., King, E. G., Long, A. D. y Macdonald, S. J. (2014). Fine-Mapping Nicotine Resistance Loci in *Drosophila* Using a Multiparent Advanced Generation Inter-Cross Population. *Genetics*. 198(1): 45-57.
- Martins, M. L. A., Coelho, B. P., Behr, G., Pettenuzzolabel, L. F., Souza, I. C. C., Moreira, J. C. F., Borojevic, R., Gottfried, C. y Rodrigues, G. F. C. (2014). Resveratrol Induces Pro-oxidant Effects and Time-Dependent Resistance to Cytotoxicity in Activated Hepatic Stellate Cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 68(2): 247-257.
- Martínez, S. G. (2005). Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Revista Cubana de Farmacia*. 39(3).
- Matta, S. G., Balfour, D. J., Benowitz, N. L., Boyd, R. T., Buccafusco, J. J., Caggiula, A. R. Craig, C. R., Collins, A. C., Damaj, M. I., Donny, E. C., Gardiner, P. S., Grady, S. R., Heberlein, U., Leonard, S. S., Levin, E. D., Lukas, R.J., Markou, A., Marks, M. J., McCallum, S.E., Parameswaran, N., Perkins, K.A., Picciotto, M. R., Quik, M., Rose, J. E., Rothenfluh, A., Schafer, W. R., Stolerman, I. P., Tyndale, R.F., Wehner, J.M. y Zirger, J. M. (2007). Guidelines on nicotine dose selection for *in vivo* research. *Psychopharmacology*. 190(3): 269-319.
- Meger, M., Meger, K. I., Schuler, M. A., Janket, D. y Scherer, G. (2002). Simultaneous determination of nicotine and eight nicotine metabolites in urine of smokers using liquid

chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 778(1-2): 251-261.

Mikstacka, R., Rimando, A. M. y Ignatowicz, E. (2010). Antioxidant Effect of trans-Resveratrol, Pterostilbene, Quercetin and Their Combinations in Human Erythrocytes *In Vitro*. *Plant Foods for Human Nutrition*. 65(1): 57-63.

Mikuła, P. J., Kuczmarska, A., Rubiś, B., Filas, V., Murias, M., Zieliński, P., Piwocka, K. y Książek, K. (2012). Resveratrol delays replicative senescence of human mesothelial cells via mobilization of antioxidative and DNA repair mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*. 52(11-12): 2234-2245.

Mikuła, P. J., Sosińska, P., Murias, M., Michalak, M., Wierzchowski, M., Piechota, M., Sikora, E. y Książek, K. (2014). Resveratrol Derivative, 3,3',4,4'-Tetrahydroxy- *trans* - Stilbene, Retards Senescence of Mesothelial Cells via Hormetic-Like Prooxidative Mechanism. *The Journals of Gerontology: Series A*. 70(10): 1169-1180.

Millonig, G., Wang, Y., Homann, N., Bernhardt, F., Qin, H., Mueller, S., Bartsch, H. y Seitz, H. K. (2010). Ethanol-mediated carcinogenesis in the human esophagus implicates CYP2E1 induction and the generation of carcinogenic DNA-lesions. *International Journal of Cancer*. 128(3):533-540.

Morozova, T. V., Anholt, R. R. y Mackay, T. F. (2006). Transcriptional response to alcohol exposure in *Drosophila melanogaster*. *Genome Biology*. 7:10.

Murillo, R. S. (1997). Efecto de la capacidad de inducción de la actividad metabólica del etanol y del ciclohexanol frente al daño producido por la N, N-Dimetilnitrosamina en *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México.

Nathiga Nambi, K. S., Abdul Majeed, S., Tajua, G., Sivasubbu, S., Sarath Babu, V. y Sahul Hameed, S. A. (2017). Effects of nicotine on zebrafish: A comparative response between a newly established gill cell line and whole gills. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology*. 95: 68-77.

OMS. Organización Mundial de la Salud. The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders: clinical descriptions and diagnostic guidelines. [En línea]. 1993. [Fecha de acceso 6 de Noviembre del 2017]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/37108>

OMS. Organización Mundial de la Salud. Who report on the global tobacco epidemic (Create smoke free). [En línea]. 2009. [Fecha de acceso 6 de Noviembre del 2017]. Disponible en: <https://www.who.int/tobacco/mpower/2009/en/>

OMS. Organización Mundial de la Salud. Who report on the global tobacco epidemic (Raising taxes on tobacco). [En línea]. 2015. [Fecha de acceso 6 de Noviembre del 2017]. Disponible en: https://www.who.int/tobacco/global_report/2015/report/en/

OMS. Organización Mundial de la Salud. Cáncer. [En línea]. 2018. [Fecha de acceso 14 de Mayo del 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

Ooka, M., Takazawa, H., Takeda, S. y Hirota, K. (2016). Cytotoxic and genotoxic profiles of benzo[a]pyrene and N-nitrosodimethylamine demonstrated using DNA repair deficient DT40 cells with metabolic activation. *Chemosphere*. 144: 1901-1907.

Orellana, B. M. y Guajardo, T. V. (2004). Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Revista Médica de Chile*.132: 85-94.

Osorio, J. H. (2010). Citocromo P450 2A6 (CYP2A6) humano y su relación con el consumo de tabaco. *Biosalud*. 9: 36-46.

O'Grady, P. M. (2009). Capítulo 80 *Drosophila melanogaster*. En Resh, V. H. y Cardé, R. T. (Ed.). *Encyclopedia of Insects*. (pp. 301–303). China. Editorial Academic Press. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123741448000898>

Pannu, N. y Bhatnagar, A. (2019). Resveratrol: from enhanced biosynthesis and bioavailability to multitargeting chronic diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 109: 2237-2251.

Parvathi, V. D., Amritha, S. A. y Solomon, F. D. P. (2009). Wonder animal model for genetic studies - *Drosophila melanogaster* - Its life cycle and breeding methods - A review. *Sri Ramachandra Journal of Medicine*.2(2): 33-37.

Pegg, A. E. y Jackson, A. (1976). Alkylation of messenger RNA by dimethylnitrosamine. *Chemico-Biological Interactions*. 12(3-4): 279-284.

Perez, C. N., Perez, C. H. y Fernandez, M. E. J. (2007). Nicotina y Adicción: un enfoque molecular del tabaquismo. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 6(1).

Picciotto, M. R. y Kenny, P. J. (2012). Molecular Mechanisms Underlying Behaviors Related to Nicotine Addiction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 3(1): a012112.

Picciotto, M. R. y Mineur, Y. S. (2014). Molecules and circuits involved in nicotine addiction: The many faces of smoking. *Neuropharmacology*. 76(part B): 545-553.

Pignitter, M., Schueller, K., Burkon, A., Knorr, V., Esefelder, L., Doberer, D., Wolztc, M. y Somoza, V. (2016). Concentration-dependent effects of resveratrol and metabolites

on the redox status of human erythrocytes in single-dose studies. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 27: 164-170.

Pitoniak, A. y Bohmann, D. (2015). Mechanisms and functions of Nrf2 signaling in *Drosophila*. *Free Radical Biology and Medicine*. 88(Part B): 302-313.

Piver, B., Fer, M., Vitrac, X., Merillon, J. M., Dreano Y., Berthou, F. y Lucas, D. 2004. Involvement of cytochrome P450 1A2 in the biotransformation of trans-resveratrol in human liver microsomes. *Biochemical Pharmacology*. 68: 773-783.

Pohl, J. B., Baldwin, B. A., Dinh, B. L., Rahman, P., Smerek, D., Prado, III F. J., Sherazee, N. y Atkinson, N. S. (2012). Ethanol Preference in *Drosophila melanogaster* is Driven by Its Caloric Value. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 36(11): 1903-1912.

Poljsak, B., Šuput, D. y Milisav, I. (2013). Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013: 1-11.

Potter, G.A., Patterson, L. H., Wanogho, E., Perry, P.J., Butler, P. C., Ljaz, T., Ruparelia, K. C., Lamb, J. H., Farmer, P. B., Stanley, L. A. y Burke, M. D. (2002). The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1. *British Journal of Cancer*. 86:774–778.

Pozuelos, E. J., Martinena, P. E., Monago, L. I., Viejo, I. D. y Pérez, T. T. (2000). Recuperado de: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-farmacologia-nicotina-11678>

Qiao, D., Seidler, F. J. y Slotkin, T. A. (2005). Oxidative mechanisms contributing to the developmental neurotoxicity of nicotine and chlorpyrifos. *Toxicology and applied pharmacology*. 206(1): 17-26.

Ramos, G. A, N. (2014). Propiedades farmacológicas de la nicotina. Tesis de licenciatura. D.F, México. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Rand, M. (2010). *Drosophotoxicology*: The growing potential for *Drosophila* in neurotoxicology. *Neurotoxicology and Teratology*. 32(1): 74-83.

Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M. y Bier, E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*. 11(6): 1114-1125.

Rey, B. M. (2015). Genética molecular del alcoholismo. *Revista de la Facultad de Medicina*. 63(3):483-494.

- Rimando, A. M., Kalt, W., Magee, J. B., Dewey, J. y Ballington, J. R. (2004). Resveratrol, Pterostilbene, and Piceatannol in Vaccinium Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(15): 4713-4719.
- Rossi, M., Caruso, F., Antonioletti, R., Viglianti, A., Traversi, G., Leone, S., Basso, E. y Cozzi, R. (2013). Scavenging of hydroxyl radical by resveratrol and related natural stilbenes after hydrogen peroxide attack on DNA. *Chemico-Biological Interactions*. 206(2): 175-185.
- Rubiolo, J. A., Mithieux, G. y Vega, F. V. (2008). Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: Activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. *European Journal of Pharmacology*. 591(1-3): 66-72.
- Ruíz, A. M., Gómez, R. I., Rubio, C., Revert, C. y Hardisson, A. (2004). Efectos tóxicos del tabaco. *Revista de Toxicología*. 21: 64-71.
- San-Miguel, A. y Martin, G. F. J. (2009). Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libres) y los antioxidantes en clínica. *Gaceta Médica de Bilbao*. 106(3): 106-113.
- Sánchez, N. C. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 24(4): 553-562.
- Sánchez, L. J. M. (2015). Evaluación de la posible actividad moduladora del resveratrol hacia el MMS, con SMART en ala de *Drosophila melanogaster* cruza de bioactivación elevada. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala Universidad Nacional Autónoma de México.
- Santos, C. L. F. (2016). Evaluación de los posibles efectos tóxicos y genotóxicos de los tripanocidas GHPM y GHPMF con las pruebas CL₅₀ y SMART en ala de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sathish, P., Paramasivan, V., Palani, V., Sivanesan, K. (2011). N-acetylcysteine attenuates dimethylnitrosamine induced oxidative stress in rats. *European Journal of Pharmacology*. 654: 181-186.
- Scheer, M. A., Schneider, K. J., Finnigan, R. L., Maloney, E. P., Wells, M. A. y Clemens, D. L. (2016). The Involvement of Acetaldehyde in Ethanol-Induced Cell Cycle Impairment. *Biomolecules*. 6(2):17.
- Schmitt, E., Lehmann, L., Metzler, M. y Stopper, H. (2002). Hormonal and genotoxic activity of resveratrol. *Toxicology Letters*. 136(2): 133-142.

Sebastià, N., Montoro, A., León, Z. y Soriano, J. M. (2017). Searching trans-resveratrol in fruits and vegetables: a preliminary screening. *Journal of Food Science and Technology*. 54(3): 842-845.

Sgambato, A., Ardito, R., Faraglia, B., Boninsegna, A., Wolf, F. I. y Cittadini, A. (2001). Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 496(1-2): 171-180.

Shoji, T. y Hashimoto, T. (2011). Capítulo 7 Nicotine Biosynthesis. En Hiroshi, A., Alan, C. y Atsushi K. (Ed.). *Plant Metabolism and Biotechnology* (pp. 191-202). Gran Bretaña: Editorial John Wiley & Sons, Ltd. Recuperado de: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9781119991311#page=201>

Shrikanta, A., Kumar, A. y Govindaswamy, V. (2013). Resveratrol content and antioxidant properties of underutilized fruits. *Journal of Food Science and Technology*. 52(1): 383-390.

Siegmund, B., Leitner, E. y Pfannhauser, W. (1999). Determination of the Nicotine Content of Various Edible Nightshades (Solanaceae) and Their Products and Estimation of the Associated Dietary Nicotine Intake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(8): 3113-3120.

Spanó, M. A. y Graf, U. (1998). Segundo taller sobre SMART: Un método para detectar las actividades mutagénicas y recombinogénicas en células somáticas de *Drosophila*. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*. 14(12): 111-114.

Stocker, H. y Gallant, P. (2008). Getting started: An overview on raising and handling *Drosophila*. *Methods in Molecular Biology*. 420: 27-44.

Stroud, M. L. (2017). Effects of nicotine on the *cyp6a8* gene promoter of *Drosophila melanogaster*. Proyecto de tesis de honor. University of Tennessee. Knoxville.

Sun, W., Chen, L., Zheng, W., Wei, X., Wu, W., Duysen, E. G. y Jiang, W. (2017). Study of acetylcholinesterase activity and apoptosis in SH-SY5Y cells and mice exposed to ethanol. *Toxicology*. 384: 33-39.

Tanner, J. A., Chenoweth, M. J. y Tyndale, R. F. (2015). Capítulo 3 Pharmacogenetics of Nicotine and Associated Smoking Behaviors. En Balfour, D. J. K. y Munafò, M. R. (Ed.), *The Neurobiology and Genetics of Nicotine and Tobacco. Current Topics in Behavioral Neurosciences* (pp. 38-41). Suiza: Editorial Springer, Cham. Recuperado de: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-319-13665-3.pdf>

Tinkerhess, M. J., Healy, L., Morgan, M., Sujkowski, A., Matthys, E., Zheng, L. y Wessells, R.J. (2012). The *Drosophila* PGC-1 α Homolog spargel Modulates the Physiological Effects of Endurance Exercise. *PLOS ONE*. 7(2).

- Toklu, H. Z., Sehirli, O., Sahin, H., Cetinel, S., Yegen, B. C. y Sener, G. (2010). Resveratrol supplementation protects against chronic nicotine-induced oxidative damage and organ dysfunction in the rat urogenital system. *Marmara Pharmaceutical Journal*. 14(1): 29-40.
- Tricker, A. R. (2003). Nicotine metabolism, human drug metabolism polymorphisms, and smoking behaviour. *Toxicology*. 183(1-3): 151-173.
- Troutwine, B. R., Ghezzi, A., Pietrzykowski, A. Z. y Atkinson, N. S. (2016). Alcohol resistance in *Drosophila* is modulated by the Toll innate immune pathway. *Genes, Brain and Behavior*. 15(4): 382-394.
- Turner, J. R., Pave, I., Rachel, M. O., Sherrard, y Kellar, K. J. (2011). Cerebellar Nicotinic Cholinergic Receptors are Intrinsic to the Cerebellum: Implications for Diverse Functional Roles. *The Cerebellum*. 10(4): 748-757.
- Türkez, H. y Şişman, T. (2012). The genoprotective activity of resveratrol on aflatoxin B1-induced DNA damage in human lymphocytes *in vitro*. *Toxicology and Industrial Health*. 28(5): 474-480.
- Umbenhauer, D. R. y Pegg, A. E. (1981). Metabolism of dimethylnitrosamine and subsequent removal of O⁶-methylguanine from DNA by isolated rat hepatocytes. *Chemical-Biological Interactions*. 33: 229-238.
- Ungvari, Z., Bagi, Z., Feher, A., Recchia, F. A., Sonntag, W. E., Pearson, K., Cabo, R. y Csiszar, A. (2010). Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 299: H18-H24.
- Vadigepalli, R. y Hoek, J. B. (2018). Introduction to the Virtual Issue Alcohol and Epigenetic Regulation: Do the Products of Alcohol Metabolism Drive Epigenetic Control of Gene Expression in Alcohol-Related Disorders. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 42(5): 845-848.
- Velázquez-Ulloa, N. A. (2017). A *Drosophila* model for developmental nicotine exposure. *PLOS ONE*. 12(5).
- Vendemiale, G., Grattagliano, I., Caruso, M. L., Serviddio, G., Valentini, A. M., Pirrelli, M. y Altomare, E. (2001). Increased oxidative stress in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in the rat: Effect of N-Acetylcysteine and Interferon- α . *Toxicology and Applied Pharmacology*. 175: 130-139.
- Wang, J., Zhang, Y., Tang, L., Zhang, N. y Fan, D. (2011). Protective effects of resveratrol through the upregulation of SIRT1 expression in the mutant hSOD1-G93A-

bearing motor neuron-like cell culture model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett.* 503(3):250-255.

Wang, H., Wang, X., Li, Y., Yu, H., Wang, C., Feng, C., Xu, G., Chen, J., You, J. Wang, P., Wu, X., Zhao, R. y Zhang, G. (2018). Chronic ethanol exposure induces SK-N-SH cell apoptosis by increasing N-methyl-D-aspartic acid receptor expression and intracellular calcium. *Experimental and Therapeutic Medicine.* 15(4): 3791-3800.

Walle, T. Hsieh, F., DeLegge, M. H., Oatis, J. E. Jr. y Walle, U. K. (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metabolism and Disposition.* 32(12): 1377-1382.

Wolpert, L., Tickle, C., Martinez, A. A., Lawrance, P., Lumsden, A., Robertson, E., Meyerowitz, E. y Smith, J. (2015). Principles of Development (5^a ed) United Kingdom: Oxford: Oxford University Press.

Wood, J. G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K., Helfand, S. L., Tatar, M. y Sinclair, D. (2004). Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature.* 430(7000): 686-689.

Yamamoto, H., Schoonjans, K. y Auwerx, J. (2007). Sirtuin functions in health and disease. *Molecular Endocrinology.* 21(8): 1745-1755.

Yan, Y., Yang, J-Y., Mou, Y-H., Wang, L-H., Zhang, H. y Wu, C. F. (2010). Possible Metabolic Pathways of Ethanol Responsible for Oxidative DNA Damage in Human Peripheral Lymphocytes. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* 35(1): 1-9.

Yan, Y., Yang, J-Y., Mou, Y-H., Wang, L-H., Zhou, Y-N. Wu, C-F. (2012). Differences in the activities of resveratrol and ascorbic acid in protection of ethanol-induced oxidative DNA damage in human peripheral lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology.* 50(2): 168-174.

Yang, C. S., Yoo, J. S. H., Ishizaki, H. y Hong, J. (1990). Cytochrome P450IIE1: Roles in Nitrosamine Metabolism and Mechanisms of Regulation. *Drug Metabolism Reviews.* 22(2-3): 147-159.

Yang, J., Martinson, T. E. y Liu, R. H. (2009). Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chemistry.* 116(1): 332-339.

Yuan, H. y Marmorstein, R. (2012). Structural Basis for Sirtuin Activity and Inhibition. *Journal of Biological Chemistry.* 287(51): 42428-42435.

Zhong, C., Talmage, D. A. y Role, L. W. (2013). Nicotine Elicits Prolonged Calcium Signaling along Ventral Hippocampal Axons. *PLOS ONE.* 8(12).

Zhou, R., Fuku, M., Choi, H. J. y Zhu, B. T. (2009). Induction of a reversible, non-cytotoxic S-phase delay by resveratrol: implications for a mechanism of lifespan prolongation and cancer protection. *British Journal of Pharmacology*. 158(2): 462-474.

Zinser, J. W. (2014). Tabaquismo. *Ciencia: Revista de la Academia Mexicana de Ciencias*. 65: 40-49.

Anexo I. *D. melanogaster*

El género *Drosophila* cuenta con aproximadamente 1,500 especies, la diversidad que presenta la especie es por su capacidad competitiva en la mayoría de los hábitats y además la familia *Drosophilidae* es una de las familias más desarrolladas evolutivamente de todos los insectos (Markow y O'Grady, 2006; Parvathi *et al.*, 2009). Las especies de esta familia presentan resistencia al estrés abiótico como lo son las altas temperaturas (Kellermann *et al.*, 2012b) y a las bajas temperaturas (Kellermann *et al.*, 2012a; Andersen *et al.*, 2015). La mosca de la fruta, *D. melanogaster* es una especie generalista y cosmopolita que se originó en el oeste de África tropical y se ha extendido por todo el mundo por medio de las asociaciones comensales con humanos (O'Grady, 2009).

El genetista estadounidense Thomas Hunt Morgan fue el primero en emplear a *D. melanogaster* como modelo biológico este pequeño insecto es un importante organismo modelo ampliamente utilizado en el campo de investigación de la genética, biológica y medicina por el hecho de sus importantes contribuciones a la comunidad científica en el último siglo (Allocca *et al.*, 2018). La importancia de *D. melanogaster* como modelo biológico radica en aspectos fundamentales bien conservados de su biología celular, lo que permite comparaciones con organismos superiores donde destaca el ser humano. También este modelo biológico conserva y comparte muchos de los genes y proteínas funcionales de los seres humanos aproximadamente el 75% de los genes que causan enfermedades en los humanos se encuentran en *D. melanogaster*, reflejándose el alto grado de conservación que existe (Reiter *et al.*, 2001). Asimismo *D. melanogaster* es un modelo eucarionte ampliamente utilizado en pruebas de toxicidad (Rand, 2010) y genotoxicidad *in vivo* (Graf *et al.*, 1984; Spanó y Graf, 1998) por presentar varias ventajas, como su pequeño tamaño (2–3 mm), presenta un corto tiempo de generación, por su fácil cultivo y mantenimiento en el laboratorio, accesible manipulación genética y su similitud biológica con los sistemas de los mamíferos (Castañeda *et al.*, 2013; Allocca *et al.*, 2018).

Cabe resaltar que *D. melanogaster* cuenta con 8 cromosomas (4 pares), el primer par consta de los cromosomas sexuales (X “acrocéntrico” o Y “submetacéntrico”) después están los pares cromosómicos 2, 3 (metacéntricos) y el 4 este último es el más pequeño y menos notado (Stocker y Gallant, 2008; Castañeda *et al.*, 2013). Incluso en el año 2000 se publicó la completa secuenciación del genoma de *D. melanogaster* indicando que está conformado por 14,000 genes, lo cual ayuda al entendimiento de las complejas vías de transducción de señales que regulan los procesos celulares y sobre la expresión génica (O’Grady, 2009).

Otra ventaja de emplear este modelo en la práctica experimental es en parte por su corto ciclo de vida (Figura 29), *D. melanogaster* es un insecto holometábolo por lo tanto sufre de una metamorfosis completa, cuyo desarrollo consta de 4 fases (huevo o embrión, larva, pupa y finalmente imago o adulto). El ciclo de vida de este insecto dura aproximadamente 10 días a una temperatura de 25°C el ciclo comienza gracias a la ovoposición de la hembra en donde una hembra fértil llega a poner más de 500 huevos después comienza el proceso de embriogénesis que dura alrededor de 24 horas (Castañeda *et al.*, 2013; Wolper *et al.*, 2015). Después comienza la fase larvaria que consta de tres estadios larvarios que duran en total aproximadamente 4 días, al completarse el desarrollo embrionario, del huevo eclosiona la larva de primer estadio la cual tiene una ingesta de alimentos alta (0.5 a 2 mg) que ayuda a su crecimiento y almacenamiento de grasas y azúcares, una vez transcurridas 24 horas se presenta la larva de segundo estadio, al transcurrir otras 24 horas se llega a la larva de tercer estadio, al estar ya en este estadio debe pasar 48 horas para que se suceda el proceso de pupación, mientras estas “larvas errantes” empiezan a deambular para buscar un lugar donde pupar (Castañeda *et al.*, 2013; Wolper *et al.*, 2015; Allocca *et al.*, 2018). Durante el crecimiento larval se elimina el exoesqueleto para poder pasar al siguiente estadio por medio de una transición de muda controlada por las hormonas ecdisona y protoracicotrópica. Una vez que la larva de tercer estadio se encapsula comienza la fase de pupa la cual dura 4 días, en los cuales no hay ingesta de alimentos lo cual se ve perjudicada la sobrevivencia del organismo para ello activa el proceso de autofagia

de desarrollo ya en esta fase se lisan las estructuras embrionarias y larvales y se da paso a la formación de las nuevas estructuras a partir de los discos imaginales (pequeños paquetes de células epiteliales) (Figura 30) (Wolper *et al.*, 2015; Allocca *et al.*, 2018). Finalmente el adulto o imago eclosiona de la pupa en donde deben transcurrir de 6 a 8 horas para los machos y de 10 a 12 horas para las hembras para que alcancen la madurez sexual (Castañeda *et al.*, 2013), teniendo una vida útil de aproximadamente 30 días todo dependiendo de la temperatura (Wolper *et al.*, 2015).

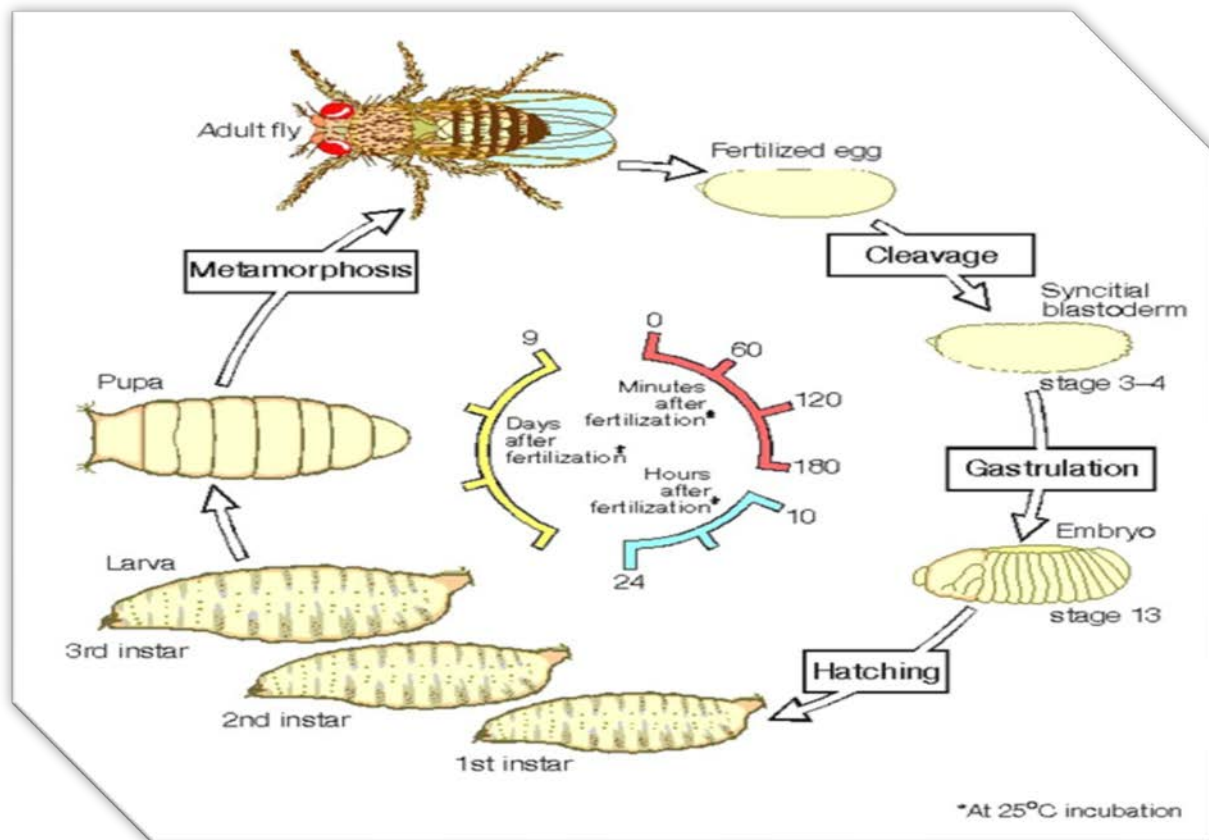


Fig. 29 Ciclo de vida de *D. melanogaster* (Tomado de Wolper *et al.*, 2015).

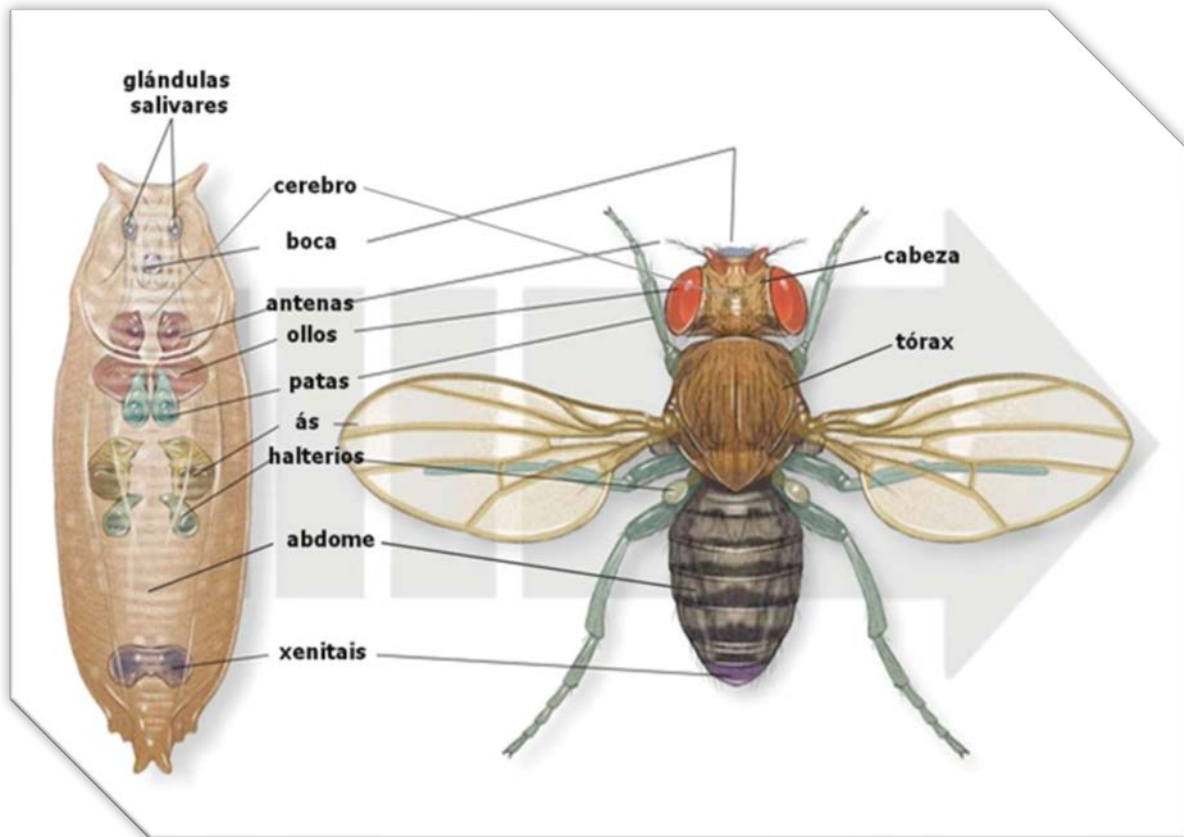


Fig. 30 Los discos imaginales en el proceso de metamorfosis dan lugar a las estructuras en los adultos de *D. melanogaster*. Tomado de:

https://www.google.com/search?q=ciclo+de+vida+de+drosophila+melanogaster&rlz=1C1AVFC_enMX855MX855&source=Inms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjPk4makLPjAhVSC6wKHV3FBrUQ_AUIECgB&biw=1517&bih=730#imgrc=9XHkzQLstBKmQM:

A simple vista o empleando un microscopio estereoscópico se puede observar el marcado dimorfismo sexual de *D. melanogaster* el cual nos permite distinguir con facilidad a la hembra del macho (Figura 31). La primera característica son los peines sexuales que presentan los machos y están conformados por 10 o más cerdas gruesas localizadas en el primer par de tarsos, están con la finalidad de sujetar a la hembra en la cópula, la segunda característica es que la hembra presenta un mayor tamaño que el macho y la última característica es que al final del abdomen del macho se ve una pigmentación abdominal oscurecida y en la hembra no se denota, esto se debe a que el macho presenta la fusión de los últimos 3 segmentos abdominales resaltando que tanto la hembra y el macho tienen 8 segmentos abdominales aunque esta característica

no se debe tomar mucho en cuenta ya que en algunos imagos que no están totalmente desarrollados no presentan esta pigmentación tan clara (Castañeda *et al.*, 2013).

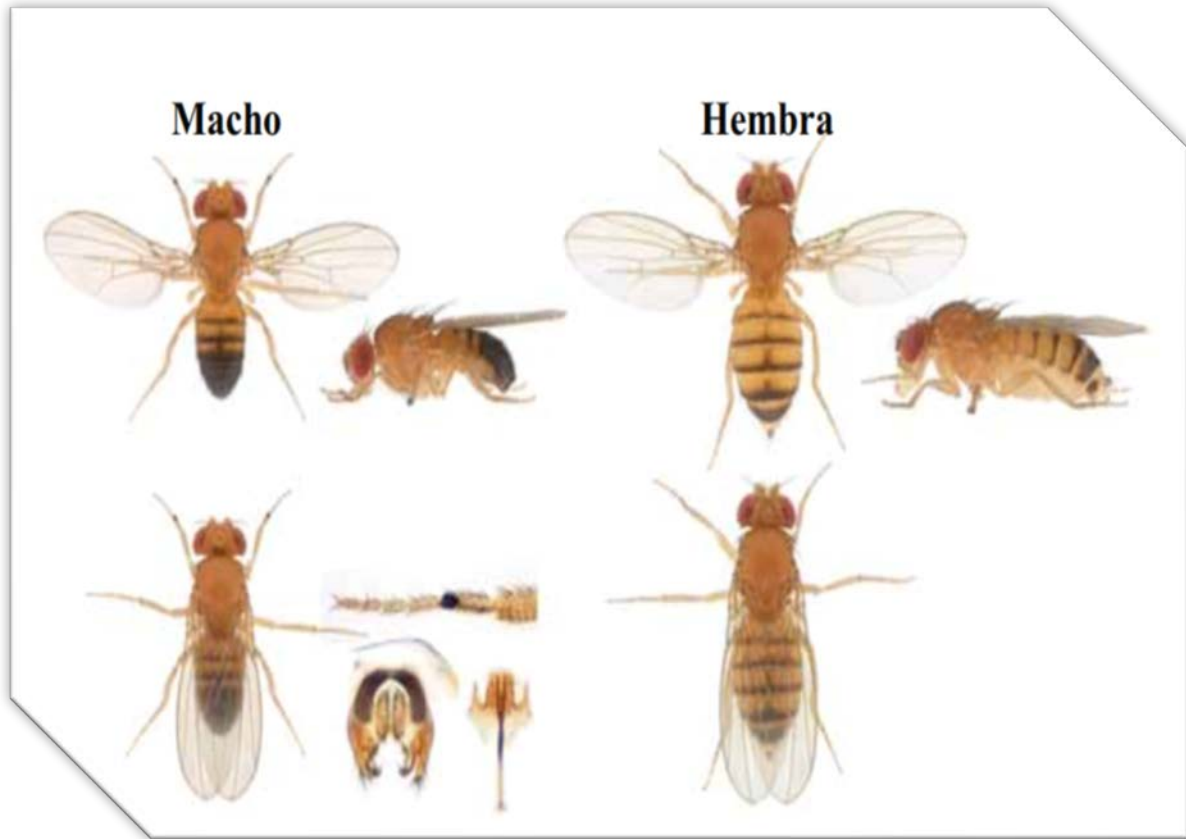


Fig. 31 Dimorfismo sexual presente en *D. melanogaster*. Tomado de:

https://www.google.com/search?q=ciclo+de+vida+de+drosophila+melanogaster&rlz=1C1AVFC_enMX855MX855&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjPk4makLPjAhVSC6wKHV3FBrUQ_AUIECgB&biw=1517&bih=730#imgrc=mMns5wshBKF6rM:

Anexo II. Prueba SMART en ala de *D. melanogaster*

Las pruebas de genotoxicidad se pueden realizar *in vitro* o *in vivo* ya que están diseñadas para detectar compuestos que provocan alteraciones genéticas (daño al DNA) de forma directa o indirecta en las células que llegan a estar expuestas a agentes químicos, físicos y biológicos (Dusinska *et al.*, 2012). Existen varias pruebas para identificar el daño genotóxico de varios compuestos o sustancias lo que nos permite

reconocer el riesgo al que se está expuesto una de ellas es la Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART) (Graf *et al.*, 1984; Spanó y Graf, 1998).

La prueba SMART tiene como características el poder detectar la posible actividad genotóxica, mutagénica y pre-cancerígena de compuestos a través de su relación con la recombinación somática de las células de las larvas de *D. melanogaster* (Graf *et al.*, 1984) sumado a la detección de promutágenos que necesitan biotransformación (Graf y van Schaik, 1992; Frei *et al.*, 1998). La siguiente característica es que la prueba SMART te permite mantener por mucho tiempo preparaciones permanentes de las alas de los individuos tratados, aunado a que se puede revisar aproximadamente 25,000 células por ala de moscas adultas expuestas a los compuestos a trabajar (Graf *et al.*, 1984).

La prueba SMART se fundamenta en la pérdida de heterocigosis (LOH) de marcadores genéticos recesivos (Figura 32) que se expresan como clones observables de cerdas múltiples o mal formadas en comparación con el fenotipo silvestre, dichos clones se derivan de las células mutantes en los discos imaginales que darán origen a las alas de los organismos adultos, estos clones son ocasionados por la actividad genotóxica de compuestos químicos, físicos, biológicos e incluso la interacción de compuestos, los cuales llegan a inducir eventos genéticos en donde la prueba SMART llega a detectar mutaciones génicas, puntuales, deleciones, aneuploidías y recombinaciones somáticas (Guzmán y Graf, 1995).

En la prueba SMART en ala se emplean dos diferentes cruzas, la craza CE (hembras vírgenes *flr³/TM3*, *Bd^{ser}* con machos *mwh/mwh*) y la craza BE (hembras vírgenes ORR (1); ORR (2); *flr³/TM3*, *Bd^{ser}* con machos *mwh/mwh*), esta última con una alta expresión de las enzimas Cyp450s lo que permite el análisis de compuestos promutágenos (Graf y van Schaik, 1992).

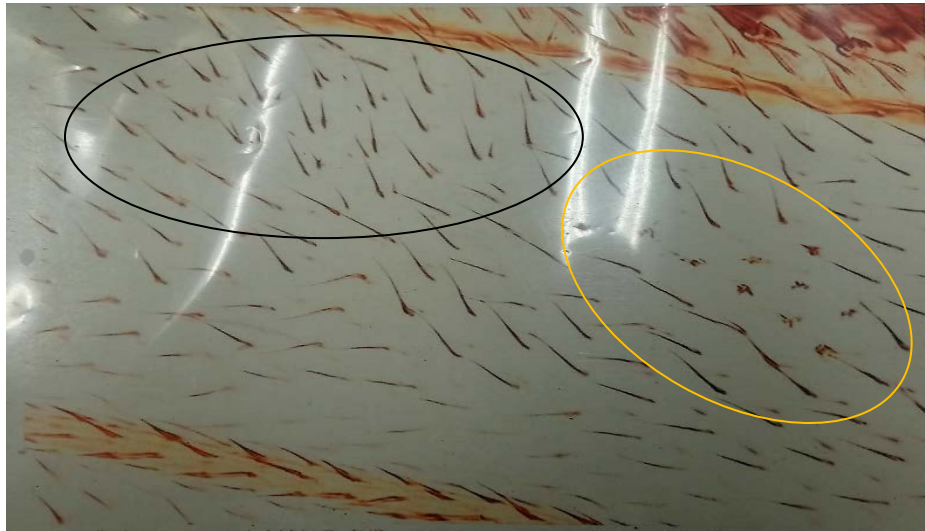


Fig. 32 Marcadores genéticos recesivos (En negro ■ el marcador *mwh* y en amarillo ■ el marcador *flr³*) que se expresan en las alas de *D. melanogaster*

Los clones que se presentan en esta prueba se clasifican por el número de clones mutantes pequeños (1-2 células), grandes (más de 3 células) y gemelos (*mwh/flr³*), más el tipo de clon de cada individuo *mwh* (tres tricomas o más), *flr³* (tricomas pequeños, como chamuscados, en forma de roseta) y gemelos (clones con fenotipos *flr³* y *mwh* adjuntos). En la cual se utilizan cepas mutantes con marcadores recesivos (multiple wing hairs, flare y Oregon R(R)-flare³) (Graf *et al.*, 1984).

Las cepas son:

- ❖ multiple wing hairs *mhw/mhw*

Contiene el marcador genético recesivo *mwh* el cual es una mutación autosómica homocigota recesiva que se encuentra en el brazo izquierdo del cromosoma 3 a 0.3 unidades de mapa (Graf *et al.*, 1984) y localizado en el mapa citológico (61F4) (Flybase, 2019a). Por tanto, en homocigosis se expresa fenotípicamente tres o más tricomas por célula de modo que no es normal en la expresión fenotípica de la cepa silvestre o normal.

- ❖ flare *flr³/TM3, Bd^{ser}*

Contiene el marcador genético recesivo *flr³* el cual es una mutación autosómica recesiva que se encuentra en el brazo izquierdo del cromosoma 3 a 38.8 unidades de mapa (Graf *et al*, 1984) y localizado en el mapa citológico (70A8-70B1) (Flybase, 2019b). Su expresión es fenotípicamente como tricomas pequeños, como chamuscados, en forma de roseta, dicha mutación es letal en homocigosis por consiguiente la cepa porta el balanceador *TM3* y para el reconocimiento del marcador *flr³* porta el marcador dominante *Bds^{ser}* (Graf *et al*, 1984).

❖ Oregon R(R)-flare³ *ORR (1); ORR (2); flr³/TM3, Bd^{ser}*

Demuestra las mismas características antes mencionadas para la cepa flare, sumado a que esta cepa contiene mutaciones en los cromosomas 1 y 2 de la cepa Oregon R(R) la cual es resistente al DDT, lo que le confiere una elevada expresión de *Cyp450s* (Graf y van Schaik, 1992). En el cromosoma 2 porta el gen *Rl* en la posición 65.0 con la función de regular una serie de actividades asociadas con el metabolismo xenobiótico (Frölich y Würigler, 1989). También en el cromosoma 2 se encuentra la mutación dominante *Rst (2) DDT/Cyp6g1* localizada en el mapa citológico (48E7) de manera que provoca la expresión constitutiva de una proteína inductora de los genes *Cyp6a2*, *Cyp6a8* y *Cyp6a9* ubicados en el cromosoma 2 (Graf *et al.*, 1998) el *Cyp6a2* localizado en el mapa citológico (42D1) (Flybase, 2019d). y *Cyp6a8* y *Cyp6a9* ambos localizados en el mapa citológico (51D1) (Flybase, 2019e; Flybase, 2019c) y en particular el nivel de *CYP6A2* se incrementa en esta cepa (Heres *et al.*, 2004).

Marcadores genéticos recesivos presentes en las cepas:

❖ *mwh*

❖ *flr³*

❖ In (3LR) *TM3* Inversión (3 Left, Right) Third Multiple 3

El marcador *TM3* es un balanceador que permite mantener al marcador letal en homocigosis *flr³* en heterocigosis. Presenta tres inversiones (dos pericéntricas y una

paracéntrica) dicho balanceador disminuye la oportunidad de la recombinación entre cromosomas, lo que hace mantener los genes a trabajar (Graf *et al*, 1984).

❖ Bd^{ser} Beaded Serratia

Marcador dominante que se encuentra en el cromosoma 3 a 92.5 unidades de mapa que permite diferenciar las cepas flare y Oregon R(R)-flare³ y que se expresa fenotípicamente como alas con mordiscas en el borde (Graf *et al*, 1998).

Referente al número de clones, al no perderse la LOH de los marcadores genéticos recesivos se expresa fenotípicamente un tricoma normal por el contrario si se llega a perder la LOH de los marcadores genéticos recesivos *mhw* y *flr*³ por medio del daño genotóxico del compuesto se expresan diferente número de clones debido a estos diferentes eventos genéticos (Figura 33 y 34):

- ❖ No disyunción lo que provoca un clon *mwh* pequeño.
- ❖ Mutaciones puntuales, deleción, recombinación distal del centrómero cualquiera de estos eventos provocaría un clon *mwh grande*.
- ❖ Recombinación cercana al centrómero lo que provoca un clon gemelo

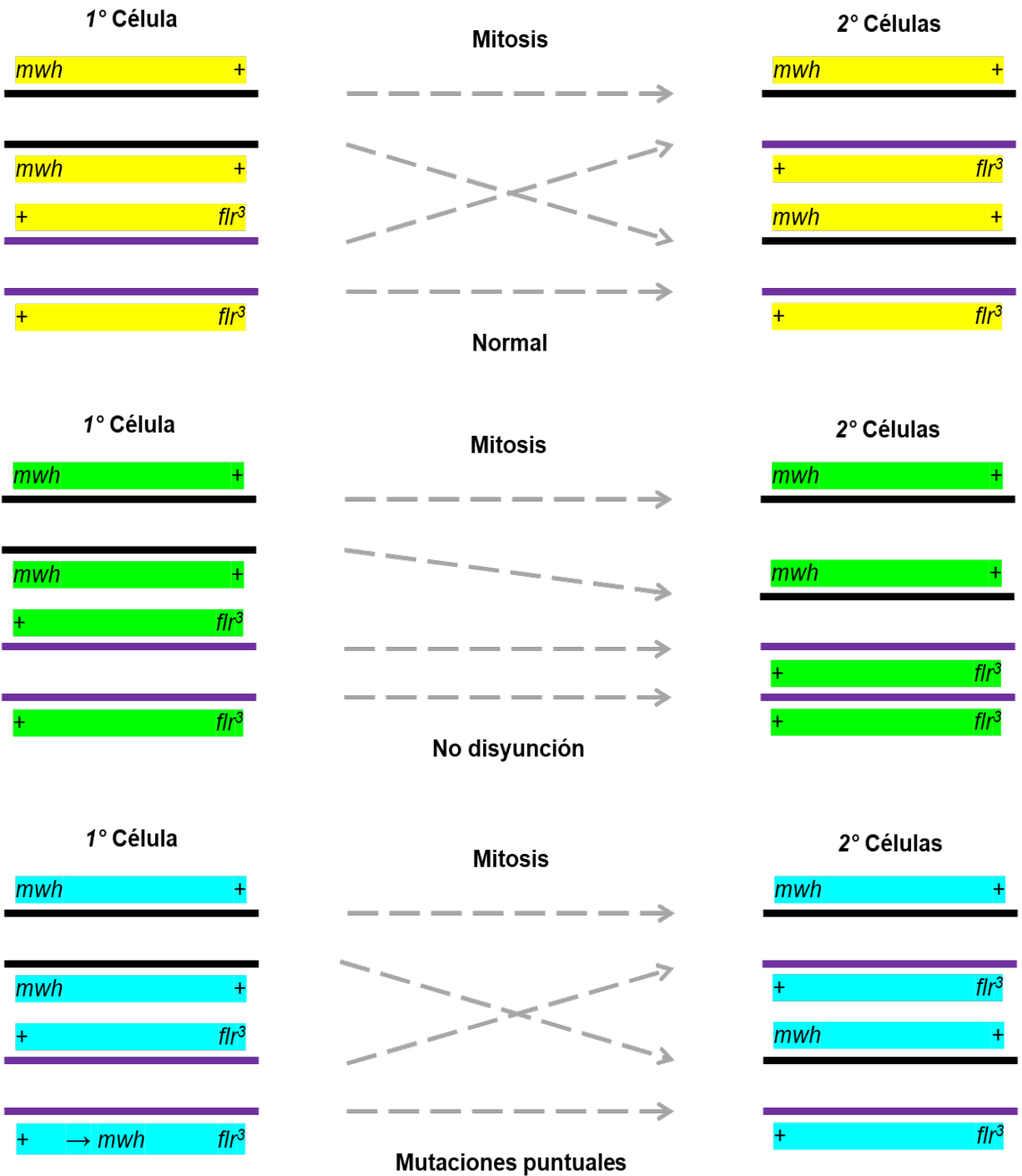


Fig. 33 Eventos genéticos detectados por la prueba SMART a través del daño genético

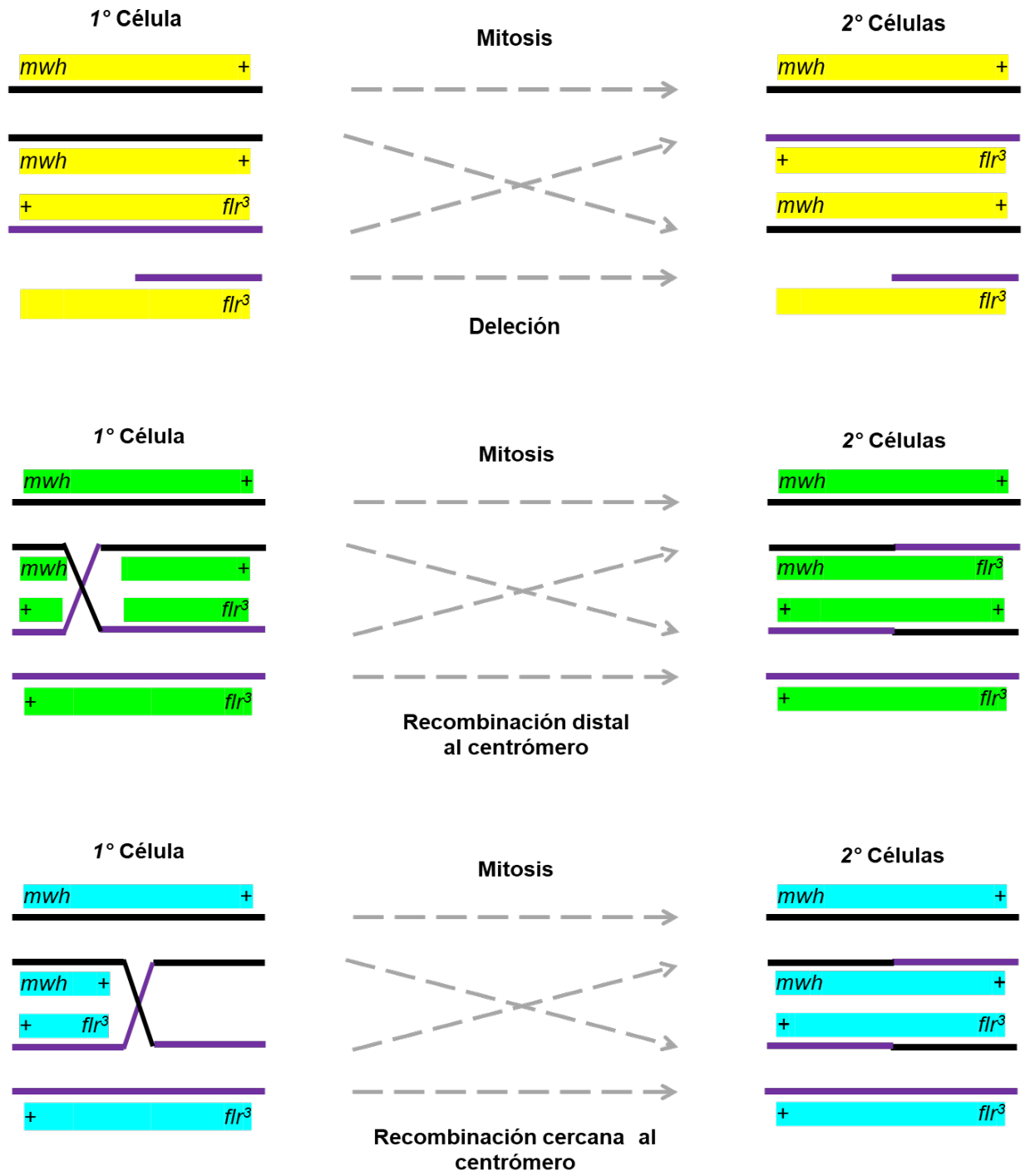


Fig. 34 Eventos genéticos detectados por la prueba SMART a través del daño genético