



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

“CAMPUS IZTACALA”

EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD
DEL TAMOXIFEN USANDO LA PRUEBA DE
SMART (CRUZA HB) EN *Drosophila*
melanogaster

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:
JOSÉ ANTONIO SÁNCHEZ GARCÍA



IZTACALA

DIRECTOR DE TESIS: BIÓL. MA. EUGENIA HERES PULIDO

MÉXICO

2001



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.

Dedico ésta tesis:

A mi esposa **Vianey Contreras Rivera** .
Por su apoyo, por sus sabios consejos y por estar siempre a mi lado.

A la Bióloga **Ma. Eugenia Heres Pulido**.
Por su ayuda incondicional y orientación para la realización de la presente investigación.

A las Biólogas **Irma Elena Dueñas y Laura Castañeda**.
Por sus asesorías en la realización de está investigación.

A mis **Padres**
Por su sacrificio y por todo lo que me han dado.

A mi **hijo**.
Esperando que le sirva de aliciente para su vida futura.

RESUMEN

La presente investigación pretende evaluar el posible efecto genotóxico del tamoxifen (TAM) usando la prueba SMART (cruza HB) en la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*), así como también someter a esta prueba a un agente con acción genotóxica conocida, como es el caso del 4-nitroquinole-1-óxido (4 NQO). La cruza de bioactivación elevada (BE o en inglés HB) de la prueba de mutación y recombinación somática (cuyas siglas en inglés son SMART) en el ala de la *D. Melanogaster*, posee una alta capacidad metabólica para activar promutágenos. Los individuos producto de esta cruza contienen en los cromosomas 1 y 2 la característica de resistencia al DDT de la línea Oregon R(R), las cuales sobreexpresan constitutivamente algunos genes del citocromo P450 [CYP450], por lo que permiten evaluar *in vivo* el posible riesgo genotóxico de diversos agentes químicos, por ejemplo de los antiestrógenos, que pueden ser activados por las enzimas del CYP450, a través de la exposición de larvas de 72 hs. (\pm 4 hs.) de edad por 48 horas a diferentes concentraciones de los agentes (tratamiento crónico). Los resultados obtenidos indican que el tamoxifen no es activado por el grupo de enzimas del CYP450 presentes en este organismo; por su parte, el 4 NQO sí manifiesta efecto genotóxico, lo que permite creer que éste agente puede ser activado por la intervención del CYP450. Estos hallazgos amplían el conocimiento que se tiene sobre un antiestrógeno de uso mundial (TAM) al probarlo en un modelo biológico diferente a los ya reportados. Así mismo, se logró comprobar la acción genotóxica del 4 NQO, siendo esto muy importante, debido a que no existía evidencia alguna empleando este modelo y la prueba mencionada.

INTRODUCCIÓN

Desde tiempo inmemorial el hombre ha utilizado medicamentos para aliviar sus molestias, para eliminar a los agentes patógenos y favorecer su salud, pero a pesar de los avances de la ciencia en nuestros días, se desconoce a fondo el mecanismo de acción de ciertos fármacos (Scherer, 1983).

Los fármacos son las sustancias activas que forman parte de los medicamentos y se han clasificado de acuerdo con la acción que ejercen sobre el organismo. Los quimioterapéuticos se distinguen por ser los que se utilizan en la defensa frente a microorganismos y parásitos (por ejemplo, antimicrobianos, antivirales, etc.) y los farmacodinámicos, que corresponden a los que modulan las funciones fisiológicas que no pueden ser controladas por las biomoléculas, como son: los adrenérgicos, esteroides, antihipertensores, inhibidores enzimáticos, cardiotónicos, antidepressivos, narcóticos, antiestrógenos, entre otros (Avendaño, 1993).

Actualmente existe un gran número de compuestos que se utilizan con fines terapéuticos, pero muchos de ellos constituyen un riesgo para la salud, debido a que se les han atribuido ciertas propiedades mutagénicas, genotóxicas y carcinogénicas (Raposa y Varkonyi, 1987; White *et al.*, 1992; Crofton *et al.*, 1993; Greaves *et al.*, 1993; Phillips *et al.*, 1994a; Sargent *et al.*, 1994).

Ahora bien, se sabe que muchos compuestos al ser consumidos por los organismos, pueden permanecer como promutágenos y podrían en algún momento, ocasionarles mutaciones debido a que pueden ser activados por determinadas enzimas (Gómez-Arroyo, 1994; Styles *et al.*, 1994; Smith y White, 1995). Tal es el caso de las enzimas que forman parte de la familia del citocromo P450 presentes en el pulmón, en el bazo, en el riñón, en algunos tejidos embrionarios y en el hígado de algunos animales, por ejemplo, rata, ratón, hámster, mono, ser humano (Vogel *et al.*, 1991), así como en los insectos.

Como ejemplo tenemos a la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*), que presenta en sus células las enzimas que componen al citocromo P450, el cual está involucrado en la síntesis de varias hormonas y feromonas necesarias para su desarrollo normal y su reproducción, además de que contribuye a la inactivación de los compuestos tóxicos, por lo que es necesario para sobrevivir en un ambiente adverso (Saner *et al.*, 1996). Aunque la destoxificación por medio del citocromo P450 provee protección a los organismos contra las toxinas del ambiente, este sistema también puede causarles efectos negativos (Lee, 1995).

ANTECEDENTES

EL ENSAYO SMART

Se han realizado investigaciones acerca del efecto genético de más de 700 agentes químicos (Vogel *et al.*, 1999), utilizando como modelo biológico a la mosca del vinagre, a través de la prueba de mutación y recombinación somática, cuyas siglas en inglés son SMART (Graf *et al.*, 1984, 1986; Graf y Singer, 1989, Guzmán-Rincón y Graf, 1995, Graf y Würigler, 1996).

SMART es una prueba que detecta el posible daño genético provocado por los agentes, en las células somáticas, usualmente en los ojos o en las alas de este organismo (Batiste-Alentron *et al.*, 1994), dado que es muy sensible y puede detectar a los agentes genotóxicos que son activados por el citocromo P450 (Graf y van Schaik, 1992). Está prueba también se ha utilizado para determinar la genotoxicidad de ciertos compuestos que forman parte de la dieta del ser humano (Graf y Würigler, 1986; Graf *et al.*, 1994; van Schaik *et al.*, 1984), así como de partículas contaminantes extraídas de la atmósfera (Delgado-Rodríguez *et al.*, 1994; Graf y Singer, 1989), pero no ha sido utilizada para ver el efecto de los antiestrógenos.

La *D. melanogaster* posee un sistema versátil para el metabolismo de xenobióticos siendo capaz de activar sustancias conocidas como promutágenos y procarcinógenos (Graf *et al.*, 1984, Graf y van Schaik, 1992), por lo que en algunos casos es mejor que los ensayos microbiológicos para detectar la genotoxicidad debida a la activación en este organismo eucarioto (Graf *et al.*, 1984; Hällström y Blanck, 1985). Sus células somáticas ofrecen la posibilidad de realizar un ensayo rápido y flexible en un corto periodo, ya que este organismo tiene un ciclo generacional breve [aprox. 10 días a 25 °C] (Guzmán-Rincón y Graf, 1995).

Los dos sistemas de prueba que se emplean en SMART (prueba del ojo [eye spot test] y prueba del ala [wing spot test]), se basan en el hecho de que durante la etapa de desarrollo embrionario de las moscas, los discos imagales de las larvas están en constante proliferación mitótica durante todo el estadio hasta su posterior diferenciación a través de la metamorfosis, para formar las estructuras del cuerpo de la mosca adulta (ojos, alas, etc.), por lo que da la posibilidad de exponer al mutágeno a un número amplio de células en mitosis al efecto de los mutágenos, de manera que de presentarse una alteración en dichas células, se originará a un clon de células mutantes. Esto origina un cambio visible en el fenotipo, el cual es detectado por variaciones en el número y forma de los tricomas. Además, el clon puede ser identificado como una mancha de células mutantes en la superficie corporal de las moscas adultas (Guzmán-Rincón y Graf, 1995).

LA PRUEBA EN LAS ALAS (SMART)

Fue diseñada para detectar mutaciones asociadas frecuentemente con deleciones y recombinaciones somáticas (SMART) producidas en *D. melanogaster* por la acción de agentes físicos y químicos (Graf *et al.*, 1984). Para ésta prueba se usan dos marcadores que afectan la apariencia de los tricomas de las alas: "multiple wing hairs" (*mwh*) que es una mutación recesiva homocigótica viable localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-0.3), que en homocigosis produce tricomas múltiples por célula en lugar del tricoma único de la condición silvestre en toda la superficie del ala. El marcador "flare" (*flr³*) es una mutación recesiva que afecta la forma de los tricomas, localizado en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-38.8) (Graf *et al.*, 1995).

Para esta prueba es muy importante emplear larvas que manifiesten ambos marcadores. Las larvas trans-heterocigotas (*mwh* + / + *flr³*), pueden ser obtenidas a través de la cruce de individuos entre dos líneas que presentan los marcadores genéticos citados [Figura 1.a] (Graf *et al.*, 1984). Tales larvas pueden ser sometidas a tratamientos agudos o crónicos, a diferentes edades (48-92 h.) y a distintos agentes genotóxicos, pero el daño producido en los discos imagales de la larva es evidenciado en el fenotipo de los tricomas de la cutícula del ala del adulto que pueden ser *mwh* o *flare* en forma de manchas simples (pequeñas y grandes) y manchas gemelas. Debido a lo anterior, se recomienda utilizar larvas de 72 hs. de edad dado que en este momento se presentará una elevada frecuencia de divisiones mitóticas en las células imagales, por lo que a esta edad se obtiene una alta sensibilidad a cualquier agente mutagénico y se presentará un aumento en el tamaño de las manchas de células mutantes y por consiguiente el mayor daño (Graf *et al.*, 1995).

Las líneas que se emplean para realizar las cruces son la línea homocigótica para *mwh* (*mwh/mwh*), la línea heterocigótica *flare* (*flr³/In(3LR)TM3, Bd⁸*) y la línea homocigótica Oregon que al mismo tiempo es heterocigota *flare* [ORR(1); ORR(2); *flr³/TM3, Bd⁸*]. Las líneas *flare* y Oregon, además de tener el marcador *flr³*, tienen el marcador *Bd⁸*. Éste se expresa en las alas de las moscas adultas como muescas en las puntas de las alas llamadas serrata. El marcador conocido como TM3 indica que las líneas presentan tres inversiones (dos paracéntricas y una pericéntrica), lo que hace que se elimine la recombinación en meiosis y se favorezca la sobrevivencia, de tal forma que de presentarse la recombinación, podría producirse un individuo homocigoto para el marcador *flr³*, lo cual sería letal (Lindsley y Zimm, 1992 citado en Guzmán y Graf *et al.*, 1995). Por otro lado, la línea Oregon lleva en el cromosoma 1 y 2 el carácter *R(R)* resistente al plaguicida conocido como DDT y sobreexpresen constitutivamente algunos genes del citocromo P450 (Graf *et al.*, 1998).

La cruce estándar (ST) se realiza con machos de la línea *mwh* y hembras vírgenes de la línea *flare*. Las larvas heterocigóticas resultantes de la cruce, poseen uno de cada uno de los marcadores recesivos [Figura 1.a] (Lindsley y Grell, 1968; García-Bellido y Dapena, 1974 citado en Graf *et al.*, 1984). Sin embargo, si se quiere valorar *in vivo* el efecto de activación de promutágenos por acción del metabolismo dependiente del citocromo P450 se utilizan hembras vírgenes de la línea Oregon y machos de la línea *mwh*, por lo que esta cruce es conocida como de bioactivación elevada (BE) (Graf *et al.*, 1998).

Existen diversos mecanismos que conducen a la aparición de los clones de los marcadores genéticos, entre los que se encuentran la recombinación mitótica, las deleciones, las mutaciones puntuales y la no disyunción (Figura 1 b, c, d, e, f).

La recombinación mitótica entre las cromátidas de cromosomas homólogos da como resultado, en primer lugar, la aparición de manchas gemelas, es decir, manchas que exhiben áreas *mwh* y *flr³* adyacentes, dado que la recombinación se produce entre el centrómero y estos marcadores, lo que origina que cada célula resultante tenga un cromosoma recombinado y uno sin recombinar (Figura 1 b). En segundo lugar, la aparición de manchas simples *mwh*, se debe a la recombinación que se produce entre el marcador *flr³* y el marcador *mwh* (Figura 1 c), y en tercer lugar, cuando los dos eventos de recombinación descritos ocurren al mismo tiempo, pueden dar como resultado una mancha simple *flare* (Graf *et al.*, 1984).

El cambio de un alelo del tipo silvestre (mutación puntual), así como la pérdida de un fragmento pequeño o extenso del cromosoma que involucre al alelo silvestre (delección), originará una mancha del tipo simple (*mwh* o *flr³*) (Figura 1 d y e). En cuanto a la no disyunción o pérdida de un cromosoma que contenga el alelo silvestre, se tendrá como resultado la aparición de manchas del tipo simple (*mwh*) (Figura 1 f) (Graf *et al.*, 1984).

Por otro lado, el software que analiza estadísticamente los resultados de SMART del ala propuesto por Frei Y Würigler (1988), detecta las diferencias que puedan existir entre los valores espontáneos en un testigo y las series de tratamientos a las que se someten las larvas. Para evaluar los efectos genotóxicos existen dos pruebas. Una basada en la prueba no paramétrica de U (Mann-Whitney-Wilcoxon) de dos colas, la cual analiza los datos sin la exigencia de una distribución normal y considera la variabilidad individual. La otra prueba se basa en ji cuadrada para proporciones (de una cola), que compara las proporciones de manchas por ala entre dos muestras. El efecto genotóxico es diagnosticado porque la frecuencia de manchas verdadera de los tratamientos es al menos, el doble de la frecuencia obtenida en los testigos negativos. Esta frecuencia es $m = 2$ para manchas simples y totales, y $m = 5$ para manchas grandes y gemelas (tabla 1). Con esta prueba se tiene la probabilidad de definir un riesgo genotóxico inaceptable. Si se puede excluir este riesgo con una significancia estadística, entonces los resultados son negativos. Si la muestra no es lo suficientemente grande, los datos pueden ser insuficientes y el resultado es no concluyente; es decir no se puede excluir la hipótesis nula ni la hipótesis alterna. Los resultados con esta prueba tienen cuatro categorías: positivos, negativos, débiles y no concluyentes.

Para evitar los resultados no concluyentes en al menos un 95 % de los casos, se recomienda revisar al menos 110 alas (55 individuos) (Frei Y Würigler, 1988 citado en Heres, 2001). De esta manera, cuando el tratamiento es verdaderamente no genotóxico o si lo es, en un 95 % de los casos uno puede decir que el resultado es negativo o positivo respectivamente. En la práctica este parámetro es importante para evaluar resultados negativos o de muy bajos efectos (Frei, comunicación personal citado en Heres, 2001)

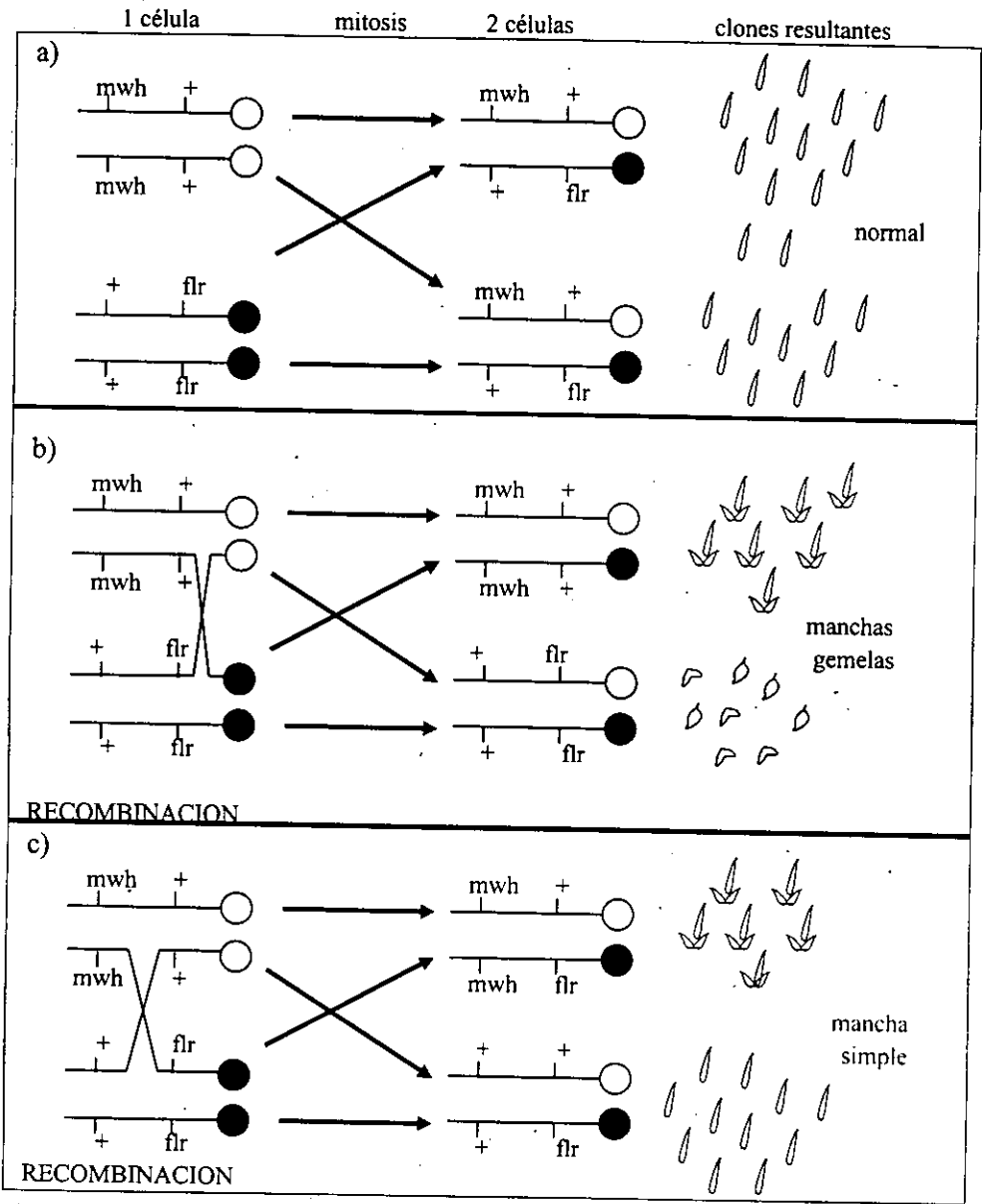


FIGURA 1: Esquema que ilustra las diferentes vías para la formación de manchas en la SMART con marcadores múltiple wing hairs (*mwh*) y flare (*flr*) en las células del ala. Las manchas gemelas se obtienen por recombinación del marcador *flr* proximal (b), la recombinación con el marcador *flr* distal produce únicamente manchas simples *mwh* (c). Los eventos como deleciones (d), las mutaciones puntuales (e) y las no disyunciones (f) dan como resultado manchas simples *mwh*, o sus análogos en forma de manchas *flr* (no ilustrado). Solo los brazos izquierdos del cromosoma 3 son ilustrados.

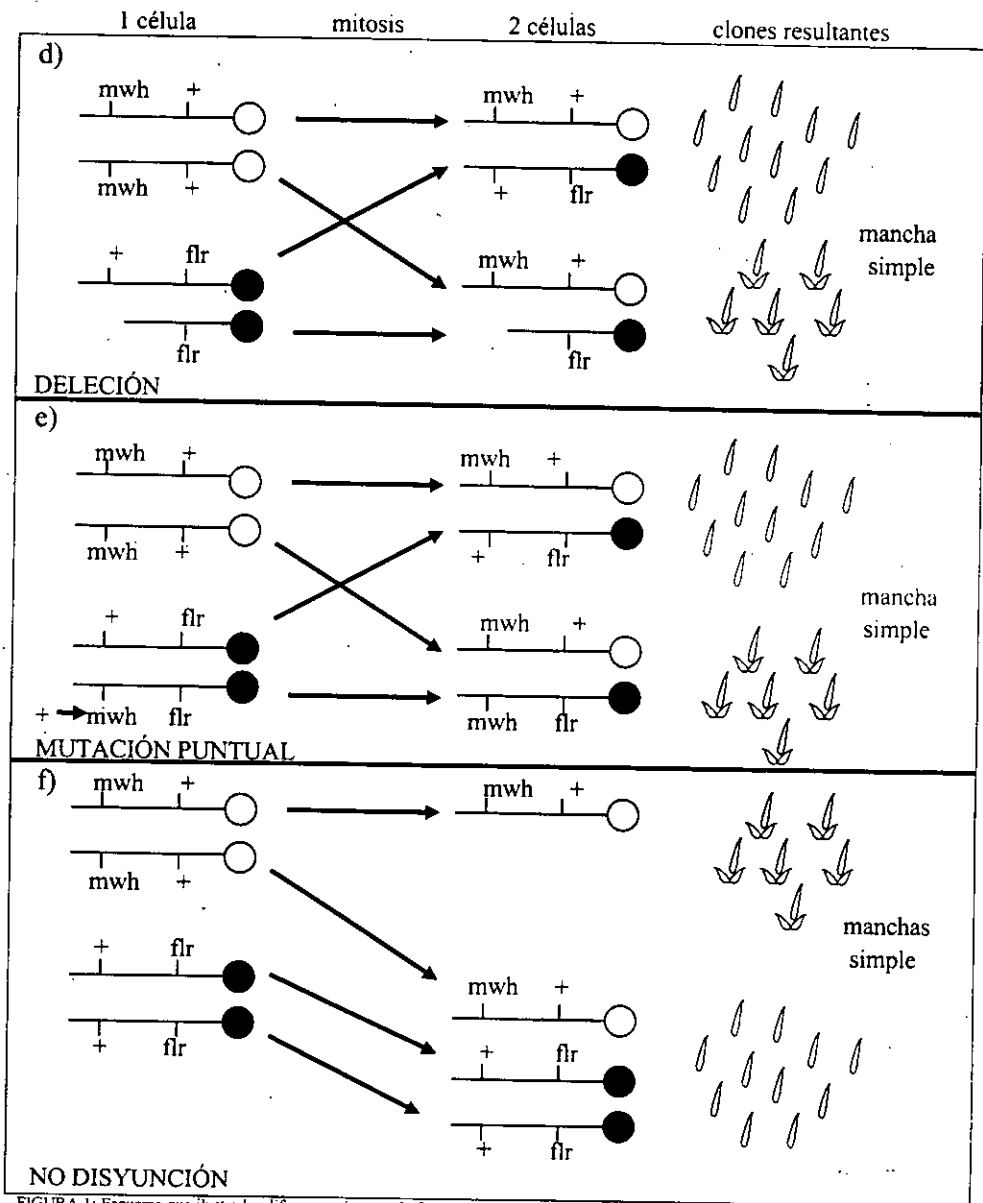


FIGURA 1: Esquema que ilustra las diferentes vías para la formación de manchas en la SMART con marcadores múltiple wing hairs (*mwh*) y flare (*flr*) en las células del ala. Las manchas gemelas se obtienen por recombinación del marcador *flr* proximal (b), la recombinación con el marcador *flr* distal produce únicamente manchas simples *mwh* (c). Los eventos como deleciones (d), las mutaciones puntuales (e) y las no disyunciones (f) dan como resultado manchas simples *mwh*, o sus análogos en forma de manchas *flr* (no ilustrado). Solo los brazos izquierdos del cromosoma 3 son ilustrados.

TAMOXIFEN

El tamoxifen cuya fórmula química es (Z)-2-[p-(1-2 Difenil-1-butenil) fenoxi]-N,N-dimetiletilamina [$C_{26}H_{29}NO$] (figura 2) (Merk, 1976), se caracteriza por ser un compuesto trifeniletileno (Vancutsem *et al.*, 1994), con un peso molecular de 371.53 g (Merk, 1976). En su forma comercial es soluble en etanol, metanol y acetona, siendo poco soluble en agua (Frei, comunicación personal). La dosis terapéutica recomendada va de 10 a 20 mg por vía oral dos veces al día [mañana y tarde] (Foz-Sala *et al.*, 1987). Generalmente su presentación comercial es en forma de tabletas de citrato de tamoxifen (TAM) y cuenta con varios nombres comerciales como son "Kessar", Nourytam", "Tamofen", "Tamoxifen Farmos", "Zemide", "Novaldex"(Merk, 1976).

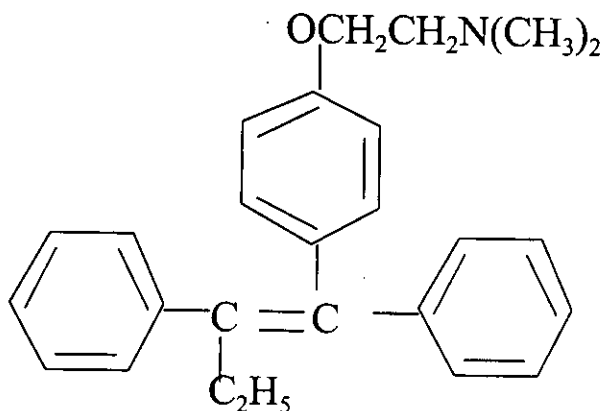


FIGURA 2: Fórmula desarrollada de fármaco tamoxifen.- (Z)-2-[p-(1-2-Difenil-1-butenil)-fenoxi]-N,N-dimetiletilamina (Merk, 1976).

Este compuesto es uno de los antiestrógenos utilizado en el tratamiento de todos los estadios del cáncer de mama (Greaves *et al.*, 1993; Sargent *et al.*, 1994; Vancutsem *et al.*, 1994; Rajah y Pento, 1995; Smith y White, 1995). Ha sido indicado principalmente en mujeres posmenopáusicas (Bland y Copeland, 1993), dado que aparentemente detiene el crecimiento de las células cancerígenas en las mamas (Smith y White, 1995) y previene su desarrollo (Vancutsem *et al.*, 1994), pero existe evidencia de que aumenta la frecuencia de aparición de carcinomas en el endometrio (Bland y Copeland, 1993; Tierney *et al.*, 1996; Marqués y Beland, 1997; Williams y Jeffrey, 1997), al parecer por activación del citocromo P450 (Hukkanen *et al.*, 1997; Smith y White, 1998). Sin embargo, Tannenbaum en 1997, en base a la revisión que realizó en la literatura existente, menciona que el TAM no es genotóxico en mujeres adultas y que no es mutagénico en ensayos *in vivo* e *in vitro*. Del

mismo modo Moorthy *et al.* en 1997 sugieren que al someter ratones hembra al TAM, este es transformado a metabolitos no genotóxicos.

Aunque es más frecuente su uso para el tratamiento del cáncer de mama en mujeres, existe poca experiencia clínica disponible con el TAM en el tratamiento del cáncer de mama en varones, por lo que cada día es más común su utilización en una dosis diaria de 10 mg por vía oral, por lo que se cree que deberá de reemplazar a la extirpación de la glándula como tratamiento inicial de la enfermedad (Tierney *et al.*, 1996).

Se sabe también, que afecta el contenido mineral del hueso y la densidad ósea, así como también el metabolismo del colesterol (Tierney *et al.*, 1996), de lípidos y proteínas, por lo que está en estudio la relación entre el consumo de este fármaco con las fracturas causadas por osteoporosis y con el infarto al miocardio (Bland y Copeland, 1993; Tierney, *et al.*, 1996).

Los efectos colaterales adversos más frecuentes que se han observado son las sofocaciones, las náuseas y los vómitos. También se han descritos efectos a nivel de las retinas con disminución de la agudeza visual (Foz-Sala *et al.*, 1987). Otro efecto colateral posible es el aumento del peso corporal, así como es posible que produzca leucopenia, trombocitopenia y tal vez tromboflebitis (Bland y Copeland, 1993). Se ha visto que produce incremento transitorio de dolor óseo y posible anovulación (Tierney *et al.*, 1996).

Este compuesto al influir directamente en el metabolismo de los estrógenos, ha estado sujeto a múltiples estudios abarcando su metabolismo, su capacidad carcinogénica y mutagénica y sus efectos genotóxicos, utilizando diversos modelos biológicos para estudios *in vitro*, entre los que sobresalen los siguientes: hepatocitos de ratas (White *et al.*, 1992; Greaves *et al.*, 1993; Phillips *et al.*, 1994 a,b; Sargent *et al.*, 1994; Vancutsem *et al.*, 1994; Carthew *et al.*, 1995; Jarman *et al.*, 1995; Smith y White, 1995; Osborne *et al.*, 1996; Busch, 1997; Davies *et al.*, 1997; Styles *et al.*, 1997), hepatocitos de ratones (Greaves *et al.*, 1993; Randerath *et al.*, 1994; Cai y Wei, 1995), microsomas de mono (Comoglio *et al.*, 1996), fibroblastos (Rajah y Pento, 1995), embriones de criceto (hamster) (Tsutsui *et al.*, 1997), linfoblastos humanos y líneas celulares linfoblastoides (Raposa y Varkonyi, 1987; Crofton *et al.*, 1993; Styles *et al.*, 1994, 1997), microsomas humanos (Wilson *et al.*, 1995; Lim *et al.*, 1997), células de la médula ósea de ratón (Vijayalaxmi y Ral, 1996), tejido epitelial y tejido perteneciente al endometrio (Carmichael *et al.*, 1996; Marqués y Beland, 1997; Hukkanen *et al.*, 1998; Smith y White, 1998) y estudios *in vivo* con ratones (Moorthy *et al.*, 1997).

Existen ciertas contradicciones respecto a la caracterización del TAM como agente potencial genotóxico. En 1987 se encontró que el tamóxifen no produce intercambio de cromátidas hermanas, por lo que no se esperaba que fuera capaz de producir leucemias secundarias, como sucede con otras drogas citostáticas como el 5-fluoruracilo (Raposa y Varkonyi, 1987).

Sin embargo, diversos estudios han reportado que el TAM sí es capaz de producir anomalías cromosómicas en ratas, tales como micronúcleos (Crofton *et al.*, 1993; Phillips *et al.* 1994b; Styles *et al.*, 1994), aneuploidías (Sargent *et al.*, 1994; Styles *et al.*, 1997; Wogan, 1997), condensación prematura, endorreduplicación del ADN y ruptura de cromosomas (Sargent *et al.*, 1994), mutaciones puntuales (Vancutsem *et al.*, 1994; Davies *et al.*, 1997), además es, para ratones y ratas, un agente clastogénico y es capaz de inducir tanto aberraciones cromosómicas como micronúcleos (Vijayalaxmi y Rai, 1996; Styles *et al.*, 1997). Se han observado también en linfoblastos humanos (*in vitro*), anomalías como micronúcleos (Crofton *et al.*, 1993; Styles *et al.*, 1994, 1997).

Todavía no es claro el mecanismo de formación de carcinomas en el endometrio humano por el TAM, pero se tiene evidencia de que éste puede incrementar el riesgo de padecer este mal (Easton, 1998) y existe la certidumbre de que sí produce carcinomas en los hepatocitos de rata y ratón (Hukkanen *et al.*, 1998).

Se ha observado que este fármaco es capaz de formar aductos con proteínas (Smith y White, 1995), con el ADN del tejido epitelial de ratón (Cai y Wei, 1995) y con el ADN hepático de rata (Randerath *et al.*, 1994; Carmichael *et al.*, 1996; Osborne *et al.*, 1996, 1997; Busch, 1997; Davies *et al.*, 1997; Wogan, 1997).

Se ha demostrado que algunos de los daños en ratas y en los linfoblastos humanos *in vitro* (carcinomas, efectos clastogénicos y genotóxicos, aberraciones cromosómicas) que puede producir el TAM son debido a la conversión que sufre por intervención de las isoenzimas y monooxigenasas del CitocromoP450 [CYP450] (White *et al.*, 1992; Phillips *et al.*, 1994a; Styles *et al.*, 1994, 1997; Smith y White, 1995, 1998; Tsutsi *et al.*, 1997; Wogan, 1997; Hukkanen *et al.*, 1998). Se encontró que dicha activación metabólica es por alfa-hidroxilación del grupo etil (Phillips *et al.*, 1994b; Jarman *et al.*, 1995), produciéndose dos metabolitos genotóxicos conocidos como alfa-C-hidroxitamoxifen (Jarman *et al.*, 1995; Lim *et al.*, 1997) y el 4-hidroxitamoxifen (Lim *et al.*, 1997). Sin embargo, Wilson *et al.* (1995) contradicen estos hallazgos dado que encontraron que el sistema metabólico intra y extracelular de los linfocitos humanos en estudios *in vitro*, no activa el TAM a compuesto genotóxico.

Así mismo Carmichael *et al.* (1996) apoyaron esta situación y concluyeron que aunque en ratas sí se producen aductos con el ADN, no puede ser aplicada al humano en estudios *in vivo*. Algo similar encontraron Smith y White (1995) e indicaron que no hay evidencia de daño producido por el TAM en siete mujeres que estuvieron bajo tratamiento.

Un artículo emitido por el National Cancer Institute (NCI, 1999) indica que hay pocos reportes de toxicidad hepática en mujeres que tomaron TAM, pero es claro que puede causar algunas veces alteración en el hígado de mujeres, la que raramente puede ser severa o de amenaza para su vida (NCI, 1999).

En 1997, Williams y Jeffrey afirman que el TAM es genotóxico y carcinógeno en animales experimentales y sólo carcinógeno para el humano y mencionan que el

toremifene, es un análogo del tamoxifen, que podría sustituirlo en el tratamiento del cáncer. Este compuesto también es capaz de producir aneuploidias y anomalías en la estructura cromosómica, aunque en menor proporción.

Por su parte, Moorthy *et al.* (1997) demostraron que al inducir las enzimas del CYP450, por medio de diferentes sustancias (fenobarbital, beta-naftoflavina y pregnenolone-16 alfa-carbonitrilo), se afecta el metabolismo del TAM en ratones hembra, encontrando que estas drogas aumentan la detoxificación del tamoxifen a metabolitos no genotóxicos. Sin embargo, dos años antes, Carthew *et al.* (1995), observaron que al tratar ratas Wistar por tres meses e interrumpir el tratamiento y utilizando posteriormente fenobarbital, se presentaban hepatocarcinomas nueve meses después de la aplicación, lo que indica que el TAM utilizado por largos periodos de tiempo, deja residuos en el cuerpo que pueden ocasionar daños al ser activados por otras sustancias como el fenobarbital.

Randerath *et al.* (1994) demostraron que el pentaclorofenol modula la actividad metabólica del TAM, en el sentido de que controla la formación de aductos *in vivo* con el ADN hepático de ratón.

Según lo reportado por Wogan (1997), el TAM es considerado como un carcinógeno que actúa por medio de mecanismos genotóxicos y no genotóxicos, y que puede elevar considerablemente, el riesgo de cáncer particularmente en el endometrio. Como ya se mencionó, el mecanismo de este tipo de cáncer asociado al tratamiento con esta sustancia no es claro, por lo que Smith y White (1998) presentaron dos posibles explicaciones:

- (1) El Tamoxifen causa daño y mutación en el ADN de las células uterinas
- (2) Promueve el desarrollo de tumores endometriales a través del bloqueo de la actividad de los estrógenos.

Es muy probable que no interactúe directamente con el ADN para producir daño genético, si no que el efecto perjudicial lo produzca porque puede funcionar, por un lado, como un antiestrógeno evitando el cáncer mamario, y por otro, como un estrógeno en otros tejidos contribuyendo al desarrollo del cáncer endometrial. Con esta doble función se identifican a drogas conocidas como receptores moduladores selectivos de estrógenos (SERMs), y el mejor de ellos es el TAM (Easton, 1998).

El cáncer uterino tiene una incidencia menor de 1% en mujeres que tomaron una dosis de 20 mg diarios de Tamoxifen por cinco años, pero los especialistas clínicos indican que los beneficios que provoca su administración son mayores. Un estudio publicado en el *The Lancet* (Mayo, 16 1998) (citado en Komen, 1999) informa que tomando el fármaco por cinco años, se reduce significativamente la recurrencia de cáncer en ambos senos (42%) y la muerte (22%) en todas las mujeres bajo tratamiento; aunque deben realizarse regularmente exámenes ginecológicos (Komen, 1999)

La recomendación anterior debe tenerse presente, debido a que Easton (1998), del Hospital de la Universidad de Chicago, indica que el TAM es defectuoso, debido a que bloquea la acción de los estrógenos en el seno, preserva los efectos benéficos de los mismos para el mantenimiento del hueso y del sistema cardiovascular; pero retiene los estrógenos en el útero con la tendencia a promover el cáncer. Lo mismo sugiere un documento publicado por el NCI (1999), dado que hay mujeres que han muerto por cáncer uterino y tomaron TAM, presentando los síntomas característicos de la enfermedad, como puede ser el sangrado vaginal anormal (NCI, 1999).

Independientemente de los daños carcinogénicos que pueda ocasionar, es importante resaltar que las personas que están bajo tratamiento pueden presentar infinidad de efectos colaterales adversos que pueden conllevar a la muerte (infartos y tromboflebitis) y otros menos graves pero de cierta importancia como ceguera, fracturas, aumento de peso, dolor óseo (Tierney *et al.*, 1996; Bland y Copeland, 1993), aunque no en todos los casos (Gorin, 1998; Nayfield, 1996; NCI, 1999; Komen, 1999).

También puede ocasionar síntomas muy parecidos a la menopausia [bochornos (CNN, 2000; Gordon, 1999), flujo y resequedad vaginal o sangrado, irritación de la piel alrededor de la vagina, dolor de cabeza, pérdida del apetito y fatiga] (Gordon, 1999) y una rara toxicidad hepática, lo que ocasional y poco frecuente puede ser una amenaza para la vida (NCI, 1999).

En las mujeres que han recibido quimioterapia y TAM al mismo tiempo, se observa un incremento en el número de coágulos sanguíneos pero la frecuencia de casos es pequeña (NCI, 1999).

Tratando de dilucidar los efectos negativos del TAM, Comoglio *et al.* (1996) demostraron que al administrarlo a monos, se produce en ellos un poderoso metabolito capaz de inhibir el metabolismo de esta droga, conocido como N,N-Didesmetil-tamoxifen y al ser aplicado *in vitro* a microsomas de humano y de rata, se reduce significativamente la activación del TAM, vía el citocromo P450 por lo que aparentemente, este metabolito contribuye a proteger a los primates, como el hombre, de la inducción del cáncer de hígado.

Para evaluar el potencial efecto genotóxico en la *D. melanogaster* que podría ser incrementado vía la inducción del citocromo P450, se utilizaron los organismos producto de la cruce conocida como de bioactivación elevada (BE). Esto hará posible demostrar si este organismo, con elevada síntesis del citocromo, puede activar al TAM, transformándolo en un compuesto genotóxico. Por lo que al probar este fármaco en un sistema eucariote diferente a los ya reportados en la literatura, se aportará información sobre su activación como agente genotóxico o a la ausencia de ésta. Así mismo, el someter a esta prueba y el emplear este modelo nos permitirá conocer más a cerca de los efectos genotóxicos del 4 NQO.

OBJETIVOS.

Debido al papel fundamental de este fármaco para la protección contra el cáncer mamario y por el riesgo que representa para la salud del ser humano que está bajo tratamiento, el presente estudio pretende detectar si existe un riesgo genotóxico con el tamoxifen. Para demostrarlo se propone utilizar la prueba de mutación recombinación somática (SMART) en el ala de *D. melanogaster* con la cruz de BE (bioactivación elevada).

Del mismo modo, se pretende comprobar el riesgo genotóxico del 4-nitroquinole-1-óxido (4 NQO), el cual no ha sido reportado para este sistema.

MATERIALES Y MÉTODO.

La cruz BE se realizó con individuos pertenecientes a dos líneas diferentes, la línea *mwh* y la línea Oregon. Los machos de la línea *mwh* fueron cruzados con hembras vírgenes pertenecientes a la línea Oregon (Graf *et al.*, 1984). Las líneas fueron obtenidas por donación del Dr. Ulrich Graf que pertenece al Institute of Toxicology, Swiss Federal Institute of Technology and University of Zurich, Suiza.

En cuanto a los agentes químicos (TAM Y 4 NQO)*, fueron obtenidos por donación del Dr. Hansjörg J. Frei que pertenece al Institute of Toxicology, Swiss Federal Institute of Technology and University of Zurich, Suiza.

El diseño del experimento contempló un factor con seis niveles, tomando como variable de respuesta la frecuencia de manchas por individuo. Se probaron tres diferentes concentraciones (0.66, 1.65 y 3.3 mM) las que se determinaron de acuerdo con la dosis diaria recomendada para el ser humano [una píldora de 20 mg disuelta en 21.5 ml de solvente provee una concentración de 2.5 mM] (Frei, comunicación personal).

Los lotes testigo fueron integrados por dos testigos negativos (uno con Medio Instantáneo Carolina (Carolina Biological Supply Company, Burlington, NC, U.S.A.) y el otro con medio Carolina y una solución etanol al 5 % y tween-80 al 5 % (v/v) como disolvente) y por un testigo positivo, que fue un compuesto con actividad genotóxica comprobada y activado por el P450, el cual produce aductos muy parecidos a los que se ha reportado que produce el TAM: el 4NQO.

* Para conocer la marca y el número de catálogo de las sustancias, consultar el apéndice.

Para el 4 nitroquinole-1- oxide -4NQO- fueron utilizadas dos diferentes concentraciones [2.5 y 5 mM], manteniéndolas bajo las mismas condiciones que los tratamientos.

Una vez realizada la cruce, se procedió a la obtención de huevos, los que siempre fueron colectados durante un periodo de ocho horas en botellas que contienen un medio realizado con levadura fresca adicionada con azúcar, a una temperatura de 25° C, con una humedad de 60-80% y en la oscuridad (Graf, comunicación personal).

En el momento de que las larvas alcanzaron 72 horas (\pm 4 horas) de edad, se les retiró el medio y se lavaron con agua corriente (25° C) con la ayuda de un colador metálico (Guzman-Rincón y Graf, 1995).

Las larvas fueron sometidas a un tratamiento crónico. Se colocaron en tubos de ensayo con capacidad de 15 ml donde cada uno contenía 1.5 g de Medio Instantáneo Carolina y 6 ml de la solución (Graf *et al.*, 1984, 1994; Graf y van Schaik, 1992) de tamoxifen preparada con una solución etanol al 5 % y tween-80 al 5 % (v/v) como disolvente. A continuación, los tubos fueron puestos a incubar a una temperatura de 25° C (\pm 2° C), por aproximadamente 48 horas, con la finalidad de que las larvas completaran su desarrollo y se obtuvieran organismos adultos.

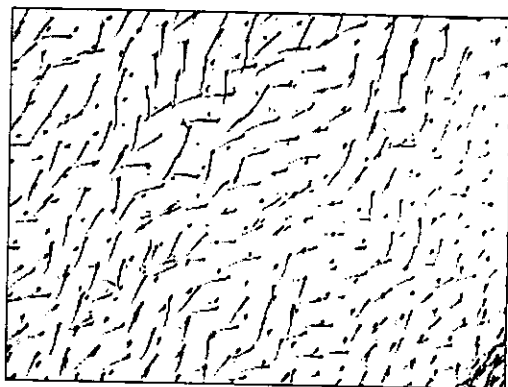
Las moscas que emergieron fueron colectadas y almacenadas en frascos que contenían etanol al 70 %, para después separar a la progenie trans-heterocigota (*mwh* + / + *flr*³), con fenotipo silvestre de la población con el carácter serrata. Las alas de 391 individuos (tabla 1) fueron montadas con una solución de Faure (30 g de goma arábica, 20 ml de glicerol, 50 g de hidrato cloral y 50 ml de agua de la llave) y revisándose las dos superficies con un microscopio óptico a 400x, registrando el número de manchas presentes. En cada caso el tamaño de las manchas estuvo determinado en base al número de células que presentaban el fenotipo *mwh* [multiple wing hairs]o el *flr*³ [flare]. Tres categorías para las manchas son reconocidas: (1) manchas *mwh* simples, (2) manchas *flr*³ simples y (3) manchas gemelas, es decir, son manchas que exhiben áreas *mwh* y *flr*³ adyacentes [figura 3 a y b] (Graf *et al.*, 1984 citado en Graf *et al.*, 1989).

La evaluación de las manchas en las alas se realizó por medio del programa SMART (Frei, 1988). Para el análisis estadístico, las manchas serán agrupadas en base al tamaño y evaluadas por separado de acuerdo con la siguiente clasificación:

- 1- Manchas pequeñas simples de una a dos células (fenotipo *mwh* o *flr*³).
- 2- Manchas grandes simples de tres o más células (fenotipo *mwh* o *flr*³).
- 3- Manchas gemelas con una área *mwh* y una *flr*³.

Para determinar la significancia de la frecuencia de manchas por individuo, se empleó la regla de decisión múltiple, a través del software que realiza el análisis estadístico, con el cual se determinó si el fármaco produjo resultados positivos, débilmente positivos, negativos o no concluyentes (Frei y Würgler, 1988). Basado en el número y el tamaño de los clones *mwh*, es posible calcular la frecuencia de inducción mutagénica por célula. Frei y Würgler (1988) han propuesto una estimación integral de la frecuencia de inducción por célula y por división celular de acuerdo con la división de la frecuencia de manchas en el ala entre el número de células contenidas en el ala, que es de aproximadamente 24,400 y de 48,800 en un individuo.

a) mancha simple *mwh*



b) mancha gemela

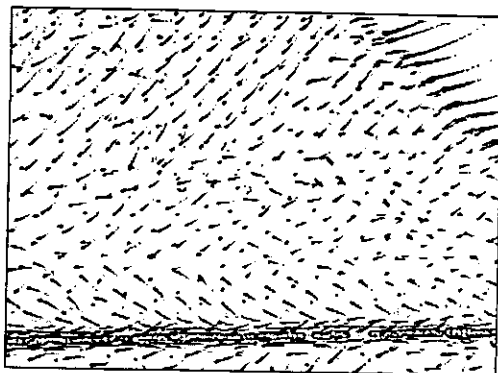


FIGURA 3: Esquema que ilustra los dos tipos de manchas o clones producto de los diferentes mecanismos de acción genotóxica. a) mancha *mwh*, b) Mancha gemelas.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

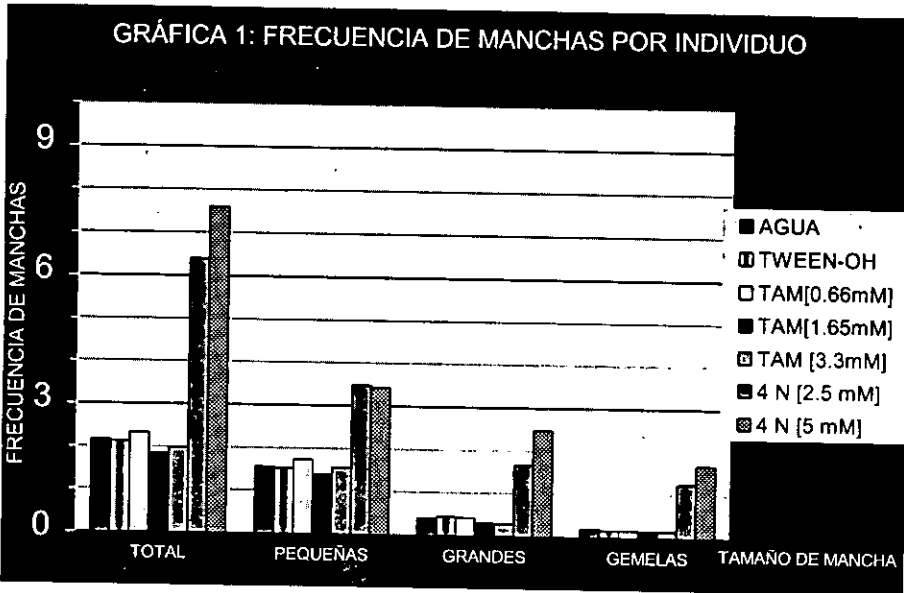
Después de los diferentes tratamientos crónicos empleados se evaluaron los efectos producidos por el Tamoxifen (TAM) en las células somáticas del ala en *D. melanogaster* mediante la prueba SMART. El efecto del TAM fue negativo en comparación con los testigos, tanto el agua deionizada como el tween-OH al 5% (Tabla 1). En cuanto a la frecuencia espontánea de manchas por individuo se observa que ésta se presentó con el TAM de manera similar a los testigos Tween-OH y agua deionizada (Tabla 1, Gráficas 1, 2 y 3).

TABLA 1

RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE MANCHAS EN EL ALA DE DROSOPHILA CON LA CRUZA BE.									
Com- puesto de ala	Número	Manchas por ala (Número de manchas) Stat. Diagn. *				Manchas con clon mwh	Prom. de ciclos de divi- sión celular	Frecuencia de formación de clones x10(-5)	
		Manchas simples pequeñas 1-2 células) m = 2.00	Manchas simples grandes (>2 células) m = 5.00	Manchas gemelas m = 5.00	Total manchas m = 2.00			ob- ser- vado	control corre- gido
control A	70	1.56(109)	0.40(28)	0.20(14)	2.16(151)	142	2.11	8.3	
control B	56	1.52(85)	0.45(25)	0.16(9)	2.12(119)	117	2.18	8.6	0.2
tratamiento	1	1.73(97)-	0.43(24)-	0.16(9)-	2.32(130)-	121	2.11	8.9	0.5
tratamiento	2.5	1.38(76)-	0.31(17)-	0.15(8)-	1.84(101)-	95	2.09	7.1	-1.2
tratamiento	5	1.56(84)-	0.30(16)-	0.15(8)-	2.00(108)-	100	1.96	7.6	-0.7
tratamiento	2.5	3.48(181)+	1.67(87)+	1.25(65)+	6.40(333)+	304	2.39	24.0	15.7
tratamiento	5	3.44(165)+	2.48(119)+	1.69(81)+	7.60(365)+	346	2.70	29.6	21.2

* Diagnostico estadístico acordado por Frei y Wuergler (Mutation Res., 203 (1988) 297-308:
 + = positivo; - = negativo; w = falso positivo; i = no concluyente.
 m = factor de multiplicación.
 Niveles de probabilidad: alpha = beta = 0.05.

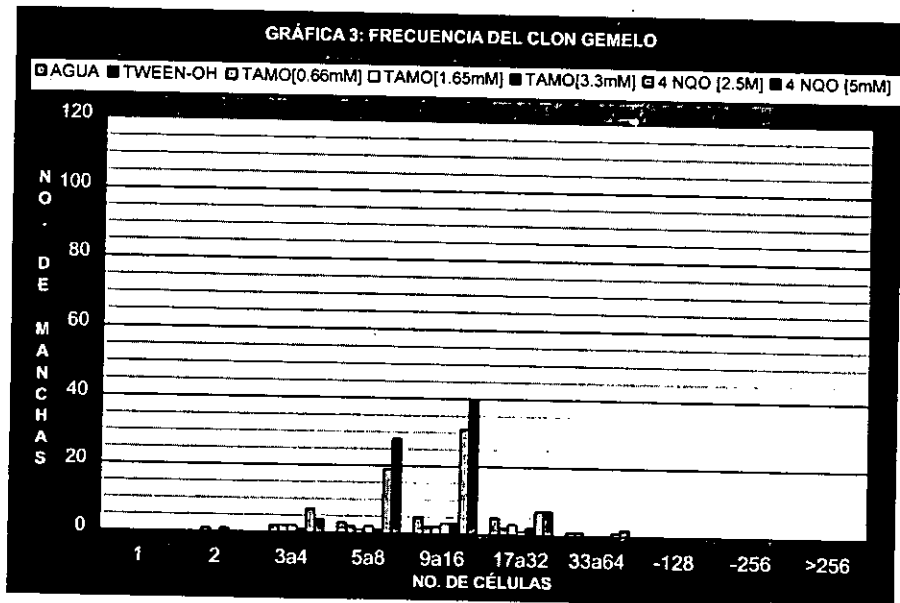
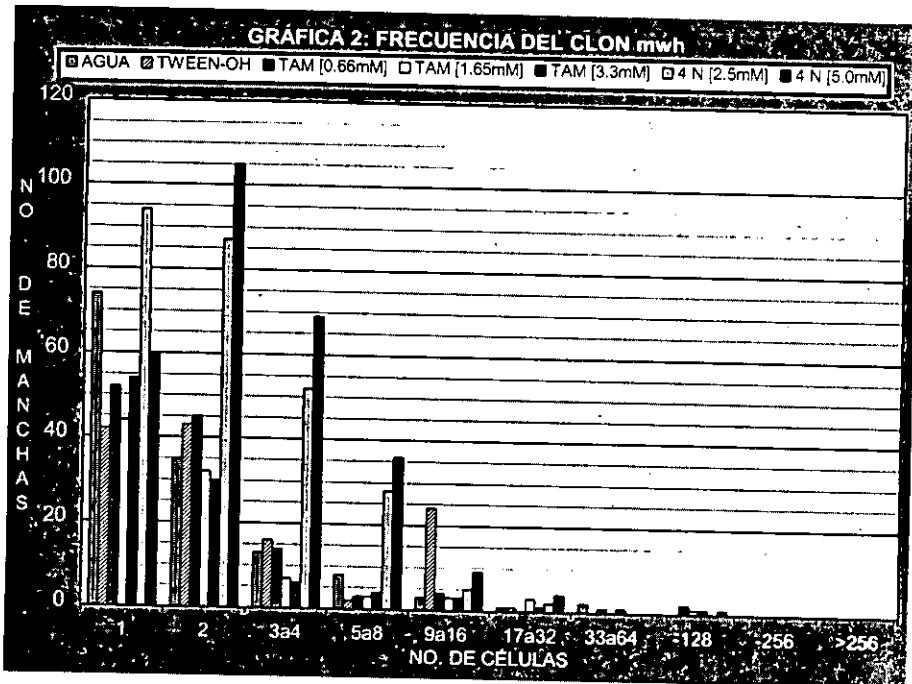
La distribución de los clones *mwh* mostró que el número de células del clon más frecuente está ubicado entre una y dos células (clon pequeño). Se puede afirmar que el TAM no produce efectos genotóxicos, puesto que no se afectaron significativamente a las células, ya que la frecuencia de mutación en las moscas tratadas no es mayor a la frecuencia de mutación en los testigos negativos (Tabla 1, Gráfica 2).



El 4-NQO sí produjo cambio genético en todos los clones, dado que los clones pequeños *mwh* (1 a 2 células) fueron más frecuentes, pero también se presentan clones de 3 a 8 células, siendo la frecuencia significativamente más alta que los testigos (Gráfica 2). Lo anterior indica que este agente manifestó un efecto genotóxico tardío, es decir que la recombinación entre cromosomas homólogos se presentó en etapas más tardías del desarrollo larvario comparándolo con los eventos que produjeron los clones gemelos (9 a 32 células) (Gráfica 3)

En cuanto a la frecuencia de clones gemelos, se observa que la frecuencia no es más alta que la del testigo, para el TAM. Con el 4NQO se observa que al tamaño del clon producido significativamente más grande (más de 2 células) (Gráfica 3), debido a que el efecto genotóxico fue tardío. Lo anterior confirma el hecho de que efectivamente el 4NQO debe ser activado vía la intervención del grupo de proteínas que corresponden al CYP450.

Al observar la frecuencia de manchas tomando en consideración el sexo de los individuos se tiene que en los machos hay una frecuencia ligeramente mayor que en las hembras para el agua y el TAM en sus tres concentraciones. En cuanto al 4NQO se detectó que las hembras son ligeramente más susceptibles (Gráfica 4).





DISCUSIÓN

En la literatura se ubica al TAM como un agente carcinógeno y genotóxico para mamíferos pequeños (rata, ratón y hamster) en ensayos *in vivo* (White *et al.*, 1992; Greaves, 1993; Sargent *et al.*, 1994; Vancutsem *et al.*, 1994; Cai y Wei, 1995; Carthew *et al.*, 1995; Rajah y Pento, 1995; Vijayalaxmi y Rai, 1996; Davies *et al.*, 1997; Wogan, 1997) e *in vitro* (White *et al.*, 1992; Phillips *et al.*, 1994 a,b; Osborne *et al.*, 1996, 1997; Tsutsi *et al.*, 1997) y que es activado como agente dañino por las monooxigenasas pertenecientes al CYP450 (Styles *et al.*, 1994; Comoglio *et al.*, 1996).

Este mecanismo de carcinogénesis es diferente cuando se comparan los resultados obtenidos en el hígado de rata con el endometrio y el tejido hepático del humano. Aunque la evidencia indica que para el roedor en cuestión, sí se produce daño, no se ha demostrado cuál es el mecanismo de formación de carcinomas ni de aductos con el ADN en el útero ni el hígado del humano (Busch, 1997).

Los resultados obtenidos con la prueba del ala y SMART, indican que al menos para la *D. melanogaster* de la cruz de bioactivación elevada (BE), el fármaco no es genotóxico. Con lo anterior se demostró que en este eucariote este compuesto no es activado por la familia de las enzimas del CYP450, para producir daño. Esto concuerda con Tannenbaum (1997) quien indicó, en base a su revisión bibliográfica, que el Tamoxifen no es genotóxico y

que los aductos de DNA están ausentes, al menos para mujeres adultas que estuvieron bajo tratamiento y con Moorthy y colaboradores (1996) es metabolizado a compuestos no genotóxicos cuando es administrado a ratones hembra en estudios *in vivo*.

El tratamiento con el testigo positivo (4NQO) fue genotóxico en este bioensayo en sus dos concentraciones, tal como se esperaba; dado que en la literatura es ubicado como un agente genotóxico (Qingyi *et al.*, 1996; Gavião *et al.*, 1999) debido a que produce gran cantidad de aductos en el ADN al ser activado por el citocromo P450. Hasta el año 2000, no existía ningún trabajo previo que hubiera evaluado el efecto del 4-nitroquinole-1-oxide, utilizando la prueba del ala y SMART. Los datos presentados son de suma importancia por que comprueban la genotoxicidad de esta sustancia a través de este bioensayo. Los datos obtenidos por este trabajo se concuerdan con lo encontrado por Gavião y colaboradores (1999) en el sentido de que el 4NQO produce daño genotóxico, sólo que ellos emplearon el SMART que evalúa el daño en los ojos de las moscas (SMART w/w⁺ eye assay).

CONCLUSIONES

Debido a la importancia terapéutica que tiene el Tamoxifén para el tratamiento del cáncer mamario y según los datos arrojados por esta investigación, se puede concluir que:

1. No mostró actividad genotóxica en las *D. melanogaster* producto de la cruza de bioactivación elevada.
2. No es activado por la familia del citocromo P450 producido por *D. melanogaster*.
3. El 4 nitroquinole-1-oxide (4NQO) fue activado por la familia del citocromo P450 en la prueba del ala SMART en *D. melanogaster*, comprobándose su acción genotóxica.
4. Al parecer, el TAM tiene múltiples ventajas que ayudan al organismo, pero también presenta infinidad de efectos colaterales, quizá no fatales como el cáncer, por lo que su uso debe estar muy bien controlado y totalmente justificado.

REFERENCIAS

- AVENDAÑO L. C. (1993) "Introducción a la química farmacéutica". Interamericana McGraw Hill, España, pp. 1-10.
- BATISTE-ALETRON M., N. Xamena, A. Creus y R. Marcos (1994) "Further Studies with the Somatic White-Ivory System of *Drosophila melanogaster* : Genotoxicity Testing of Ten Carcinogens" *Environ. Mol. Mut.*24(2):143-147.
- BLAND K. I. y E. M. Copeland III (1993) "La mama: manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas" Panamericana, Argentina, pp. 1009-1112.
- BUSH H. (1997) "Adducts and tamoxifen" *Semin. Oncol.* 24 : S1-98-S1-104.
- CABLE News Network CNN (2000) "Drugmay case hot flashes in women in women with breast cancer" [Http://CNN.com](http://CNN.com)
- CAI Q. Y H. Wei (1995) "In vivo formation of DNA-adducts in mouse skin DNA by tamoxifen" *Cancer Lett.* 92: 187-192.
- CARMICHAEL P. L., A. H. Ugwumadu, P. Neven, A. J. Hewer, G. K. Poon y D. H. Phillips (1996) "Lack of genotoxicity of tamoxifen in human endometrium" *Cancer Res.* 56: 1475-1479.
- CARTHEW P., E. A. Martin, I. N. White, F. De Matties, R. E. Edwards, B. M. Dorman, R. T. Heydon y L. L. Smith (1995) "Tamoxifen induces short-term cumulative DNA damage and liver tumors in rats : promotion by phenobarbital" *Cancer Res.* 55: 544-547.
- COMOGLIO A., A. H. Gibbs, I. N. White, T. Grant, E. A. Martin, L. L. Smith, S. R. Gamalero y F. De Matteis (1996) "Effects of tamoxifen feeding on metabolic activation of tamoxifen by the liver of the rhesus monkey: does liver accumulation of inhibitory metabolites protect from tamoxifen-dependent genotoxicity and cancer " *Carcinogenesis* 17: 1687-1693.
- CROFTON S. C., A. Doherty, S. Ellard, E. M. Parry y S. Venitt (1993) "Micronucleus assays using cytochalasin-blocked MCL-5 cells, a proprietary human cell line expressing five human cytochromes P-450 and microsomal epoxide hydrolase" *Mutagenesis* 8: 363-372.
- DAVIES R., V. I. Oreffo, E. A. Martin, M. F. Festing, I. N. White, L. L. Smith y J. A. Styles (1997) "Tamoxifen causes gene mutations in the livers of lambda/tacl transgenic rats" *Cancer Res.* 57: 1288-1293.

- DELGADO-RODRIGUEZ A., R. Ortiz-Martelo, U. Graf, R. Villalobos-Pietrini y S. Gómez-Arroyo (1994) "Genotoxicity produced by airborne particules in somatic cells of *Drosophila melanogaster*" **Rev. Int. Contamin. Ambient.** 10 suppl. 1:25-26.
- DELGADO-RODRIGUEZ A., R. Ortiz-Martelo, U. Graf, R. Villalobos-Pietrini y S. Gómez-Arroyo (1995) "Genotoxic activity of environmentally important polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*" **Mut. Res.** 341:235-247.
- EASTON J. 1998 "Tamoxifen in action" www.uchicago.edu
- FOZ-SALA M., S. Erill y C. Soler-Argilaga (1987) "Terapéutica en medicina interna" Doyma, 2ª edición, España, pp. 979-980.
- FREI H. y F.E. Würzler (1988) "Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila melanogaster* indicates a positive, negative or inconclusive result" **Mut. Res.** 203:297-308.
- GAVIAO I., M.L.Sierra y A.M. Comendador (1999) "The w/w SMART assay of *Drosophila melanogaster* detects the genotoxic effects of reative oxygen species inducing compounds" **Mut. Res.** 440(2):139-145
- GÖRIN M.B., R. Day, P.J. Constantino, B. Fisher, K.C.Redmon, L. Wickerham (1998) "Long-term tamoxifen citrate use and potential ocular toxicity" **American Journal Ophthalmology** 125:493-501.
- GÓMEZ-ARROYO S. (1994) "Importancia del metabolismo vegetal en la expresión mutagénica de los plaguicidas" **Boletín Mendel, Soc. Mex. de Genética** 3 (2): 2-4.
- GORDON F. (1999) "Tamoxifen and menstruation" www.WedMD.com
- GRAF U., F. E. Würzler, A. J. Katz, H. Frei, H. Huon, C. B. Hall y P. G. Kale (1984) "Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*" **Environ. Mutagen.** 6:153-188.
- GRAF U. y F. E. Würzler (1986) "Investigation of coffee in *Drosophila melanogaster* genotoxicity tests" **Fd. Chem. Toxic.** 24: 835-842.

- GRAF U. y D. Singer (1989) "Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster* (wing spot test): Effects of extracts of airborne particulate matter from fire-exposed and non fire-exposed building ventilation filters" **Chemosphere** 19:1094-1907.
- GRAF U. y N. Van Schaik (1992) "Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*" **Mut. Res.** 271: 59-67.
- GRAF U., A. Alonso-Moraga, R. Castro y E. Diaz-Castillo (1994) "Genotoxic testing of different types of beverages in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test" **Fd. Chem. Toxic.** 32: 423-430
- GRAF U. (1995) "Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*" **Experientia** 51 : 168-173.
- GRAF U. y F. E. Würgler (1996) "The Somatic white-ivory Eye Spot Test Does Not Detect the Same Spectrum of Genotoxic Events as the Wing Somatic Mutation and recombination Test in *Drosophila melanogaster*" **Environ. and Mol. Mut.** 27 : 219-226.
- GRAF U., S. K. Abraham, J. Guzmán-Rincón y F. E. Würgler (1998) "Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*" **Mut. Res.** 402: 203-209.
- GREAVES P., R. Goonetilleke, G. Nunn, J. Topham y T. Orton (1993) "Two-year carcinogenicity study of tamoxifen in Alderley Park Wistar-derived rats" **Cancer Res.** 53: 3919-3924.
- GUZMAN-RINCON J. y U. Graf (1995) "*Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. Manuscript for Biomonitoring and Biomarkers as indicators of Environmental Change: a Handbook" F. M. Butterworth, L. D. Orkum y J. Guzmán-Rincón. Plenum Publishing Corp.
- HÄLLSTRÖM I. Y A. Blanck (1985) "Genetic variation in cytochrome P450 system in *Drosophila melanogaster*. I. Chromosomal determination of some cytochrome P450-dependent reactions" **Chem.-Biol. Interactions** 56:157-171.
- HERES P. M.E. (2001) "Efecto de los nitratos de plomo y de calcio sobre la acción mutagénica y recombinogénica del metilmetanosulfonato" Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Biología), Facultad de Ciencias UNAM., México

- HUKKANEN J., M. Mantyla, L. Kangas, P. Wirta, J. Hakkola, P. Paakki, S. Evisalmi, O. Pelkonen y H. Raunio (1998) "Expression of cytochrome P450 genes encoding enzymes active in the metabolism of tamoxifen in human uterine endometrium". **Pharmacol. Toxicol.** 82 : 93-97.
- JARMAN M., G. K. Poon, M. G. Rowlands, R. M. Grimshaw, M. N. Horton, G. A. Potter y R. McCague (1995) "The deuterium isotope effects for the alpha-hydroxylation of tamoxifen by rat liver microsomes accounts for the reduced genotoxicity of [D5-ethyl]tamoxifen" **Carcinogenesis** 16 : 683-688.
- KOMEN S. (1999) "Tamoxifen as a treatment for breast cancer" [Http://BreastCancerInfo.com](http://BreastCancerInfo.com)
- LEE W. M. (1995) "Drug Induced Hepatotoxicity, Review Article" **New Eng. J. Med.** 333 (17): 1118-1127.
- LIM C. K., Z. X. Yuan, R. M. Jones, I. N. White y L. L. Smith (1997) "Identification and mechanism of formation of potentially genotoxic metabolites of tamoxifen: study by LC-MS/MS" **J. Pharm. Biomed. Anal.** 15 : 1335-1342.
- MARQUES M. y F. A. Beland (1997) "Identification of tamoxifen-DNA adducts formed by 4-hydroxitamoxifen quinone methide" **Carcinogenesis** 18 : 1949-1954.
- MERK, the index (1976): "An encyclopedia of chemicals and drugs" Merck and Co., Inc. 9ª edición USA.
- MOORTHY B., P. Sriram, E. Randerath, y K. Randerath (1997) "Effects of cytochrome P450 inducers on tamoxifen genotoxicity in female mice in vivo" **Biochem. Pharmacol.** 53:663-669.
- NAYFIELD S.G. y B.M. Gorin (1996) "Tamoxifen-associated eye disease: a review" **Journal Clin. Oncology** 19:1018-1026.
- NATIONAL CANCER INSTITUT (1999) "Questions and answers about tamoxifen" [Http://www.nci.nih.gov](http://www.nci.nih.gov)
- OSBORNE M. R., A. Hewer, I. R. Hardcastle, P. L. Carmichael y D. H. Phillips (1996) "Identification of the major tamoxifen- deoxyguanosine adduct formed in the liver DNA of rats treated with tamoxifen" **Cancer Res.** 56: 66-71.

- PHILLIPS D. H., P. L. Carmichael, A. Hewer, K. J. Cole y G. K. Poon (1994a) "alpha-Hydroxitamoxifen, a metabolite of tamoxifen with exceptionally high DNA-binding activity in rat hepatocytes" **Cancer Res.** 54: 5518-5522.
- PHILLIPS D. H., G. A. Potter, M. N. Horton, A. Hewer, C. Crofton Sleigh, M. Jarman y S. Venitt (1994b) "Reduced genotoxicity of [D5-ethyl]-tamoxifen implicates alpha-hydroxilation of the ethyl group as a major pathway of tamoxifen activation to a liver carcinogen" **Carcinogenesis** 15: 1487-1492.
- QINGYI W., M.R. Spitz, J. Gu, L. Cheng, X. Xu, S.S. Strom, M.L. Kripke y T.C. Hsu (1996) "DNA repair capacity correlates with mutagen sensitivity in lymphoblastoid cell lines 1,2" **Cancer Epidemiology, biomarkers and prevention** 5:199-204.
- RAJAH T. T. y J. T. Pento (1995) "The mutagenic potential of antiestrogens at the HPRT locus in V79 cells" **Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.** 89: 85-92.
- RANDERATH K., J. Bi, N. Mabon, P. Sriram and B. Moorthy (1994) "Strong intensification of mouse hepatic tamoxifen DNA adduct formation by pretreatment with the sulfotransferase inhibitor and ubiquitous environmental pollutant pentachlorofenol" **Carcinogenesis** 15 : 797-800.
- RAPOSA T. y J. Varkonyi (1987) "The relationship between sister chromatid exchange induction and leukemogenicity of different cytostatics" **Cancer. Detect. Prev.** 10 :141-151.
- SANER C., B. Weibel, F. E. Würigler y C. Sengstag (1996) "Metabolism of promutagens Catalyzed by *Drosophila melanogaster* CPYP6A2 Enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*" **Envir. and Mol. Mut.** 27 : 46-58.
- SARGENT L. M., Y. P. Dragan, N. Bahnb, J. E. Wiley, C. A. Sattler, P. Schroeder, G. L. Sattler, V. C. Jordan y H. C. Pitot (1994) "Tamoxifen induces hepatic aneuploidy and mitotic spindle disruption after a single in vivo administration to female Sprague-Dawley rats" **Cancer Res.** 54 : 3357-3360.
- SCHERER J.(1983) "Introducción a la farmacología clínica". Harla ,2ª edición. México, pp. 1, 19, 94, 51.
- SMITH L. L. y I. N. White (1995) "Chemoprevention of breast cancer by tamoxifen : risk and opportunities". **Toxicol. Lett.** 82-83 : 181-186.
- SMITH L. L. y I. N. White (1998) "Antiestrogen therapy : uncertainties and risk assessment" **Oncology Huntingt** 12 : 14-22.

- STYLES J. A., A. Davies, C. K. Lim, F. De Matteis, L. A. Stanley, I. N. White, Z. X. Yuan, L. L. Smith (1994) "Genotoxicity of tamoxifen, tamoxifen epoxide and toremifene in human lymphoblastoid cells containing human citocromo P450s" **Carcinogenesis** 15 : 5-9
- STYLES J. A., A. Davies, R. Davies, I. N. White y L. L. Smith (1997) "Clastogenic and aneugenic effects of tamoxifen and some of its analogues in hepatocytes from dosed rats and in human lymphoblastoid cells transfected with human P450 cDNAs (MCL-5)" **Carcinogenesis** 18 : 303-313.
- TANNENBAUM S. R. (1997) "Comparative metabolism of tamoxifen and DNA adduct formation and *in vitro* studies on genotoxicity" **Semin. Oncol.** 24 : S1-81-S1-6.
- TIERNEY L. M., M. A. Papadakis y S. J. McPhee (1996) "Diagnóstico clínico y tratamiento" *El Manual Moderno*, 31ª edición, México, pp 58, 66, 644-645.
- TSUTSUI T., S. Taguchi, Y. Tanaka y J. C. Barret (1997) "17beta-estradiol, diethylstilbestrol, tamoxifen, toremifene and ICI 164,384 induce morphological transformation and aneuploidy in cultured Syrian hamster embryo cell" **Int. J. Cancer** 70 : 188-193.
- VANCUTSEM P. M., P. Lazarus y G. M. Williams (1994) "Frequent and specific mutations of the rat p53 gene in hepatocarcinomas induced by tamoxifen" **Cancer Res.** 54 : 3864-3867.
- VAN SCHAİK N., A. Grant, I. Rubenchik y U. Graf (1984) "Use of *Drosophila* test systems for genotoxicity testing of herbal teas" **Immunol. Hematol. Res.** 3 : 199-202.
- VIJAYALAXMI K. K. y S. P. Rai (1996) "Studies on the genotoxicity of tamoxifen citrate in mouse bone marrow cells" **Mut. Res.** 358 : 109-114.
- VOGEL E. W. y J. A. Zijlstra (1987) "Mechanistic and methodological aspects of chemically-induced somatic mutation and recombination *D. melanogaster*" **Mut. Res.** 182 : 243-264.
- VOGEL E. W. (1991) "An introduction into basic principles of genetic toxicology, Genotoxic Chemical"
- VOGEL E. W. , U. Graf, H.J. Frei y J.M.M. Nirvard (1999) "The results of assays in *D. Melanogaster* as indicator of exposure to carcinogens" **Inter. Agency for Res. of Cancer Lyon** 146: 427-470.

WHITE I. N., F. de Matteis, A. Davies, L. L. Smith, C. Crofton Sleigh, S. Venitt, A. Hewer, D. H. Phillips (1992) "Genotoxic potential of tamoxifen and analogues in Female Fischer F344/n rats, DBA/2 and C57BL/6 mice and in human MCL-5 cells" **Carcinogenesis** 13 :2197-2203.

WILLIAMS G. M. y A. M. Jeffrey (1997) "Safety assessment of tamoxifen and toremifene" **Oncology Huntingt** 11 : 4747.

WILSON A. S., M. D. Tingle, M. D. Kelly y B. K. Park (1995) "Evaluation of the generation of genotoxic and cytotoxic metabolites of benzo[a]pyrene, aflatoxin B1, naphthalene and tamoxifen using human liver microsomes and human lymphocytes" **Hum. Exp. Toxicol.** 14 : 507-515.

WOGAN G.N. (1997) "Review of the toxicology of tamoxifen" **Semin. Oncol.** 24:S1-87-S1-97.

APÉNDICE

1. Tween-80, marca SIGMA, no. cat. P-8074
2. Etanol, marca MERCK
3. Tamoxifen (citrato de tamoxifen), marca SIGMA, no. cat. T-9262, Lote 126H0323, Pureza 99% PM 563.6g fórmula C₂₆H₂₉NO. C₆H₈O₇
4. 4-Nitroquinoleína, marca SIGMA, no. cat 8141, Lote 48h0477, PM 190.2 fórmula C₉H₆N₂O₃

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**